



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA  
SUPERIOR INGENIERÍA  
INDUSTRIAL VALENCIA

**TRABAJO FIN DE MASTER EN INGENIERÍA BIOMÉDICA**

# **ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NANOPARTÍCULAS EN LA APLICACIÓN DE HIPERTERMIA ÓPTICA PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER CUTÁNEO**

AUTORA: MARIA PARDO HUGUET

TUTORA: BEATRIZ ANA TRÉNOR GOMIS

COTUTOR: FRANCISCO JAVIER IBÁÑEZ CIVERA

**Curso Académico: 2019-20**

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a mis tutores, Beatriz y Javier, por toda la ayuda prestada durante la realización de este proyecto. A José Manuel y Cristina por acompañarme y enseñarme aquello en lo que han estado trabajando durante mucho tiempo.

A mi familia en especial a mis padres, mi abuela y mis hermanos, por su apoyo incondicional durante todas mis etapas como estudiante. Es toda una suerte poder crecer y aprender con unos profesores como vosotros. A Laia y Eric, por completar la familia de la mejor de las maneras. A Josep, por acompañarme y caminar a mi lado siempre. Sin vosotros no hubiera podido llegar hasta este punto.

A los que empezaron siendo mis compañeros y ahora son mis amigos del máster en Ingeniería Biomédica, por compartir estos dos años y por enseñarme muchas cosas tanto profesional como personalmente.

A mis amigos, Lucía, Andrés, Lizet, David y Anna por todos estos años juntos y los que nos quedan por compartir.

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

## RESUMEN

En el presente trabajo de Fin de Máster se ha estudiado la respuesta térmica y temporal ante la producción de hipertermia óptica al aplicar radiación láser sobre nanoestrellas de oro. Para ello se ha realizado un estudio experimental sobre dos líneas celulares distintas y un modelo computacional del tejido cutáneo.

La hipertermia óptica es una técnica utilizada en el tratamiento de cáncer cutáneo, que es uno de los más incidentes entre la población caucásica. Esta técnica se basa en la aplicación de un haz de luz sobre tejidos tumorales con la finalidad de elevar su temperatura y provocar la muerte celular. Para que este proceso se pueda realizar se administra una concentración de nanopartículas metálicas en la zona tumoral. Este tipo de nanopartículas están diseñadas para que la resonancia de plasmón de superficie se encuentre en la misma longitud de onda que el haz de luz.

Los ensayos sobre cultivos celulares se han realizado para verificar el correcto funcionamiento de un equipo de hipertermia óptica administrando nanopartículas previamente diseñadas. La finalidad de estas pruebas experimentales es conocer la toxicidad de las nanoestrellas utilizadas y estudiar el efecto de producir hipertermia óptica sobre dos líneas celulares distintas.

Como paso previo a la utilización del equipo sobre tejido cutáneo, se ha desarrollado un modelo computacional de una zona cancerígena con el objetivo de optimizar los parámetros de hipertermia en una situación real. Esta ventaja de la simulación computacional permite estudiar qué valores lograrán el objetivo deseado: elevar la temperatura de una zona dañada sin afectar las zonas sanas. Los parámetros estudiados son la concentración de nanopartículas, la potencia del haz de luz, el tiempo de irradiación y el radio de aplicación.

Los resultados experimentales muestran que el equipo de hipertermia óptica consigue causar un incremento de la temperatura en el medio de cultivo objetivo, lo que corrobora que se consigue el efecto correcto. Además, se determina la toxicidad de las nanopartículas para evitar que la muerte celular se vea asociada a una concentración excesiva de estas en el cultivo celular.

A partir del desarrollo computacional y de los resultados obtenidos se comprueba que se consigue replicar correctamente el comportamiento térmico del tejido cutáneo sometido a un tratamiento de hipertermia óptica. Se estudia el comportamiento del tejido al variar los parámetros de interés y a partir de los distintos resultados obtenidos se ajustan los parámetros del equipo para conseguir obtener los resultados más óptimos en el tratamiento.

**Palabras clave:** hipertermia óptica, nanoestrellas de oro, cáncer cutáneo, concentración, tiempo de irradiación.

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

## RESUM

En aquest treball de Fi de Màster s'ha estudiat la resposta tèrmica i temporal davant la producció d'hipertèrmia òptica en aplicar radiació làser sobre nanoestrelles d'or. Per tal de dur-ho a terme, s'ha realitzat un estudi experimental sobre dos línies cel·lulars distintes i un model computacional del teixit cutani.

La hipertèrmia òptica es una tècnica utilitzada en el tractament de càncer cutani, que és un dels més incidents entre la població caucàsica. Aquesta tècnica es basa en l'aplicació d'un feix de llum sobre teixits tumorals, amb la finalitat d'eleva la seua temperatura i provocar la mort cel·lular. Per a que aquest procés es pugui realitzar s'administra una concentració de nanopartícules metàl·liques en la zona tumoral. Aquest tipus de nanopartícules estan dissenyades per a que la ressonància de plasmó de superfície es trobe a la mateixa longitud d'ona que el feix de llum.

Els assajos sobre cultius cel·lulars s'han realitzat per a verificar el correcte funcionament d'un equip d'hipertèrmia òptica administrant nanopartícules prèviament dissenyades. La finalitat d'aquestes proves experimentals és conèixer la toxicitat de les nanoestrelles utilitzades i estudiar l'efecte d'aplicar hipertèrmia òptica sobre dos línies cel·lulars distintes.

Com a pas previ a la utilització de l'equip sobre teixit cutani, s'ha desenvolupat un model computacional d'una zona cancerígena amb l'objectiu d'optimitzar els paràmetres d'hipertèrmia en una situació real. Aquest avantatge de la simulació computacional permet estudiar quins valors aconseguen l'objectiu desitjat: eleva la temperatura d'una zona danyada sense afectar les zones sanes que l'envolten. Els paràmetres estudiats són la concentració de nanopartícules, la potència del feix de llum, el temps d'irradiació i el radi d'aplicació.

Els resultats experimentals mostren que l'equip d'hipertèrmia òptica aconseguix causar un increment de la temperatura en el medi de cultiu objectiu, el que corrobora que s'aconsegueix l'efecte correcte. A més a més, es determina la toxicitat de les nanopartícules per a evitar que la mort cel·lular es trobe associada a una concentració excessiva d'aquestes en el cultiu cel·lular.

A partir del desenvolupament computacional i dels resultats obtinguts es comprova que es replica correctament el comportament tèrmic del teixit cutani sotmès a un tractament d'hipertèrmia òptica. S'estudia el comportament del teixit cutani en variar els paràmetres d'interès i a partir dels resultats obtinguts s'ajusten els paràmetres de l'equip per a aconseguir obtenir els resultats més òptims en el tractament.

**Paraules clau:** hipertèrmia òptica, nanoestrelles d'or, càncer cutani, concentració, temps d'irradiació.

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

## ABSTRACT

In this Master's Thesis, it has been studied the thermal and temporal response to the production of optical hyperthermia when applying laser radiation on gold nanostars. In order to develop this, it has been carried out an experimental study on two different cell lines and a computational model to simulate skin tissue.

Optical hyperthermia is a technique used in the skin cancer treatment, which is one of the most common among the Caucasian population. This technique is based on the application of a beam of light on tumor tissues in order to raise its temperature and cause cell death. This process is carried out by administrating a concentration of metallic nanoparticles in the tumor area. These types of nanoparticles are designed so that the surface plasmon resonance is at the same wavelength as the light beam.

Cell cultures tests have been developed to verify an optical hyperthermia equipment and nanoparticles previously designed. The purpose of these experimental tests is to know the toxicity of the nanostars used and to study the effect of applying optical hyperthermia on two different cell lines.

As a preliminary step, a computational model of a cancer volume has been designed with the aim of optimizing hyperthermia parameters in a real situation. The advantages of computational simulation make it possible to study which are the optimal values in order to achieve the desired objective: to raise the temperature of a damaged area without affecting healthy tissue. The parameters studied are nanoparticles concentration, the power of the light beam, the irradiation time and the application radius.

Experimental results show that the optical hyperthermia equipment manages to cause an increase in temperature in the target culture medium, which corroborates that the correct effect is achieved. In addition, it is possible to determine the toxicity of the nanoparticles to prevent cell death from being associated with an excessive concentration in the cell culture.

From the computational development and obtained results, it is verified that the thermal behavior of the skin tissue subjected to an optical hyperthermia treatment is successfully replicated. It is studied the behavior of the tissue by varying the interest parameters and, based on the different results the parameters of the equipment are adjusted to obtain the most optimal results in the treatment.

**Key words:** optical hyperthermia, gold nanostars, skin cancer, concentration, irradiation time.

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

## ÍNDICE GENERAL

<b>MEMORIA .....</b>	<b>13</b>
<b>PRESUPUESTO .....</b>	<b>95</b>

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA  
SUPERIOR INGENIERÍA  
INDUSTRIAL VALENCIA

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

# MEMORIA

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

## ÍNDICE DE LA MEMORIA

<b>CAPÍTULO 1: Motivación, antecedentes y justificación</b> .....	25
<b>CAPÍTULO 2: Introducción y estado del arte</b> .....	26
2.1. Cáncer de piel .....	26
2.1.1. Cáncer cutáneo no-melanoma .....	26
2.1.1.1. Epidemiología .....	26
2.1.1.2. Etiología y patología .....	26
2.1.1.3. Diagnóstico .....	26
2.1.1.4. Tratamiento .....	27
2.1.2. Cáncer cutáneo melanoma .....	28
2.1.2.1. Epidemiología .....	28
2.1.2.2. Etiología y patogenia .....	28
2.1.2.3. Formas clínicas .....	28
2.1.2.4. Diagnóstico .....	29
2.1.2.5. Tratamiento .....	29
2.2. Nanopartículas .....	30
2.2.1. Nanopartículas de oro .....	30
2.2.1.1. Propiedades y síntesis .....	31
2.2.1.2. Aplicaciones .....	31
2.3. Hipertermia .....	32
2.3.1. Hipertermia óptica .....	33
2.3.2. Hipertermia óptica en COMSOL .....	33
2.3.3. Hipertermia óptica en entorno celular .....	35
<b>CAPÍTULO 3: Objetivos</b> .....	36
<b>CAPÍTULO 4: Metodología</b> .....	37
4.1. Diseño experimental .....	37
4.1.1. Materiales.....	37
4.1.2. Métodos .....	40
4.1.2.1. Cultivo celular .....	40
4.1.2.2. Ensayos de citotoxicidad .....	42
4.1.2.3. Ensayos de hipertermia óptica .....	44

4.2.	Desarrollo computacional .....	45
4.2.1.	Entorno COMSOL.....	45
4.2.2.	Principio matemático .....	45
4.2.3.	Modelo y características.....	47
<b>CAPÍTULO 5: Resultados y discusión .....</b>		<b>53</b>
5.1.	Resultados experimentales .....	53
5.1.1.	Ensayos de citotoxicidad .....	53
5.1.2.	Ensayos de hipertermia óptica .....	55
5.2.	Resultados computacionales.....	60
5.2.1.	Modelo 1 .....	61
5.2.2.	Modelo 2 .....	65
5.2.3.	Modelo 3 .....	72
5.2.4.	Modelo 4 .....	80
5.2.5.	Comparativa de los resultados .....	86
<b>CAPÍTULO 6: Conclusiones.....</b>		<b>88</b>
<b>CAPÍTULO 7: Limitaciones y líneas de trabajo futuras .....</b>		<b>89</b>
<b>CAPÍTULO 8: Referencias bibliográficas .....</b>		<b>90</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cultivo celular HeLa [39].	38
<b>Figura 2.</b> Equipo de hipertermia óptica.	39
<b>Figura 3.</b> Interfaz gráfica del software de hipertermia.	40
<b>Figura 4.</b> Cuento celular utilizando una cámara de Neubauer.	41
<b>Figura 5.</b> Medida de la actividad celular mediante un microscopio.	41
<b>Figura 6.</b> Espectro de las nanopartículas de oro.	43
<b>Figura 7.</b> Cuantificación de la actividad celular mediante ensayo de MTT.	44
<b>Figura 8.</b> Volumen de aplicación de hipertermia óptica.	47
<b>Figura 9.</b> Sección transversal del volumen de estudio.	48
<b>Figura 10.</b> Zona cancerígena.	49
<b>Figura 11.</b> Tejido sano.	50
<b>Figura 12.</b> Mallado del método de elementos finitos (FEM).	51
<b>Figura 13.</b> Punto de medida de la temperatura máxima.	52
<b>Figura 14.</b> Toxicidad de las nanopartículas de oro sobre cultivos celulares HeLa.	54
<b>Figura 15.</b> Toxicidad de las nanopartículas de oro sobre cultivos celulares Sk-mel.	55
<b>Figura 16.</b> Viabilidad celular dependiente del tiempo de aplicación de calor sin nanopartículas.	56
<b>Figura 17.</b> Viabilidad celular sobre cultivos HeLa tras aplicar hipertermia.	57
<b>Figura 18.</b> Viabilidad celular sobre cultivos Sk-mel tras aplicar hipertermia.	58
<b>Figura 19.</b> Viabilidad celular sobre cultivos HeLa y Sk-mel tras irradiar durante 10 minutos.	58
<b>Figura 20.</b> Viabilidad celular sobre cultivos HeLa y Sk-mel tras irradiar durante 15 minutos.	59
<b>Figura 21.</b> Tendencias de temperatura por concentración y tiempo.	60
<b>Figura 22.</b> Evolución temporal de la temperatura para distintas concentraciones de nanopartículas para una potencia de 500 mW y un radio de aplicación de 2 mm.	61
<b>Figura 23.</b> Evolución temporal de la temperatura para concentraciones de nanopartículas comprendidas entre 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para una potencia de 500 mW y un radio de aplicación de 2 mm.	62
<b>Figura 24.</b> Distribución radial de la temperatura para 5 minutos de irradiación y una concentración de 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ .	64
<b>Figura 25.</b> Distribución volumétrica de la temperatura para 5 minutos de irradiación y una concentración de 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ .	64
<b>Figura 26.</b> Evolución temporal de la temperatura para distintas concentraciones de nanopartículas para una potencia de 500 mW y un radio de aplicación de 5 mm.	65

<b>Figura 27.</b> Evolución temporal de la temperatura para distintas concentraciones de nanopartículas para una potencia de 700 mW y un radio de aplicación de 2 mm.....	66
<b>Figura 28.</b> Evolución temporal de la temperatura para distintas concentraciones de nanopartículas comprendidas entre 25 µg/mL y 50 µg/mL.....	67
<b>Figura 29.</b> Distribución radial de la temperatura para 5 minutos de irradiación y una concentración de 40 µg/mL. ....	68
<b>Figura 30.</b> Distribución volumétrica de la temperatura para 5 minutos de irradiación y una concentración de 40 µg/mL. ....	69
<b>Figura 31.</b> Evolución temporal de la temperatura para distintas concentraciones de nanopartículas para una potencia de 700 mW y un radio de aplicación de 5mm. ....	69
<b>Figura 32.</b> Distribución radial de la temperatura para 10 minutos de irradiación y una concentración de 100 µg/mL. ....	71
<b>Figura 33.</b> Distribución volumétrica de la temperatura para 10 minutos de irradiación y una concentración de 100 µg/mL. ....	71
<b>Figura 34.</b> Evolución temporal de la temperatura para distintas concentraciones de nanopartículas para una potencia de 1W y un radio de aplicación de 2mm.....	72
<b>Figura 35.</b> Evolución temporal de la temperatura para concentraciones comprendidas entre 15 µg/mL y 30 µg/mL. ....	73
<b>Figura 36.</b> Distribución radial de la temperatura para 5 minutos de irradiación y una concentración de 25 µg/mL. ....	74
<b>Figura 37.</b> Distribución volumétrica de la temperatura para 5 minutos de irradiación y una concentración de 25 µg/mL. ....	75
<b>Figura 38.</b> Evolución temporal de la temperatura para distintas concentraciones de nanopartículas para una potencia de 1 W y un radio de aplicación de 5mm.....	76
<b>Figura 39.</b> Evolución temporal de la temperatura para concentraciones comprendidas entre 50 µg/mL y 85 µg/mL. ....	77
<b>Figura 40.</b> Distribución radial de la temperatura para 5 minutos de irradiación y una concentración de 75 µg/mL. ....	79
<b>Figura 41.</b> Distribución volumétrica de la temperatura para 5 minutos de irradiación y una concentración de 75 µg/mL. ....	79
<b>Figura 42.</b> Evolución temporal de la temperatura para distintas concentraciones de nanopartículas para una potencia de 1.2 W y un radio de aplicación de 2 mm.....	80
<b>Figura 43.</b> Evolución temporal de la temperatura para concentraciones comprendidas entre 10 µg/mL y 25 µg/mL. ....	81
<b>Figura 44.</b> Distribución radial de la temperatura para 5 minutos de irradiación y una concentración de 15 µg/mL. ....	82

<b>Figura 45.</b> Distribución volumétrica de la temperatura para 5 minutos de irradiación y una concentración de 15 $\mu\text{g/mL}$ . .....	82
<b>Figura 46.</b> Evolución temporal de la temperatura para distintas concentraciones de nanopartículas para una potencia de 1.2 W y un radio de aplicación de 5 mm.....	83
<b>Figura 47.</b> Evolución temporal de la temperatura para concentraciones comprendidas entre 50 $\mu\text{g/mL}$ y 75 $\mu\text{g/mL}$ . .....	84
<b>Figura 48.</b> Distribución radial de la temperatura para 5 minutos de irradiación y una concentración de 60 $\mu\text{g/mL}$ . .....	85
<b>Figura 49.</b> Distribución volumétrica de la temperatura para 5 minutos de irradiación y una concentración de 60 $\mu\text{g/mL}$ . .....	85
<b>Figura 50.</b> Comparativa de las distintas dosis de nanopartículas administradas para cada potencia estudiada con un radio de aplicación de 2 mm. ....	86

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Tipos principales de melanoma [13]. .....	28
<b>Tabla 2.</b> Parámetros del modelo de simulación.....	48
<b>Tabla 3.</b> Características térmicas de los distintos tejidos del volumen de simulación [36].....	48
<b>Tabla 4.</b> Características del flujo sanguíneo [36]. .....	49
<b>Tabla 5:</b> Relación concentración-volumen de nanopartículas.....	53
<b>Tabla 6.</b> Valores temporales de temperatura para concentraciones comprendidas entre 50 µg/mL y 75 µg/mL. ....	63
<b>Tabla 7.</b> Valores temporales de temperatura para concentraciones comprendidas entre 25 µg/mL y 50 µg/mL. ....	68
<b>Tabla 8.</b> Valores temporales de temperatura para concentraciones comprendidas entre 100 µg/mL y 10 µg/mL. ....	70
<b>Tabla 9.</b> Valores temporales de temperatura para concentraciones comprendidas entre 15 µg/mL y 30 µg/mL. ....	73
<b>Tabla 10.</b> Valores temporales de temperatura para concentraciones comprendidas entre 50 µg/mL y 85 µg/mL. ....	78
<b>Tabla 11.</b> Valores temporales de temperatura para concentraciones comprendidas entre 10 µg/mL y 25 µg/mL. ....	81
<b>Tabla 12.</b> Valores temporales de temperatura para concentraciones comprendidas entre 50 µg/mL y 75 µg/mL .....	84

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

CB	Carcinoma basocelular
CE	Carcinoma espinocelular
DMF	N-dimetilformamida
EDTA	Etilendiaminotetraacético
MM	Metástasis melanoma
MRI	Imagen de resonancia magnética
NIR	Espectroscopía de infrarrojo cercano
PDD	Diagnóstico fotodinámico
PDT	Terapia fotodinámica
PVP	Polivinilpirrolidona
Sk-mel	Células melanoma
SPR	Resonancia de plasmón de superficie
UV	Radiación ultravioleta

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

## CAPÍTULO 1: Motivación, antecedentes y justificación

El cáncer de piel es uno de los más comunes entre la población caucásica. A medida que la medicina avanza se intentan establecer nuevos métodos de tratamiento que permitan obtener unos resultados óptimos de forma más segura.

La nanomedicina es empleada en el tratamiento de distintas enfermedades, así como en la obtención de imágenes médicas. Las propiedades de los materiales y de los tejidos varían a pequeña escala y permiten obtener buenos resultados mediante tratamientos mínimamente invasivos.

Distintos procedimientos incorporan nanomateriales y permiten eliminar riesgos existentes en técnicas convencionales. A partir de esta condición surge el interés de aplicar un procedimiento de estas características en el tratamiento de cáncer cutáneo, con la finalidad de complementar técnicas convencionales.

La hipertermia óptica es una técnica utilizada en el tratamiento de zonas cancerígenas para provocar la muerte celular sin ocasionar daños adicionales en los tejidos sanos. Además, permite discriminar entre zonas debido a las diferencias fisiológicas existentes entre áreas dañadas y sanas, como la vascularización.

El Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico de la Universidad Politécnica de Valencia ha desarrollado distintos equipos de hipertermia óptica, así como las nanopartículas utilizadas en esta técnica. La idea de este Trabajo Fin de Máster surge a partir del interés de verificar uno de los equipos experimentales diseñados, para comprobar su aplicación real en este ámbito. Además, se quiere conocer qué parámetros se tienen que tener en cuenta para ampliar las fronteras de aplicación al tratamiento sobre tejido celular.

En estudios previamente realizados por el mismo equipo de investigación, se ha comprobado el efecto de aplicar hipertermia óptica sobre nanopartículas de distintas morfologías y composiciones. En el proyecto llevado a cabo por Roberto Montes-Robles et al., se estudia la respuesta térmica experimental ante la aplicación de hipertermia utilizando un equipo de bajo coste, que tiene diferencias significativas respecto al utilizado en el presente trabajo [1].

Además, en estudios realizados por Andy Hernández et al., se diseñan nanoestrellas de oro de características concretas para este tipo de equipos de hipertermia [2] [3].

En el trabajo de José Manuel Terrés et al., se desarrolla el equipo de hipertermia óptica utilizado en el presente Trabajo de Fin de Máster, con algunos elementos novedosos respecto a estudios anteriores como la posibilidad de variar la potencia de aplicación, el ajuste de la posición de la muestra y el ancho de pulso del láser de irradiación [4].

A partir de las investigaciones citadas con anterioridad surge la necesidad de comprobar el funcionamiento del equipo diseñado en un escenario de aplicación real. Para verificar el correcto funcionamiento del equipo se tiene que comprobar si realmente se consigue el efecto deseado, que es elevar la temperatura de la zona de interés.

Además, se quiere conocer la respuesta temporal de la temperatura variando los parámetros de interés para conocer si existe alguna limitación a la hora de extrapolar el uso de este equipo a pruebas sobre tejido cutáneo y si es así, que parámetros sería necesario modificar.

## CAPÍTULO 2: Introducción y estado del arte

### 2.1. Cáncer de piel

El cáncer de piel es el cáncer maligno más común entre la población caucásica y se divide en dos variantes: el melanoma maligno y el cáncer cutáneo no melanoma.

La incidencia de este tipo de cáncer en la población se ha visto fuertemente incrementada durante las últimas décadas [5] [6].

#### 2.1.1. Cáncer cutáneo no-melanoma

El cáncer cutáneo no melanoma es el más común dentro del cáncer de piel. Su incidencia no se encuentra ligada al sexo y se relaciona directamente con la exposición solar. Tiene diversas variantes entre las cuales se encuentran las neoplasias queratinocíticas, que se pueden clasificar a su vez en carcinoma basocelular y espinocelular y tumores menos comunes como los linfomas cutáneos, carcinoma de células de Merkel, etcétera. A pesar de que este cáncer no suele producir metástasis, tiene una alta morbilidad asociada, sobre todo cuando no es diagnosticado y por tanto tratado de forma correcta [7].

##### 2.1.1.1. Epidemiología

El cáncer cutáneo no-melanoma de tipo carcinoma basocelular (CB) es el más común diagnosticado en caucásicos. Muestra una mayor incidencia anual en países como Australia y su incidencia en Europa y Estados Unidos es creciente. Afecta sobre todo a gente joven por sus hábitos de exposición solar [7].

Por otro lado, el carcinoma espinocelular (CE) es el que produce la mayor cantidad de muertes dentro del cáncer de piel no-melanoma. Es mucho menos frecuente y suele afectar a hombres mayores de piel tipo I. Su incidencia aumenta después de los 40 años. La probabilidad de sufrir este tipo de cáncer también se ve incrementada por la exposición intensa al sol [7].

##### 2.1.1.2. Etiología y patología

Tal y como se ha explicado con anterioridad, el principal factor de riesgo de este cáncer es la exposición a la luz ultravioleta (UV) [8]. Por ejemplo, podrían aparecer carcinomas basocelulares después de exposiciones prolongadas al sol que pueden perjudicar el ADN celular. Además, es posible que se produzcan mutaciones en genes de supresión tumoral [7].

Existen dos tipos de alteraciones: las de expresiones génicas y las de genes relacionados con enzimas, funciones estructurales y moléculas de adhesión. Las primeras son muy variadas mientras que las segundas se suelen encontrar en la mayoría de tumores [7].

##### 2.1.1.3. Diagnóstico

El cáncer de piel no-melanoma puede presentar diferentes formas como la modular, la morfeiforme o la quística. El diagnóstico de este tipo de cáncer se realiza en primer lugar a partir de sus características morfológicas [7].

Una de las técnicas utilizada comúnmente para su diagnóstico es la dermatoscopia, que es un procedimiento no invasivo que permite discriminar el tejido maligno del benigno [7].

#### 2.1.1.4. Tratamiento

El tratamiento del cáncer cutáneo no melanoma pretende realizar una destrucción o remoción completa del tumor preservando el tejido normal y su funcionalidad. Es también aconsejable lograr un resultado cosmético óptimo. Aunque se deben tener en cuenta los puntos citados, lo más importante es la remoción completa del tumor y se tendrá que realizar aunque afecte a alguno de los otros puntos [9] [10].

El carcinoma basocelular se trata mediante los distintos métodos que se especifican a continuación:

- **Electrocoagulación:** se utiliza para tumores nodulares de bordes bien definidos que se encuentran en la dermis superior y no están situados en zonas de alto riesgo. Deben tener menos de 1 cm de diámetro [7].
- **Extirpación quirúrgica:** se trata de un procedimiento que obtiene una rápida cicatrización y que por tanto presenta buenos resultados cosméticos. Se puede utilizar en cualquier variedad o localización del CB [7].
- **Cirugía micrográfica de Mohs:** mediante este procedimiento se consigue una mejora en el control histológico y la mayor preservación de tejido sano. Se aplica sobre CB con características agresivas y en áreas de alto riesgo [7].
- **Radioterapia:** permite conservar el tejido sano y se utiliza en zonas que necesitan grandes cirugías reconstructivas. Es de gran utilidad para pacientes de edad avanzada que no pueden soportar otro tipo de tratamiento. Presenta resultados positivos en lesiones de 1 cm y menores, sobre todo cuando se utiliza de forma fraccionada. Pese a sus ventajas no se aconseja para pacientes jóvenes [7].
- **Criocirugía:** en este procedimiento se alcanzan temperaturas de hasta -50 °C. Se pueden necesitar dos ciclos para conseguir esta temperatura. En todos los casos el tumor debe tener un margen de piel aparentemente sana para compensar el crecimiento subclínico. Es aplicado en pacientes con un mal estado de salud que toman anticoagulantes o utilizan marcapasos [7].
- **Láser:** mediante láseres de CO<sub>2</sub> se consigue cortar el tumor sin afectar la muestra. Además, coagula la zona e incluso es capaz de eliminar el cartílago o hueso en caso de ser necesario. Entre las distintas ventajas de esta técnica se encuentra la rápida cicatrización y el bajo riesgo de infección, ya que esteriliza cuando corta [4]. Este tipo de tratamiento es alternativo pero su eficacia clínica es viable [11].
- **Terapia fotodinámica:** esta terapia se basa en la aplicación de un fotosensibilizante endovenoso sobre el tumor, tópico o intralesional. Después se aplica una fuente de luz que activa y produce necrosis. La principal ventaja es que el tejido sano permanece intacto. El principal inconveniente es la penetración y por tanto, se suele utilizar en la variedad superficial [7].
- **Modificadores de respuesta inmune:** se utilizan de forma óptica y presentan una mayor eficacia en CB superficial que en nodular [7].

## 2.1.2. Cáncer cutáneo melanoma

Esta variante de cáncer cutáneo se caracteriza por ser el tumor más maligno de la piel. Se produce a causa de la transformación maligna de los melanocitos en la unión dermoepidérmica o en algunos novomelanocitos que se vuelven invasivos, produciendo metástasis a lo largo del tiempo [12] [13].

### 2.1.2.1. Epidemiología

Diversos estudios indican el incremento de la aparición del melanoma, clasificándose como la neoplasia maligna más frecuente. Es la principal enfermedad mortal originada en la piel. Dentro del total de personas que sufren alguno de los distintos tipos de cáncer de piel, este produce el 80% de las muertes [12] [14].

### 2.1.2.2. Etiología y patogenia

Aunque la causa y patogénesis del melanoma es desconocida se ha demostrado la influencia de la predisposición genética y la exposición solar, siendo la segunda la principal causa. Es el principal problema en caucásicos de piel tipo I y II. Pueden influir incluso quemaduras solares durante la infancia y la exposición solar intermitente. Por tanto, se tiene que tener en cuenta la radiación UV acumulada. Otras posibles causas son la existencia de lesiones precursoras y antecedentes familiares [13].

### 2.1.2.3. Formas clínicas

Se puede realizar una clasificación de las distintas variantes de melanomas según la frecuencia, la zona, el crecimiento radial y el vertical. En la Tabla 1 se especifica cada una de ellas [13].

Tabla 1. Tipos principales de melanoma [13].

Tipo	Frecuencia (%)	Zona	Crecimiento radial	Crecimiento vertical
<b>Diseminación superficial</b>	70	Cualquier zona, extremidades inferiores, tronco	De meses a dos años	Tardío
<b>Nodular</b>	15	Cualquier zona, tronco, cabeza, cuello	Ningún crecimiento radial clínicamente perceptible	Inmediato
<b>Melanoma lentígeno</b>	5	Cara, cuello, dorsos de las manos	Años	Muy tardío
<b>Melanoma lentiginoso acral</b>	5-10	Palmas, plantas, debajo de las uñas	De meses a años	Temprano, pero reconocimiento tardío

#### 2.1.2.4. Diagnóstico

El diagnóstico del cáncer cutáneo se realiza teniendo en cuenta cinco signos principales, que se explican en la regla del ABCDE [13].

- **Asimetría de forma:** se tiene en cuenta si ambas partes son simétricas.
- **Bordes:** se estudia si los bordes del melanoma son irregulares o si en cambio están bien definidos.
- **Color:** se considera tanto si la distribución de color es uniforme como las distintas variedades de marrón, negro, azul, rojo y blanco.
- **Diámetro:** cambios en el tamaño, color y forma pueden indicar que la lesión es diferente a otras zonas pigmentadas del cuerpo.
- **Elevación:** se estudia la distorsión de la superficie con la iluminación lateral. El signo más importante dentro del melanoma maligno es el aumento de la medida de la lesión.

La metástasis melanoma (MM) es bastante agresiva por lo que es crucial realizar un diagnóstico correcto lo más pronto posible. Por lo que hace a otras técnicas de diagnóstico, se utilizan a menudo biopsias de incisión y biopsias de aspiración de aguja fina. Además, se combina el diagnóstico fotodinámico (PDD) y terapia fotodinámica (PDT) que utiliza un fotosensibilizador, de forma que si este es excitado mediante una luz de baja longitud de onda se utiliza como diagnóstico no destructivo fluorescente [15].

#### 2.1.2.5. Tratamiento

Los tratamientos para el cáncer cutáneo melanoma son muy variados. Algunos se enfocan en la terapia del melanoma, como la inmunoterapia. Otros se centran en su extirpación. Tal y como ocurre en otros tumores la detección temprana y el tratamiento adecuado son cruciales para conseguir resultados óptimos [16].

Los distintos tratamientos se exponen a continuación:

- **Cirugía:** se pueden realizar distintas incisiones como la completa, la de Mohs, la amputación o la disección del nodo de Lymph. El tipo de cirugía que se aplique dependerá del tamaño del cáncer, la agresividad y el lugar en el que se encuentre situado [17].
- **Inmunoterapia:** gracias a la introducción de nuevas tecnologías los pronósticos del tratamiento de la metástasis del melanoma han incrementado positivamente. A partir del descubrimiento de inhibidores del punto de control inmunitario se prolongó la supervivencia en pacientes con melanoma metastático [18]. La inmunoterapia utiliza la medicina para conseguir que el propio sistema inmune de una persona reconozca y elimine las células cancerígenas de forma eficiente. Por esta razón se utilizan inhibidores del punto de control inmunitario como los PD-1, los CTLA-4, etcétera [17].
- **Fármacos de terapia:** estos fármacos se dirigen a partes concretas de las células del melanoma, a diferencia de fármacos utilizados en quimioterapia que atacan todas las células con crecimiento anormal [17].

- **Quimioterapia:** esta terapia suele ser secundaria, después de otros tratamientos. Se utilizan fármacos que viajan por el torrente sanguíneo y destruyen las células cancerígenas. Esta técnica no resulta tan útil para el tratamiento del melanoma como para el tratamiento de otros tipos de cánceres. La quimioterapia puede causar distintos efectos secundarios como la pérdida de pelo o de apetito, aumento del riesgo de infecciones, etcétera [17].
- **Radioterapia:** se utilizan rayos de alta energía. Aunque no es aplicable a todo tipo de melanoma sí que resulta útil en varias situaciones como después de la cirugía sobre zonas con ganglios eliminados para evitar que el cáncer se vuelva a reproducir [17].
- **Tratamiento mediado por nanopartículas:** varios estudios se centran en la aplicación de nanopartículas en el tratamiento del melanoma cutáneo. Las nanopartículas se biofuncionalizan de forma que contienen un fármaco que permite mejorar el efecto de otras terapias, como por ejemplo la quimioterapia [19]. Se utilizan en otras terapias como la fotodinámica, la fototérmica, en radioterapia e incluso en terapia génica [20].

## 2.2. Nanopartículas

La investigación y utilización de nanopartículas como vía de diagnóstico y tratamiento se ha visto incrementada durante las últimas décadas.

Las nanopartículas tienen que presentar ciertas condiciones de biodegradación, eliminación y toxicidad. El principal objetivo de las nanopartículas con fines terapéuticos es conseguir dirigir un fármaco a la zona de interés, de forma que este se centre en la zona patológica dejando libres tejidos y órganos sanos. Las nanopartículas son utilizadas también en distintas modalidades de imagen no invasiva como el MRI, ultrasonidos, imagen óptica o fotoacústica [21].

A parte de servir como vía para liberar medicamentos en ciertas zonas, las nanopartículas también ejercen la función de biomarcadores. Todo esto es posible gracias a las diferencias entre el tejido sano y el cancerígeno, como la hiperpermeabilidad o la hipervascularización [22].

Además, las nanopartículas son utilizadas en técnicas térmicas debido a que generan calor cuando son irradiadas, lo que provoca la muerte de tumores malignos [23].

### 2.2.1. Nanopartículas de oro

Las nanopartículas adoptan distintas funcionalidades dependiendo de su medida, forma y estado de agregación. En concreto las nanopartículas de oro tienen un alto coeficiente de absorción de rayos X y facilidad de síntesis y manipulación, que permite el control fisicoquímico [23].

Se pueden dividir en tres clases principales:

- **Unidimensionales:** nanotubos o nanocables.
- **Dimensionales:** placas como estrellas, pentágonos o cuadradas.
- **Tridimensionales:** nanodendritas de oro.

### 2.2.1.1. Propiedades y síntesis

Las nanopartículas de oro tienen propiedades que las hacen idóneas para las aplicaciones biomédicas como la biocompatibilidad, la gran relación superficie/volumen que presentan, la baja toxicidad y sus propiedades optoelectrónicas [23].

Las propiedades físicas, como la banda de resonancia de plasmón de superficie (SPR) de las nanopartículas de oro vienen determinadas por sus características morfológicas y fisiológicas [23].

Este tipo de nanopartículas se suelen utilizar en técnicas colorimétricas ya que su medida afecta al color en las de tipo coloidal [23].

Un parámetro importante en distintos tratamientos es el tamaño de las partículas, ya que medidas de entre 20 nm y 60 nm presentan mayor captación, pero producen a su vez unos efectos más tóxicos. En cambio, partículas con tamaños más reducidos (entre 5 nm y 10 nm) se excretan mayoritariamente por los riñones y las vías hepato biliares [24].

Además, otro parámetro a tener en cuenta en técnicas de aplicación de calor mediante un haz de luz es la resonancia de plasmón de superficie. Esta resonancia se ve variada dependiendo de la forma de las nanopartículas. Es importante constatar que en terapias térmicas los diferentes tipos de muerte celular provocan a su vez varias respuestas inmunitarias. En el caso de la aplicación de calor por encima de 47 °C durante 10 minutos se produce necrosis, que implica la muerte celular inmunogénica. Esto confiere potencial inmunogénico, que puede producir la muerte de células cancerosas que no han sido afectadas por la terapia y fomentar el desarrollo de la memoria inmunitaria [24].

Hay distintos métodos para la síntesis de las nanopartículas, entre los se encuentran los métodos químicos, físicos y biológicos. Entre ellos se destaca la irradiación ultravioleta, procesos termolíticos o métodos de reacciones químicas en medios acuosos utilizando agentes reductores [23].

En los métodos químicos las restricciones se realizan en un medio acuoso, utilizando un agente reductor como el citrato y el borohidruro de sodio. Un método ampliamente utilizado es el Turkevich, ya que es simple, fácil de sintetizar, de medida controlable y da estabilidad a las nanopartículas coloidales [23].

### 2.2.1.2. Aplicaciones

La nanomedicina se utiliza principalmente en la detección primeriza del cáncer, así como en su tratamiento. Las características principales que hacen que las nanopartículas sean escalables a aplicaciones biomédicas, tal y como se ha explicado con anterioridad, son la alta proporción superficie/volumen, su fácil síntesis, su estabilidad y la no toxicidad [25].

Entre sus numerosas aplicaciones se destacan las siguientes:

- **Terapia fototérmica:** esta terapia también se conoce como ablación térmica o hipertermia óptica. Se utiliza para el tratamiento de cáncer y es mínimamente invasiva. Se aplica luz sobre las nanopartículas con máxima absorción en la zona visible o cerca de la región de infrarrojo y se genera calor, que causa la muerte de los tumores [24].

Es un tratamiento en desarrollo, donde se pretende incrementar la temperatura de una superficie concreta para eliminar el tejido tumoral discriminando los tejidos sanos [25].

No se suele utilizar como terapia autónoma si no que se utiliza combinada con otras modalidades de tratamiento y reforzada por imágenes médicas. Las nanopartículas de oro utilizadas en esta técnica pueden sensibilizar las células cancerígenas tanto en quimioterapia como en regulación génica e inmunoterapia a través del incremento de la permeabilidad celular e intracelular [26].

- **Imágenes de rayos X:** en esta técnica las nanopartículas son utilizadas como agentes de contraste. Las nanopartículas de oro tienen un alto coeficiente de absorción de rayos X y además, presentan una serie de ventajas como la facilidad de manipulación sintética y la no toxicidad [23].
- **Liberación de medicamentos:** estos tipos de nanopartículas son capaces de transportar diferentes tipos de medicamentos como los péptidos, proteínas y plásmidos de ADN. Las nanopartículas coloidales de oro son muy adecuadas para esta aplicación [23].
- **Sensado:** se utilizan para la detección química y biológica de varios analitos, como iones metálicos, aniones, moléculas, nucleótidos, etcétera... Estos sensores pueden ser colorimétricos, basados en fluorescencia, eléctricos o electroquímicos entre otros [23].

### 2.3. Hipertermia

La hipertermia es un tratamiento que se caracteriza por la aplicación de calor sobre problemas oncológicos. Se suele combinar con otras técnicas como la quimioterapia, inmunoterapia o radioterapia para aumentar su efectividad [27] [28].

Además, dependiendo de la administración, la hipertermia puede ser local, regional o de cuerpo entero. Para temperaturas mayores de 42 °C se produce un colapso de los vasos tumorales que hace que el calor se atrape y provoque la necrosis o apoptosis de estos tejidos [28].

A continuación, se explican brevemente las distintas variantes dentro de la hipertermia, dependiendo de la fuente de calor que se utilice.

- **Hipertermia magnética:** esta variante de la hipertermia utiliza un campo magnético con frecuencia y amplitud adecuadas para conseguir la liberación de calor por parte de mediadores inductivos. Las nanopartículas utilizadas en este caso son magnéticas.
- **Ultrasonidos localizados:** esta técnica realiza una combinación de la hipertermia óptica con ultrasonidos para conseguir la radiosensibilización [29].
- **Hipertermia óptica:** se produce un sobrecalentamiento localizado mediante un elemento láser. En este tipo de tratamiento se tiene que tener en cuenta la SPR, la medida y configuración de las nanopartículas, la longitud de onda y la potencia de irradiación [30].

### 2.3.1. Hipertermia óptica

El tratamiento de hipertermia óptica va ligado a una serie de condiciones. La concentración de nanopartículas en el tumor es determinada y tiene que ser mayor que la de los tejidos sanos que lo envuelven. Además, el nivel de partícula de absorción que es el responsable de la cantidad de calor aplicada intratumoralmente tiene que ser tolerable por los tejidos sanos [31].

Una característica indispensable es que las nanopartículas estén diseñadas de forma que tengan la misma resonancia de plasmón de superficie que la longitud de onda del haz de luz. Así, al aplicar calor estas son excitadas y se produce el calentamiento de la zona [32].

La zona a tratar debe alcanzar una temperatura entre 42 °C y 44 °C para conseguir los efectos de la hipertermia óptica.

Las nanopartículas de oro utilizadas en esta técnica tienen unas características determinadas que se especifican a continuación.

- **Facilidad de síntesis.**
- **Facilidad de modificación de la superficie.**
- **Excelente biocompatibilidad.**
- **Resonancia de plasmón superficial:** cuando se expone una partícula metálica a la luz se produce una oscilación colectiva de electrones libres debido a la oscilación electromagnética del campo de luz. Esto causa una separación de la carga respecto a la red iónica, que forma una oscilación en el dipolo a lo largo de la dirección del campo eléctrico de la luz. La SPR corresponde con la amplitud máxima de la oscilación a una frecuencia determinada. Esta se puede medir con un espectrómetro de absorción. La intensidad de esta depende del metal, medida de la partícula, estructura, composición, etcétera [32].

### 2.3.2. Hipertermia óptica en COMSOL

El principal objetivo de los distintos estudios analizados para comprender la simulación del comportamiento del tejido biológico frente al aumento de temperatura localizado es determinar qué parámetros son los más idóneos para conseguir la muerte celular minimizando los daños producidos en tejidos adyacentes. De esta forma se pueden escoger correctamente los parámetros y predecir el resultado de estos experimentos.

El parámetro principal en este tipo de técnicas es la temperatura.

Un aspecto importante a tener en cuenta en los estudios fototérmicos es que la energía radiante se comporta de cuatro formas diferentes en los tejidos biológicos. Una parte de esta energía es reflejada por la superficie, sin causar ningún efecto en el tejido. Otra porción de luz se puede transmitir, pero de forma atenuada y otra parte de la energía puede ser absorbida por un componente del tejido y a partir de este, ser transferido al tejido. Finalmente, la luz restante puede penetrar en el tejido sin causar un efecto significativo [33].

En el estudio realizado por Kawthar Shurrab et al., se desarrolla un modelo matemático que permite estudiar la distribución de luz y comprobar qué parámetros son los más efectivos para el tratamiento mediante hipertermia óptica. Además de determinar el tiempo y potencia óptimos del

láser para el tratamiento en tejido biológico, se puede saber el efecto sobre el tejido adyacente para prevenir posibles efectos adversos por exceso de calor. Se utiliza el software COMSOL para simular la difusión de la luz y aplicar la ecuación de biocalor sobre tejido animal. Este estudio tiene como punto común con la investigación que se quiere realizar en el presente trabajo de Fin de Máster que estudia el efecto tanto de la potencia del láser como de los tiempos de irradiación [33].

En algunos estudios como el realizado por Nikolaos M. Dimitriou et al., se estudia mediante simulaciones la correlación existente entre la aplicación de hipertermia mediada por nanopartículas de oro y las predicciones de control de tumores tras el tratamiento, como la reducción del tumor o la muerte celular. En este tipo de estudios también se tienen en cuenta otras variables como el tamaño, estructura y forma de las nanopartículas. El espectro de absorción de estas puede ser modificado para cumplir los requisitos de distintas aplicaciones. Además, se investiga el efecto del tamaño, forma y estructura de las nanopartículas sobre la eficiencia de absorción en el espectro óptico. Además, se calcula la sección transversal de absorción en nanopartículas esféricas y nanocapas mediante la teoría de Mie. Por otro lado, se presenta la respuesta tumoral durante un tratamiento de hipertermia óptica mediado por nanopartículas de oro [24].

En la investigación realizada por Ameneh Sazgarnia et al., se estudia la transferencia de calor teniendo en cuenta la perfusión sanguínea. La irradiación del láser es pulsada y tiene una duración de milisegundos. Para el estudio se diseña un tumor con tejido circundante. El tumor se irradia con distintos pulsos de láser, duraciones y fluencias. El desarrollo de este modelo completo se debe estimar dependiendo de la vascularización real de la zona que contiene el tumor. En este caso concreto se trata el cáncer de próstata y se utilizan nanoceldas [34].

Para realizar un estudio completo del efecto de la irradiación se utiliza la ecuación de biocalor de Pennes que permite añadir los efectos de la perfusión sanguínea. Esta ecuación también incorpora la expresión de la energía del láser. Dependiendo del tipo de nanopartículas y tratamiento se pueden obtener valores distintos de los coeficientes de absorción y dispersión [34].

Por lo que hace al volumen de la simulación, se estudia el comportamiento sobre un cilindro que contiene una zona tumoral. Mediante el programa COMSOL se resuelven las ecuaciones de biocalor. En este estudio en concreto se investiga el efecto de cambiar la longitud de onda sobre la eficiencia de absorción [34].

En el estudio realizado por Kawther Mohammad et al., se estudia el comportamiento térmico tras aplicar calor sobre un cubo que contiene un tumor de 1 cm de diámetro. En este caso el haz láser se mueve aumentando la superficie de aplicación. Además, se aplica la ecuación de biocalor teniendo en cuenta los parámetros característicos del tejido en cuestión, como la densidad, el calor específico o la conductividad térmica. También se calcula el ratio de absorción [35].

Entre los resultados se concluye que al aumentar el diámetro de aplicación de calor también se aumenta la temperatura. La parte innovadora de este estudio es que aparte de tener en cuenta la potencia del láser y el tiempo de irradiación también considera el aumento de la superficie de aplicación del láser [35].

Finalmente, el estudio llevado a cabo por Behnaz Gheflati y Nadia Naghavi realiza una simulación completa de un tejido biológico humano y estudia la respuesta térmica ante la aplicación

de hipertermia en presencia de nanopartículas, aplicando la bioecuación de Pennes y la ley de Beer-Lambert, tal y como se va a realizar en el presente Trabajo de Fin de Máster [36].

### 2.3.3. Hipertermia óptica en entorno celular

Es importante conocer qué tipo de muerte celular provocan los tratamientos fototérmicos. La muerte celular puede ser inducida, como en el caso de la hipertermia óptica, causando la apoptosis celular. La apoptosis es un proceso interno que causa la activación de las proteínas caspasas. Se caracteriza morfológicamente por la contracción citoplásmica, la condensación de cromatina, la fragmentación del ADN y la formación de cuerpos apoptóticos. La apoptosis preserva la integridad de la membrana plasmática [37].

Algunas veces las células apoptóticas pueden ser inmunogénicas, pero a pesar de ello, las consecuencias son diferentes a las de la necrosis. La fagocitosis de cuerpos apoptóticos puede activar la inmunidad antitumoral a partir del cebado cruzado de células T. La apoptosis se divide en dos vías principales dependiendo del estímulo que la inició: la vía extrínseca y la intrínseca [37].

La temperatura necesaria para provocar la apoptosis celular se encuentra comprendida entre 42 °C y 47 °C, menor que la que produce necrosis, que es hasta 55 °C.

Alguno de los parámetros más importante en este tipo de terapias son la potencia del haz de luz y la localización de las nanopartículas. Para producir daño celular por alteración de la membrana se requiere menos energía en las nanopartículas unidas a ella que en las nanopartículas internalizadas [37].

En los ensayos experimentales de hipertermia óptica para lograr la apoptosis celular se siguen los procedimientos explicados a continuación.

En el estudio realizado por Tamara Fernández et al., se comprueba el efecto de aplicar un láser de onda continua sobre células de glioblastoma en la presencia de nanorods. En primer lugar, se cultivan las células de astrocitoma del cerebro humano, en medio de cultivo suplementado. Los nanotubos se centrifugan y se resuspenden en un medio de cultivo modificado. Las células incubadas son sometidas a irradiación láser con y sin presencia de nanopartículas. Después del tratamiento de hipertermia se limpian los cultivos celulares para eliminar las nanopartículas y se cultivan durante 4 horas bajo condiciones normales [38].

Para los ensayos de toxicidad se suspenden concentraciones crecientes de nanopartículas durante 12 y 24 horas. La viabilidad celular es medida utilizando un ensayo de MTT [38].

Las pruebas de hipertermia se realizan en presencia y ausencia de nanopartículas, para un tiempo de irradiación de 20 minutos. La viabilidad celular en este caso es medida mediante un ensayo de tinción dual de alceína y yoduro de propidio [38].

Estos procedimientos permiten conocer tanto la toxicidad de las nanopartículas como la viabilidad celular tras la aplicación de hipertermia óptica [38].

## CAPÍTULO 3: Objetivos

Teniendo en cuenta las necesidades analizadas en apartados anteriores el objetivo principal del presente Trabajo de Fin de Máster es desarrollar un modelo computacional y una simulación de la respuesta térmica del tejido cutáneo ante la aplicación de radiación láser infrarroja para producir hipertermia óptica. Para poder desarrollar este objetivo se tiene que comprobar a su vez el funcionamiento de un equipo de hipertermia óptica, previamente diseñado e implementado, y la toxicidad de las nanopartículas utilizadas, que limitará la concentración aplicada en la simulación. La motivación es conseguir obtener los parámetros que permitan utilizar el equipo en un escenario de aplicación real. Además, se pretende estudiar el efecto de aplicar este tipo de tratamiento sobre dos líneas celulares distintas. El objetivo es por tanto conocer qué parámetros se tienen que utilizar para optimizar el funcionamiento del equipo.

Por tanto, se pretende:

- Diseñar las pruebas experimentales necesarias para lograr conocer los parámetros de interés.
- Verificar el funcionamiento del equipo de hipertermia óptica mediante pruebas experimentales sobre cultivos celulares.
- Estudiar la toxicidad de la síntesis de nanopartículas sobre cultivos celulares HeLa y Sk-mel.
- Desarrollar un software utilizando el entorno Comsol Multiphysics para simular la respuesta térmica del tejido cutáneo ante la aplicación de hipertermia óptica.
- Diseñar un modelo de cáncer cutáneo que permita realizar las distintas pruebas computacionales.
- Optimizar los parámetros de aplicación de hipertermia para lograr eliminar la zona tumoral sin interferir en la zona sana.

## CAPÍTULO 4: Metodología

### 4.1. Diseño experimental

Se va a estudiar el efecto de aplicar hipertermia óptica mediada por nanopartículas de oro sobre dos tipos distintos de líneas celulares, células HeLa, de cáncer de cérvix y las células Sk-mel, de melanoma.

Las primeras se utilizan porque presentan un crecimiento rápido y por tanto, facilitan la realización de los experimentos. Las células de melanoma se emplean para comprobar la eficacia sobre el tipo celular objetivo y estudiar el efecto de la aplicación de hipertermia óptica sobre cáncer cutáneo.

Para poder realizar este tipo de tratamiento se tienen que ajustar tres parámetros principales: la concentración de nanopartículas a administrar, la potencia y el tiempo de irradiación.

En primer lugar, se van a preparar los cultivos celulares para poder realizar las distintas pruebas. Se sigue un proceso de cultivo paralelo en las dos líneas celulares.

En segundo lugar, se va a comprobar la citotoxicidad de las nanopartículas. La toxicidad es el grado de mortalidad celular asociado únicamente a la presencia de nanopartículas en el cultivo celular. Para ello se tratan las dos líneas celulares con distintos valores de concentración de nanopartículas y se mide su viabilidad pasadas 24 horas.

Una vez seleccionado el rango de concentraciones óptimo para cada línea celular se estudia el efecto de producir hipertermia óptica administrando tres tipos de concentraciones no tóxicas de nanopartículas durante tres tiempos de irradiación diferentes.

#### 4.1.1. Materiales

Para la realización de las pruebas experimentales se han utilizado los materiales que se exponen a continuación.

- **NANOESTRELLAS DE ORO**

Las nanoestrellas han sido caracterizadas previamente en distintos estudios como el de Andy Hernández et al., para la verificación de una máquina de infrarrojo cercano (NIR) [2] [3] .

En el estudio realizado por Roberto Montes-Robes et al., se sintetizan las nanoestrellas mediante un método de crecimiento con semilla. Se utiliza polivinilopirrolidona (PVP) y N-dimetilformamida (DMF) y sobre ellos se realizan algunas modificaciones [1].

Se diluyen 50  $\mu\text{L}$  de solución acuosa de características 166 mM de ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) con 15 mL de solución 20 mM de PVP en DMF a 25 °C. Pasados 5 minutos se diluyen a su vez 10  $\mu\text{L}$  de una dispersión de semillas 6.5 mM, conformada por nanoesferas de oro de 15 nm recubiertas con PVP en etanol. Después de 12 horas, se obtienen las nanoestrellas de oro centrifugando la mezcla a 9500 rpm durante 20 minutos. Combinando dispersión y centrifugación las nanoestrellas se lavan cinco veces para ser utilizadas en el experimento. Las nanoestrellas tienen un tamaño de 40 nm de núcleo con ramas afiladas de 25 nm [1].

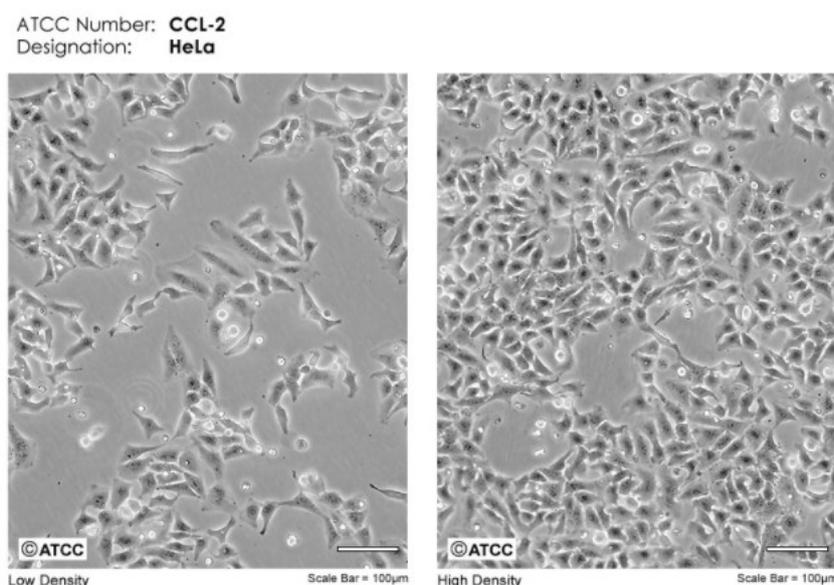
La SPR de estas nanopartículas se presenta en dos bandas. En primer lugar, la resonancia de plasmón superficial localizada (LSPR) de los electrones del núcleo se sitúa en 560 nm mientras que la resonancia de plasmón de superficie localiza de los electrones en punta se encuentra en 796 nm [1].

En las pruebas experimentales previas realizadas en el estudio de Roberto Montes-Robles et al, se utilizaba un volumen de 250  $\mu\text{L}$  de la suspensión de nanopartículas con una concentración de 188  $\mu\text{L}/\text{mL}$  para la verificación de un aparato de hipertermia óptica similar [1].

- **CÉLULAS HELA**

Las células HeLa utilizadas para las distintas pruebas experimentales proceden del organismo humano, en concreto del cuello del útero. Son células de tipo epitelial de un adenocarcinoma. Pertenecen a una mujer de 31 años de edad de etnia negra [39].

Se encuentran congeladas en una fase de vapor de nitrógeno líquido. Por lo que hace al cariotipo de esta línea celular, se presenta un pequeño cromosoma telocéntrico en el 98% de las células. Se describen 4 cromosomas típicos de los marcadores HeLa. En la Figura 1 se observa un cultivo de células HeLa [39].



*Figura 1. Cultivo celular HeLa [39].*

- **CÉLULAS SK-MEL**

Las células de melanoma utilizadas proceden de la piel, en concreto de la metástasis de un melanoma maligno en el muslo. La morfología de estas células es poligonal y las células se encuentran adheridas. Proviene de un hombre de 60 años de etnia caucásica, de grupo sanguíneo A. Las células están en una fase de vapor de nitrógeno líquido [40].

El medio que se utiliza para esta línea celular es el Medio Esencial mínimo de Eagle (DMEM) formulado por ATCC. El medio se suplementa con suero fetal bovino y con penicilina-estreptomicina a una concentración final del 10% y de 10 mM, respectivamente [40].

- EQUIPO DE HIPERTERMIA ÓPTICA

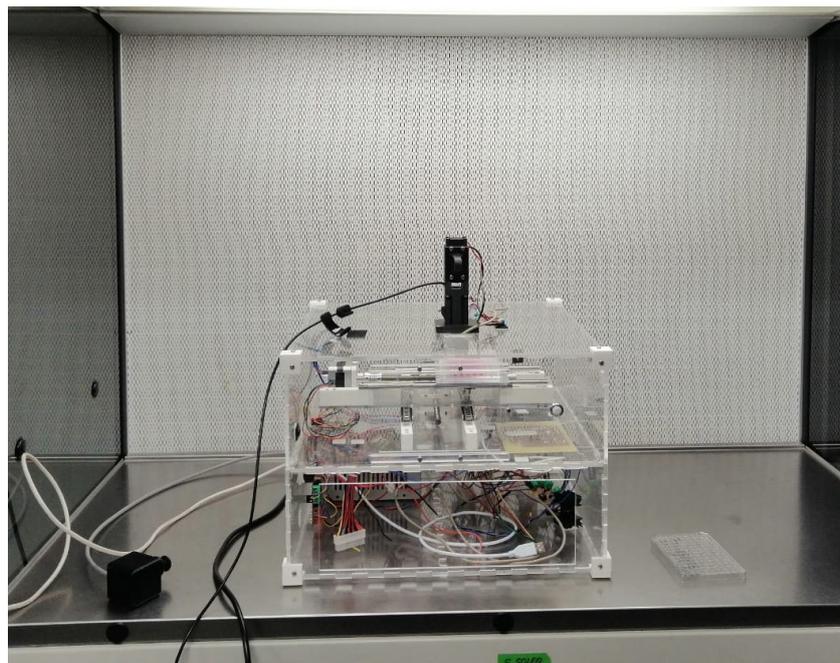
El equipo de hipertermia utilizado para la realización de las distintas pruebas está previamente diseñado e implementado.

Para conseguir eliminar células tumorales es necesario aumentar la temperatura de la zona afectada a una comprendida 42 °C y 43 °C. La máquina incorpora dos diodos láseres que permiten aplicar potencias de hasta 4 W/cm<sup>2</sup>. El usuario puede escoger la densidad de potencia que emite sobre la superficie. Además, el mismo encapsulado incorpora un fotodiodo que detecta la radiación emitida por este [4].

El sistema integra un elemento posicionador que permite seleccionar las coordenadas de la placa ELISA para focalizar la temperatura. Por otra parte, se pueden ajustar los tiempos de experimento, la densidad de potencia irradiada y la modulación del ancho de pulso del láser e incluso se puede activar una alarma para finalizar el experimento. Se selecciona la temperatura ambiente y la del diodo láser para empezar el experimento [4].

Los elementos de soporte son una cámara visible que permite obtener 30 fotogramas por segundo y una cámara termográfica que detecta un rango de temperatura de 0 a 80 °C.

El equipo de hipertermia óptica es el que se muestra en la Figura 2.



*Figura 2. Equipo de hipertermia óptica.*

El software utilizado almacena a su vez las temperaturas obtenidas a lo largo del experimento y permite ajustar los parámetros citados con anterioridad.

En la Figura 3 se observa la interfaz gráfica del software. Se pueden seleccionar los pocillos que van a ser irradiados, así como el tiempo de irradiación. A su vez, se indica la temperatura alcanzada en cada experimento y se almacena en un archivo de texto. El software incluye un pulsador de parada de emergencia para detener la irradiación en caso de ser necesario.

## Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

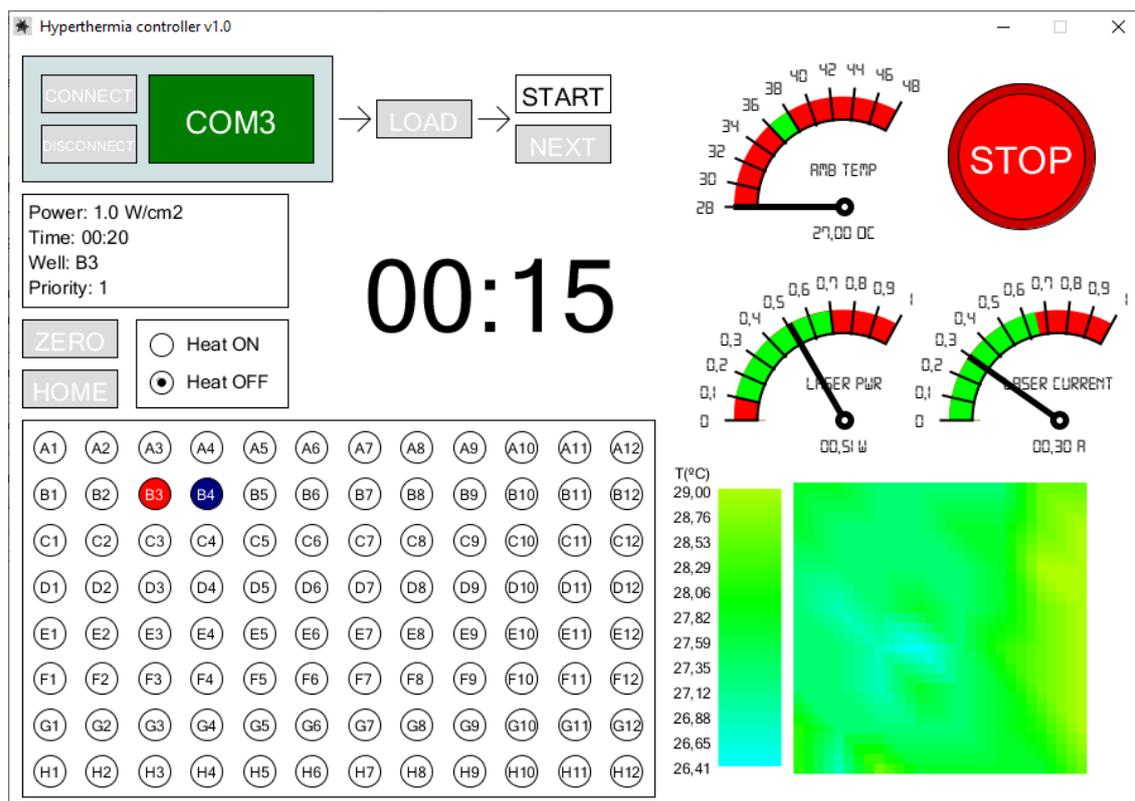


Figura 3. Interfaz gráfica del software de hipertermia.

### 4.1.2. Métodos

#### 4.1.2.1. Cultivo celular

El cultivo celular se realiza de forma similar para ambas líneas celulares.

Por un lado, las células HeLa se cultivan en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y penicilina-estreptomicina (10 mM), para completar el medio de crecimiento [41].

Inicialmente las células están congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se centrifugan, y el pellet obtenido se resuspende en medio celular fresco y se almacena en un flask de cultivo estéril. Para realizar los pases de células semanales, se absorbe el medio celular del flask y se limpia la placa utilizando tampón fosfato estéril. Este paso se realiza para eliminar el suero restante que está formado por un inhibidor de tripsina. A continuación, se añade al flask 1 ml de disolución de Tripsina al 0.25% con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.53 mM y se incuban las células durante 5 minutos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  en atmósfera con 5% de  $\text{CO}_2$  [39].

Después se suspenden las células añadiendo 10 mL aproximadamente de medio de cultivo. Con la finalidad de eliminar la tripsina de la disolución final, se centrifuga la muestra a 800 rpm durante 5 minutos y se resuspende el pellet en medio de cultivo fresco. La concentración de la disolución final se determina utilizando una cámara de Neubauer. Para ello se mezclan 20  $\mu\text{L}$  del cultivo celular con 20  $\mu\text{L}$  de Tripán Blue, para que las células vivas adquieran un color azulado.

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

En la Figura 4 se muestra la cámara de Neubauer utilizada en el método de conteo celular.

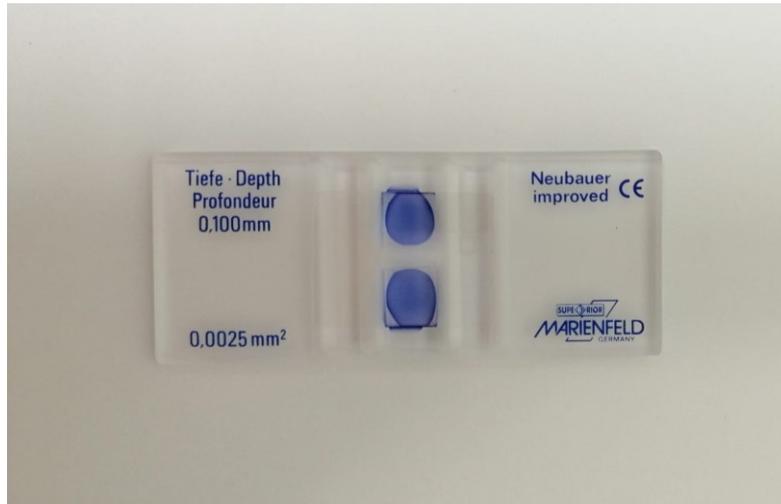


Figura 4. Cuento celular utilizando una cámara de Neubauer.

Mediante un microscopio NICLON eclipse T5100 se cuentan las células vivas de cada cuadrante tal y como se muestra en la Figura 5. Se realiza la media siguiendo la Ecuación 1, donde  $C_i$  representa cada cuadrante de la cámara de Neubauer.

$$\text{n}^\circ \text{ de células medio} = \frac{C_1 + C_2 + C_3 + C_4 + C_5}{5} \quad (1)$$

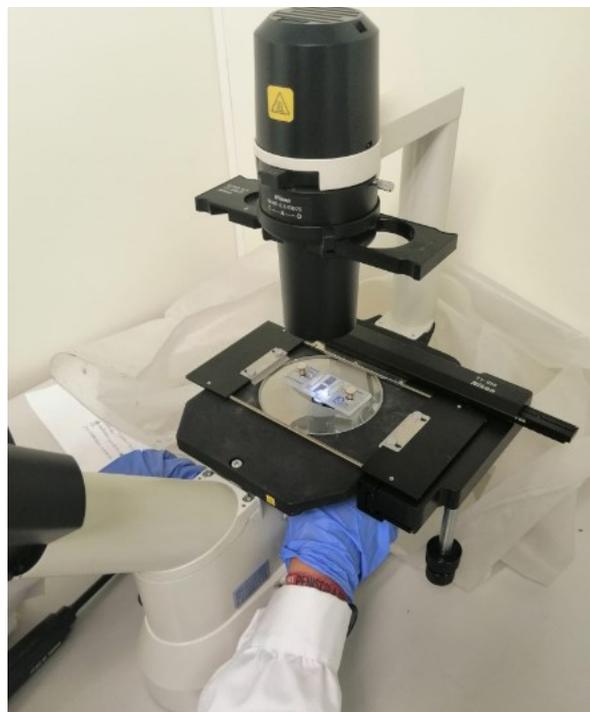


Figura 5. Medida de la actividad celular mediante un microscopio.

Por protocolo, en una placa de 96 pocillos se cultivan alrededor de 2000 células HeLa por pocillo y en cada uno se utilizan 100  $\mu\text{L}$  de volumen.

En este ejemplo, el stock del que partimos es de 456000 células/mL y se quiere preparar un falcon con 10 mL de células a una concentración de 20000 células/mL, para sembrar 100  $\mu$ l en cada pocillo de la multiplaca y así tener 2000 células en cada pocillo.

Mediante la Ecuación 2 se calcula el volumen necesario a tomar de la disolución inicial para diluir hasta un volumen final de 10 mL.

$$456000 \cdot \text{volumen} = 20000 \frac{\text{células}}{\text{mL}} \cdot 10\text{mL} \quad (2)$$

El volumen final es de 500  $\mu$ L.

De este modo, se toman 500  $\mu$ L de la suspensión inicial de células y se diluyen hasta 10 mL añadiendo 9.5 mL de medio de cultivo.

A continuación, se rellenan los pocillos con un 100  $\mu$ L de disolución, completando los adyacentes con PBS para evitar que se evaporen.

Las placas se dejan incubar durante 24 horas a 37 °C. Se repite este proceso para cada una de las pruebas.

El procedimiento seguido para cultivar las células de melanoma es idéntico al explicado, pero las células de melanoma se reproducen de forma más lenta que las de HeLa. Es por ello que antes de hacer los experimentos se necesitan más días para llegar a tener suficiente densidad celular.

#### 4.1.2.2. Ensayos de citotoxicidad

Se realiza un ensayo de citotoxicidad para comprobar qué concentración de nanopartículas influye notablemente en la actividad mitocondrial celular.

Para ello se estudia qué efecto tiene sobre los dos tipos celulares aplicar distintas concentraciones de nanoestrellas.

En primer lugar, se mide la banda de absorción en el espectro de las nanopartículas utilizando un espectrofotómetro, tomando como referencia agua. Esta banda de absorción es característica de las nanoestrellas por estar conformadas de oro.

La intensidad de la banda de absorción es proporcional a la concentración de las nanoestrellas. En la Figura 6 se puede observar que existen dos bandas de plasmón superficial en 720 nm y 800 nm.

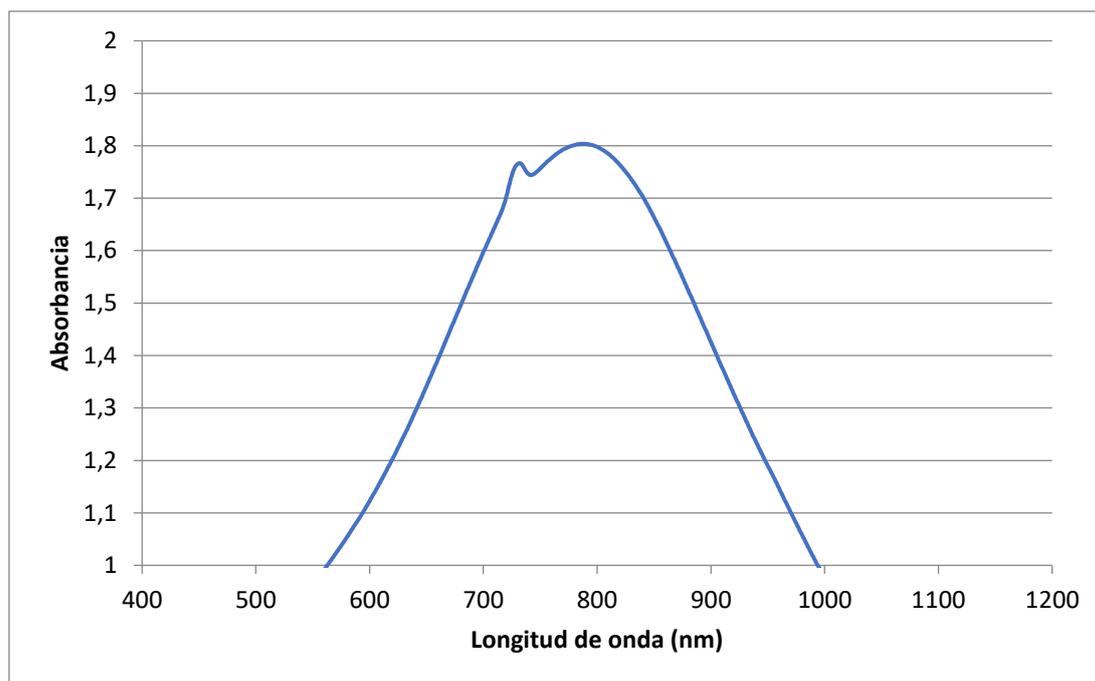


Figura 6. Espectro de las nanopartículas de oro.

Para realizar las pruebas de citotoxicidad se esterilizan las nanopartículas irradiándolas con luz ultravioleta durante 20 minutos. A continuación, se prepara una dilución de nanopartículas con una concentración final 2.7 mM.

Se parte de una disolución de 1 mL de nanoestrellas en agua estéril. Se realizan dos lavados previos: se centrifuga a 9500 rpm durante 2 minutos y el pellet se resuspende en 1 mL de agua estéril. La nueva solución se sonica y se repite el proceso.

Una vez preparada la suspensión de las nanoestrellas y las placas con el cultivo celular, se trata con las distintas concentraciones de nanopartículas durante media hora. Después, se realiza un lavado con PBS y se incuban con DMEM limpio. El ensayo para la cuantificación espectrofotométrica no radioactiva de la proliferación y viabilidad celular se realiza 24 horas después de la exposición a las nanopartículas.

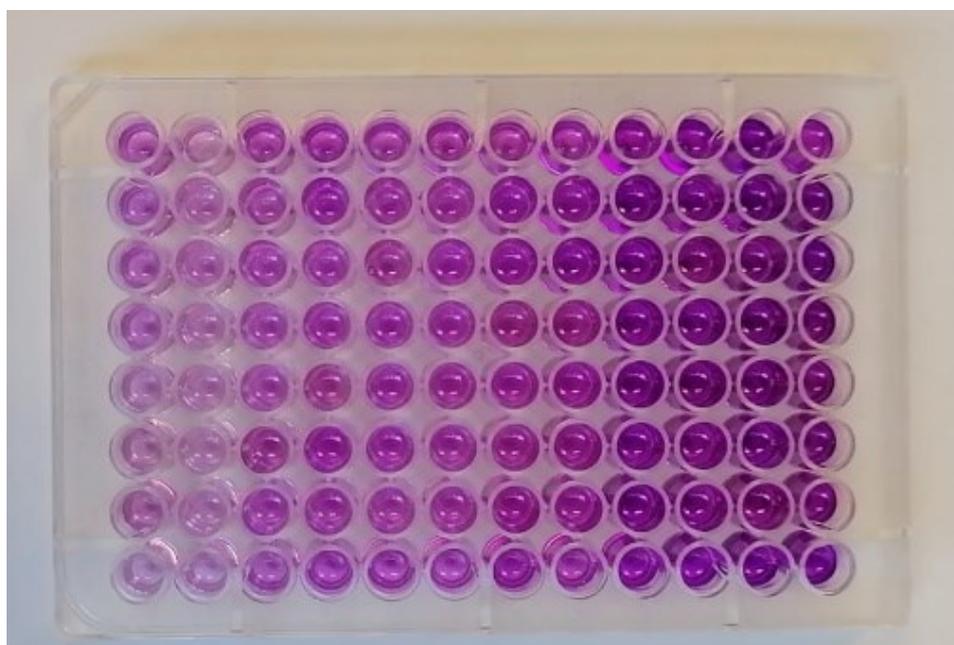
A partir de la escisión de MTT en medio celular se estudia el número de células viables. Esta formación se escinde por las enzimas del retículo endoplasmático, y la reducción se realiza únicamente en las células vivas. Se relaciona con la producción de NAD(P)H mediante la glucólisis. El número de células metabólicamente activas será directamente proporcional al colorante de formazán formado [42].

Se ha escogido este tipo de método de medición por ser seguro y fácil de llevar a cabo. Tiene la capacidad de cuantificar la absorbancia que se correlaciona directamente con el número de células vivas. Además, proporciona una sensibilidad muy elevada y es un proceso rápido.

Para llevar a cabo la medida se tiene que mezclar el MTT con un reactivo de acoplamiento de electrones y se solubiliza en un paso adicional. Se añade esta solución en las microplacas de pocillos y se incuban durante 1 hora. Se forma un tinte de formazán insoluble en agua que permite cuantificar el número de células viables mediante un espectrofotómetro de barrido de múltiples pocillos, que

mide la absorbancia. Este procedimiento se cumple debido a que este tipo de sales se escinden en formazán por el sistema succinatotetrazolioductasa. Este sistema forma parte de la cadena respiratoria de las mitocondrias y por tanto, solo se va a presentar en aquellas células metabólicamente activas.

Pasadas 24 horas del tratamiento con nanopartículas, se elimina el medio de cultivo de los pocillos y se añade en cada uno de ellos 100  $\mu$ l de una disolución 0.1 mg/mL de MTT en DMEM. Se incuban las placas a 37 °C durante 1 hora aproximadamente. Pasado este tiempo, se elimina el medio y se disuelve la sal formada en cada pocillo añadiendo 120  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO). Este tipo de disolución provoca además un efecto óptico, que se puede observar en la Figura 7. Los pocillos están completados con concentraciones ascendientes de izquierda a derecha, y por este motivo las primeras columnas tienen un color más claro que las últimas. Se mide la absorbancia en un lector de placas a 570 nm.



*Figura 7. Cuantificación de la actividad celular mediante ensayo de MTT.*

#### 4.1.2.3. Ensayos de hipertermia óptica

Los ensayos de hipertermia se realizan tomando como variables el tiempo de irradiación y la concentración para una potencia fija.

Cada prueba se realiza por triplicado y se aplican concentraciones comprendidas entre 10  $\mu$ g/mL y 100  $\mu$ g/mL, y tiempos entre 5 y 15 minutos.

Se coloca la placa ELISA con las células y nanoestrellas en la máquina de hipertermia óptica y se ajusta utilizando la interfaz gráfica para que se irradien unos pocillos concretos. Cada placa puede ser irradiada un máximo de 30 minutos para evitar que las células mueran por las condiciones ambientales. La temperatura interna de la máquina se debe mantener a 37 °C.

Una vez se ha irradiado cada placa, se cambia el medio de los pocillos utilizados, lavándolos previamente con PBS y a continuación se añade el medio enriquecido para mantener los nutrientes, tal y como se hace en los ensayos de toxicidad.

Una vez pasadas las 24 horas de incubación se realiza el ensayo de MTT para medir la actividad mitocondrial celular, de forma análoga a la explicada con anterioridad.

## 4.2. Desarrollo computacional

Se va a implementar un modelo de simulación para planificar tratamientos de cáncer cutáneo. Para ello se van a establecer los parámetros más importantes como la potencia y superficie de aplicación, la concentración de nanopartículas administrada y el tiempo de irradiación. Se quiere conocer qué valores de estos parámetros son los más idóneos para el tratamiento de este tipo de cáncer.

### 4.2.1. Entorno COMSOL

El software utilizado para el desarrollo computacional es Comsol Multiphysics.

Este permite aplicar sobre un modelo físico ecuaciones diferenciales parciales como la transferencia de biocalor.

En este entorno se pueden crear superficies y volúmenes de distintos materiales y estudiar varios efectos sobre ellos y en este caso se va a estudiar la transferencia de calor.

Se ha escogido este tipo de software ya que permite implementar la bioecuación de Pennes, necesaria para el desarrollo computacional.

Además, es posible escoger las características térmicas y adaptarlas a los diferentes tejidos de estudio, así como tener en cuenta la perfusión sanguínea, elemento indispensable, pues la vascularización en tejidos cancerígenos es diferente que la que presentan los tejidos sanos.

Se puede simular una fuente de calor y personalizar los parámetros de aplicación para estudiar el efecto térmico mediante tablas, imágenes y recolecciones de datos.

Esta herramienta es muy útil a la hora de predecir el comportamiento de tratamientos hipertérmicos para poder saber qué parámetros permiten maximizar los efectos terapéuticos y cuáles son los idóneos para minimizar los efectos adversos.

También se ha utilizado el entorno de trabajo Matlab para la selección de datos obtenidos durante el desarrollo computacional y su representación.

### 4.2.2. Principio matemático

En 1948 Harry H. Pennes demostró por primera vez la relación existente entre la presión arterial y la temperatura de los tejidos [43]. El estudio realizado por Pennes se basó en medir la distribución de temperatura en el antebrazo de 9 sujetos mediante termopares para demostrar la teoría de flujo de calor teniendo en cuenta la tasa local de producción de calor tisular y el flujo sanguíneo volumétrico [44].

A partir de la ecuación de Pennes han surgido variantes para el cálculo de otros parámetros y la característica que más ha favorecido su utilización es que el balance energético térmico microscópico para el tejido se plantea de forma lineal [45].

Esta ecuación modela matemáticamente la interacción térmica entre la vascularización y el tejido, siendo de especial interés en zonas con diferente nivel de vascularización. Harry H. Pennes describió en primer lugar una ecuación que explicaba el efecto del flujo sanguíneo sobre la temperatura de los tejidos de forma continua [46].

En la Ecuación 3 se muestra la representación matemática de biocalor.

$$\rho c \frac{\partial T}{\partial t} = \nabla(k \nabla T) + w_b c_b (T_a - T) + Q_m' \quad (3)$$

El parámetro  $\rho$  es la densidad ( $\text{Kg}/\text{m}^3$ ),  $c$  el calor específico ( $\text{J}/(\text{Kg}\cdot\text{K})$ ),  $k$  es la conductividad térmica del tejido ( $\text{W}/(\text{m}\cdot\text{K})$ ) y  $w_b$  y  $c_b$  son los parámetros del flujo sanguíneo, siendo el primero el ratio de flujo de sangre por unidad de volumen del tejido expresado en ( $\text{Kg}/(\text{s}\cdot\text{m}^3)$ ) y el segundo el calor específico de la sangre.  $Q_m$  es el calor metabólico generado por unidad de volumen ( $\text{W}/\text{m}^3$ ),  $T_a$  la temperatura arterial de la sangre en  $k$ , y  $T$  es el incremento de temperatura por encima de la temperatura ambiental. El diferencial de temperatura es el ratio de incremento de temperatura [45].

El término  $w_b c_b (T_a - T)$  corresponde con la perfusión sanguínea y fue ajustado de forma que las temperaturas previstas tuvieran un valor suficientemente aproximado a las medidas experimentales [45].

En el caso de aplicar hipertermia óptica la Ecuación 3 se tiene que complementar con el valor de la energía externa aplicada por el haz láser, dando como resultado la Ecuación 4 [36].

$$\rho c \frac{\partial T}{\partial t} = \nabla(k \nabla T) + w_b c_b (T_a - T) + Q_m' + Q_{laser} \quad (4)$$

El intercambio de energía entre los vasos y el tejido se realiza mayoritariamente mediante la pared de los capilares, que tienen una velocidad sanguínea muy baja. Su teoría se basa en que el intercambio de energía total debido al flujo sanguíneo se puede modelar como una fuente de calor que es no direccional. Esta fuente de calor tiene una magnitud proporcional al flujo sanguíneo volumétrico y a la diferencia entre la temperatura del tejido local y las temperaturas arteriales principales que suministran dicho flujo [45].

Otro término importante de esta teoría es el correspondiente a las condiciones de contorno, expresadas en la Ecuación 5.

$$-\frac{k \partial T}{\partial n} = h(T_{out} - T) \quad (5)$$

Los parámetros  $h$  y  $T_{out}$  son respectivamente el coeficiente de transferencia de calor y la temperatura ambiental. Se asume que la sangre entra en una zona del tejido con la temperatura central del cuerpo y adquiere la temperatura del tejido, y corresponde con el mecanismo de convección [45].

Por lo que hace a la presencia de nanopartículas en el tejido cutáneo, se utilizan en terapias térmicas porque actúan como pequeñas fuentes de energía térmica, alcanzan una alta absorción y mantienen coeficientes de dispersión bajos. Como este coeficiente de absorción es muy elevado, se puede considerar que un medio con nanopartículas se encuentra dominado por la absorción. Cuando un haz de luz infrarroja incide sobre la superficie cutánea, la radiación incidente se absorbe antes de que su propagación se vea afectada por la dispersión [46].

Este comportamiento es descrito por la ley de Beer-Lambert-Bouguer, y se muestra en la Ecuación 6 [46].

$$I_z(\lambda) = I_o(\lambda) \exp -(\mu_a + \mu_s)Z \quad (6)$$

Los parámetros de la ecuación son la intensidad espectral de la radiación ( $I_o$ ), la intensidad espectral atenuada ( $I_z$ ) por una capa de espesor  $\Delta z$ , el coeficiente de absorción ( $\mu_a$ ), el coeficiente de dispersión ( $\mu_s$ ) y la profundidad ( $Z$ ) [46].

#### 4.2.3. Modelo y características

El desarrollo computacional se basa en la simulación de una porción de piel que contiene tejido sano y tejido tumoral. Una vez caracterizada la zona a tratar, se va a simular la aplicación de hipertermia óptica.

Para la simulación de este tipo de tratamiento se tiene que tener en cuenta el plan de dosimetría que se va a administrar, la descripción geométrica del modelo y el tipo de distribución de calor que se va a modelar. Además, se tienen que establecer las características del tejido, así como un mallado para el cálculo de la distribución temporal de la temperatura [47].

Se van a implementar cuatro modelos, con distintos parámetros de irradiación. En los modelos se varía la concentración de nanopartículas, la potencia, el radio de aplicación y el tiempo de irradiación.

La geometría para la aplicación de irradiación sobre piel es la mostrada en la Figura 8. Se observa que el volumen se encuentra dividido en dos partes. La zona central es la zona cancerígena. El volumen adyacente representa la zona sana.

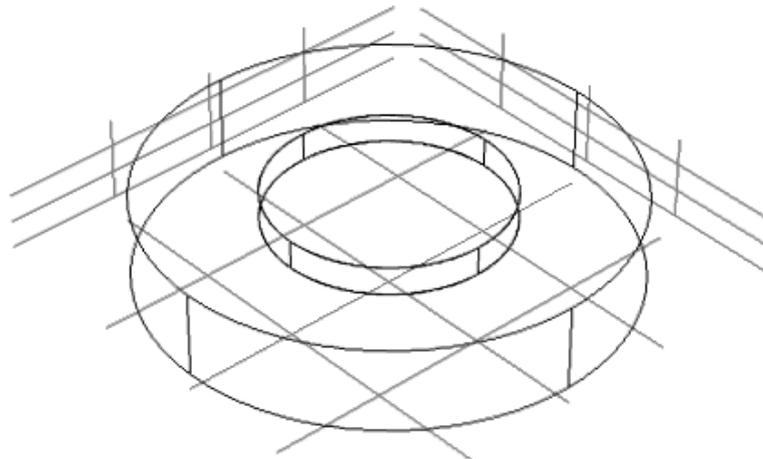


Figura 8. Volumen de aplicación de hipertermia óptica.

En la Figura 9 se representa la sección transversal de la mitad del volumen.

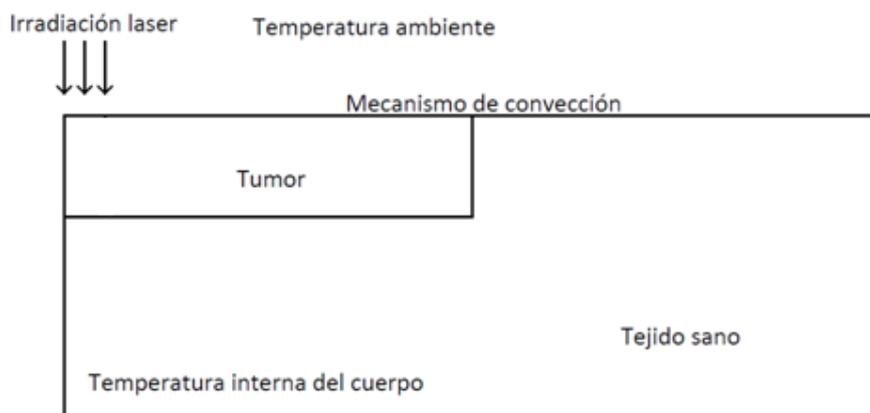


Figura 9. Sección transversal del volumen de estudio.

Los parámetros característicos de la geometría se encuentran recogidos en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros del modelo de simulación.

Nombre	Valor (mm)	Descripción
R1	40	Radio del volumen total
R2	20	Radio del volumen tumoral
H1	15	Profundidad total del volumen
H2	5	Profundidad tejido cancerígeno

Este software permite conferir a cada elemento el tipo de material que más se adapte a sus características. Por ello, todos los volúmenes están formados por piel, pero se han variado los parámetros según la Tabla 3 para caracterizar la zona cancerígena y la sana.

Tabla 3. Características térmicas de los distintos tejidos del volumen de simulación [36].

Parámetro	Tejido sano	Tejido tumor
Densidad $\rho$ (kg/m <sup>3</sup> )	1000	1100
Calor específico C (J/kg·K)	4200	4200
Conductividad térmica k (W/mK)	0.5	0.55
Perfusión sanguínea $w_b$ (s <sup>-1</sup> )	$1 \cdot 10^{-3}$	$9.1 \cdot 10^{-4}$

El flujo sanguíneo se añade aplicando la herramienta “Transferencia de biocalor” y permite caracterizar los valores recogidos en la Tabla 4.

Tabla 4. Características del flujo sanguíneo [36].

Parámetro	Valor sanguíneo
Temperatura de la sangre arterial ( $T_b$ ) [K]	310
Calor específico de la sangre $C_{p,b}$ (J/(kg·K))	4200
Densidad de la sangre (kg/m <sup>3</sup> )	1000
Fuente de calor metabólica ( $Q_{met}$ ) W/m <sup>3</sup>	1091

Además, siguiendo los valores utilizados en la bibliografía, se ha establecido un flujo de calor convectivo entre la parte superior del tejido y el aire, con un valor de 5 W/m<sup>2</sup>·K. La temperatura corporal es de 37 °C en el conjunto del volumen y la temperatura ambiente de 25 °C [36].

La zona central presenta las características de un tejido tumoral, pues simulan la zona afectada. En la Figura 10 se muestra el volumen correspondiente al tejido tumoral.

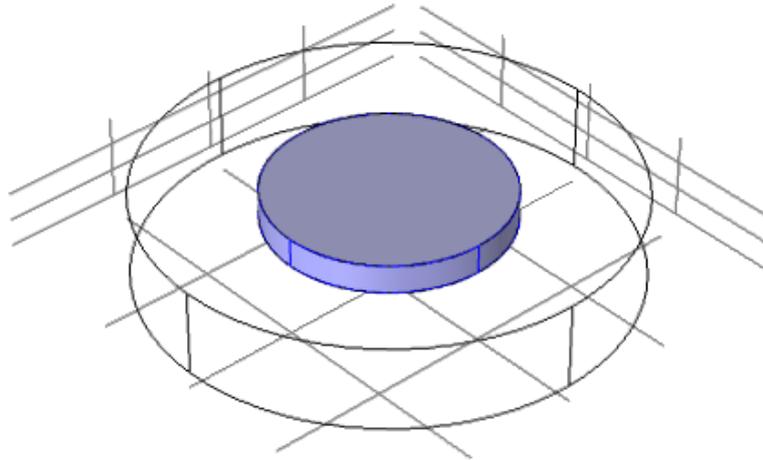


Figura 10. Zona cancerígena.

El volumen adyacente que representa el tejido sano se muestra en la Figura 11.

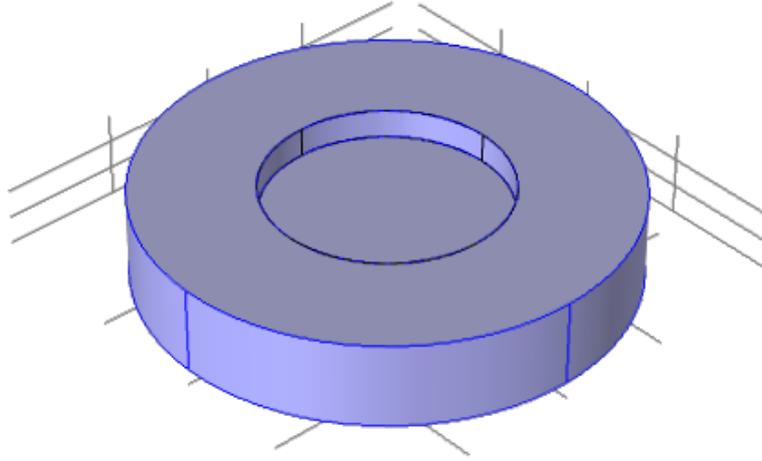


Figura 11. Tejido sano.

Se define la irradiancia inicial del láser ( $\text{W}/\text{m}^2$ ), como la potencia del haz sobre la superficie que ocupa en el punto superior de la geometría, antes de verse atenuado según la Ecuación 7.

$$I_0 = \frac{P}{S} \quad (7)$$

Para añadir realismo se define esta irradiancia como una distribución en los ejes XY, de forma que en el punto central donde incide el haz se encuentra la mayor cantidad de irradiancia, y esta se va dispersando conforme aumenta la distancia a este punto. Esta distribución ( $\text{W}/\text{m}^2$ ), se define con una función gaussiana, tal y como se expresa en la Ecuación 8, donde  $r$  equivale al radio de aplicación del haz láser.

$$I_0(x, y) = \frac{P}{S} \cdot e^{-\frac{(x^2+y^2)}{r^2}} \quad (8)$$

La atenuación de la intensidad de un haz en un medio se calcula mediante la ley de Beer-Lambert, según la Ecuación 9, de forma que la irradiancia que se encuentre en un punto a profundidad  $z$  se habrá visto atenuada en función de la absorbancia del tejido ( $\alpha_{\text{tumor}}$ ) y de dicha profundidad.

$$I(x, y, z) = I_0(x, y) \cdot e^{-\alpha_{\text{tumor}} \cdot z} \quad (9)$$

Considerando que la irradiancia que alcanza la superficie equivalente de una nanopartícula y es absorbida se transforma completamente en calor, se puede definir que el calor que desprende una nanopartícula, cuando esta se encuentra a una profundidad  $z$  es el correspondiente a la Ecuación 10 [48].

$$Q_{NP}(x, y, z) = \alpha_{NP} \cdot I(x, y, z) \quad (10)$$

Donde  $\alpha_{NP}$  ( $\text{m}^{-1}$ ) es el coeficiente de absorción que ofrece la sección transversal de la nanopartícula que se ha calculado anteriormente en una simulación de la nanopartícula siendo

irradiada con luz. Este valor suele ser mayor en la superficie geométrica de la nanopartícula que se expone a la luz, debido a interacciones electromagnéticas que hacen aumentar su eficiencia para absorber luz.

Se extiende esta ecuación para definir una distribución uniforme de nanopartículas en todo el volumen del tumor, suponiendo que se distribuyen uniformemente con el tiempo suficiente. Para ello se calcula a partir de la supuesta concentración en el tejido el número de nanopartículas por unidad de volumen, a partir de la Ecuación 11, donde la concentración de nanopartículas ( $NP([\ ])$ ) equivale al producto entre el número de nanopartículas por metro cúbico ( $[ ]$ ), la masa molar del oro ( $M(Au)$ ) y el número de Avogadro ( $NAv$ ).

$$NP([\ ]) = [ ] \cdot M(Au) \cdot NAv \quad (11)$$

Se añade este parámetro a la Ecuación 10 de forma que se calcula el calor que desprende el volumen tumoral según la Ecuación 12.

$$Q(x, y, z, [\ ]) = NP([\ ]) \cdot \alpha_{NP} \cdot I(x, y, z) \quad (12)$$

Se halla el calor que desprende un volumen que contiene una concentración de nanopartículas cuando le alcanza un valor de irradiancia ( $W/m^3$ ). Este valor se introduce en el software de simulación, que realizando una división de la geometría en pequeños volúmenes (simulación de elementos finitos) tiene en cuenta tanto el volumen de este elemento y por lo tanto el número de nanopartículas que contiene, como su posición en los ejes  $x, y, z$  respecto al punto inicial para calcular las atenuaciones definidas por la distribución del láser y la ley de Beer-Lambert.

Se ha establecido un mallado tetraédrico de barrido para evaluar la variación de temperatura en cada punto de la malla, tal y como se observa en la Figura 12.

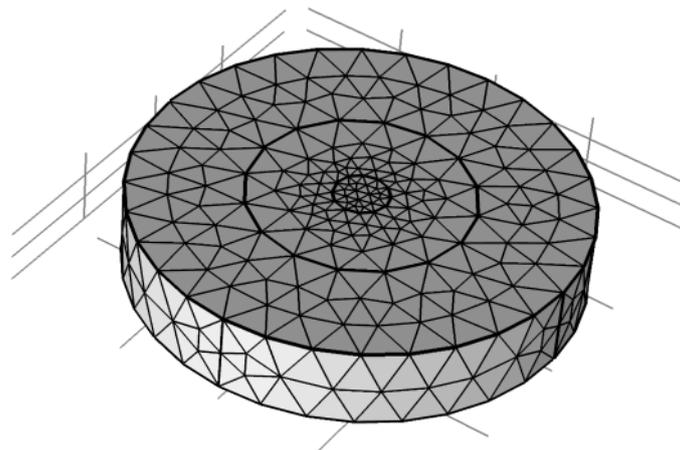


Figura 12. Mallado del método de elementos finitos (FEM).

Una vez establecidas las condiciones del volumen de irradiación se determina el tipo de estudio que se quiere aplicar. En este caso se ha definido un estudio temporal de duración comprendida entre 0 y 15 minutos, para comprobar los efectos de irradiar en condiciones similares a las experimentales.

Además, se pueden ajustar otros parámetros, como los puntos de medición en el volumen. En este caso se ha utilizado el punto de máxima temperatura, que es el punto central del volumen, para tomar los distintos valores temporales de la temperatura, tal y como se muestra en la Figura 13. De este modo se puede conocer la temperatura máxima que alcanza el volumen.

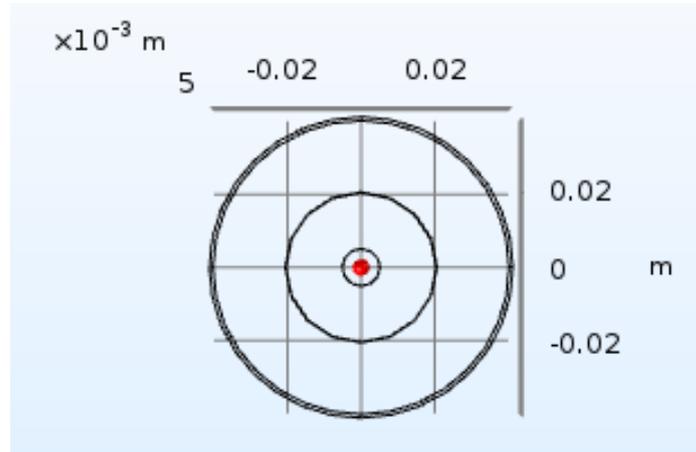


Figura 13. Punto de medida de la temperatura máxima.

Finalmente, se han realizado líneas de corte en el eje transversal del volumen para comprobar la distribución radial de la temperatura a distintas profundidades.

## CAPÍTULO 5: Resultados y discusión

### 5.1. Resultados experimentales

#### 5.1.1. Ensayos de citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad se han realizado por duplicado en células HeLa y Sk-mel. La finalidad de este tipo de ensayo es conocer a partir de qué concentración se producen daños celulares por una concentración excesiva de nanopartículas en el medio de cultivo.

Para ello se han administrado concentraciones de nanoestrellas comprendidas entre 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se rellenan dos columnas de pocillos con cada una de las concentraciones y se toman como control dos columnas de pocillos sin nanoestrellas.

En la Tabla 5 se muestra el volumen de la suspensión añadida correspondiente a cada concentración final de nanoestrellas en el pocillo.

*Tabla 5: Relación concentración-volumen de nanopartículas.*

Concentración ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	$\mu\text{L}$ de disolución
10	2.4
20	3.8
25	4.7
30	5.7
40	7.6
50	9.4
60	11.30
70	13.20
80	15
90	15
100	18.8

En la Figura 14 se representa el porcentaje de células vivas tras aplicar cada una de las concentraciones, así como la desviación estándar de los distintos datos recogidos.

Las concentraciones comprendidas entre 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  presentan una toxicidad nula, pues la viabilidad celular es del 100%. A partir de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de concentración se empieza a producir una reducida mortalidad celular asociada a la presencia de nanopartículas, ya que la viabilidad es un

poco menor al 100%. Las concentraciones de 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  producen un efecto demasiado tóxico como para ser utilizadas en ensayos de hipertermia.

Los ensayos de hipertermia posteriores se pueden realizar aplicando una concentración máxima de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para que la mortalidad sea asociada a la irradiación y no a la presencia de nanopartículas.

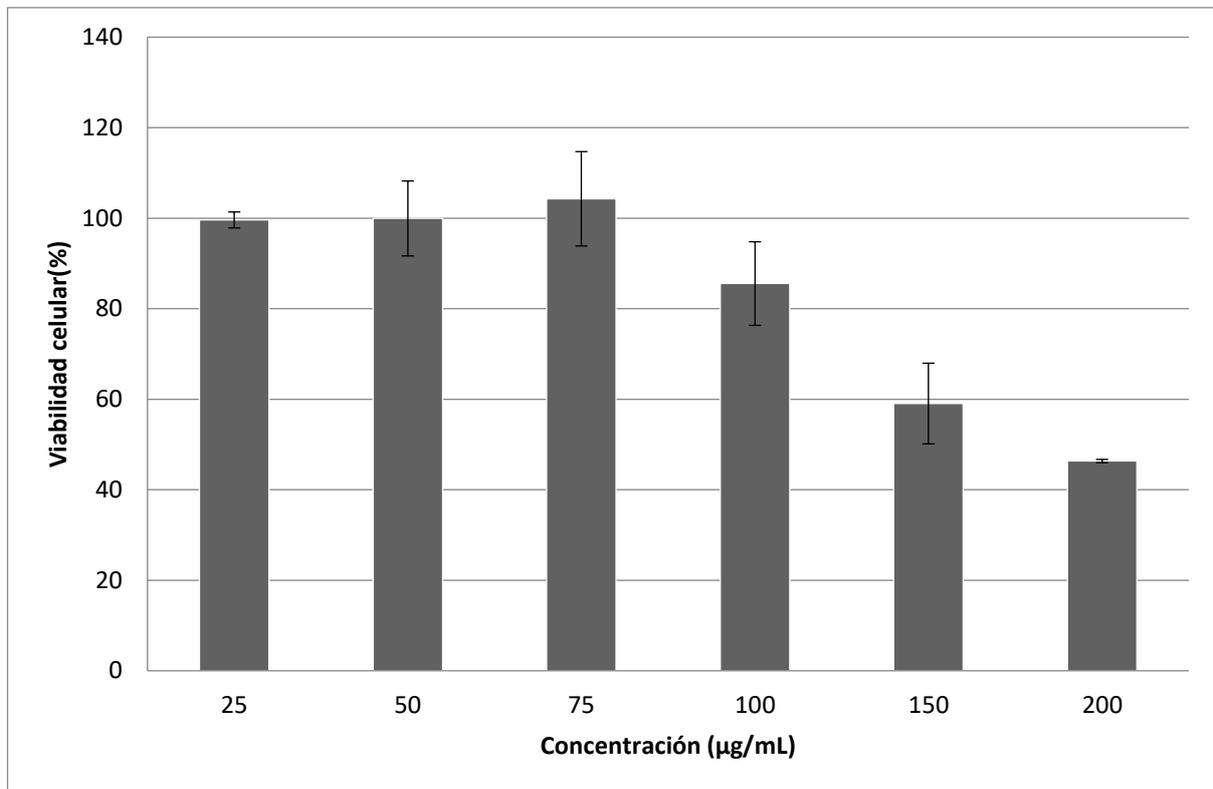


Figura 14. Toxicidad de las nanopartículas de oro sobre cultivos celulares HeLa.

Se ha comprobado a su vez la toxicidad sobre cultivos celulares Sk-mel y no se observan diferencias significativas. La concentración de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  no es tóxica y entre 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se observa una pequeña mortalidad celular. El valor de 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  es tóxico, pues provoca una mortalidad del 40%. Teniendo en cuenta estos resultados se pueden aplicar concentraciones de hasta 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sin que el resultado se vea alterado por la toxicidad de las nanopartículas.

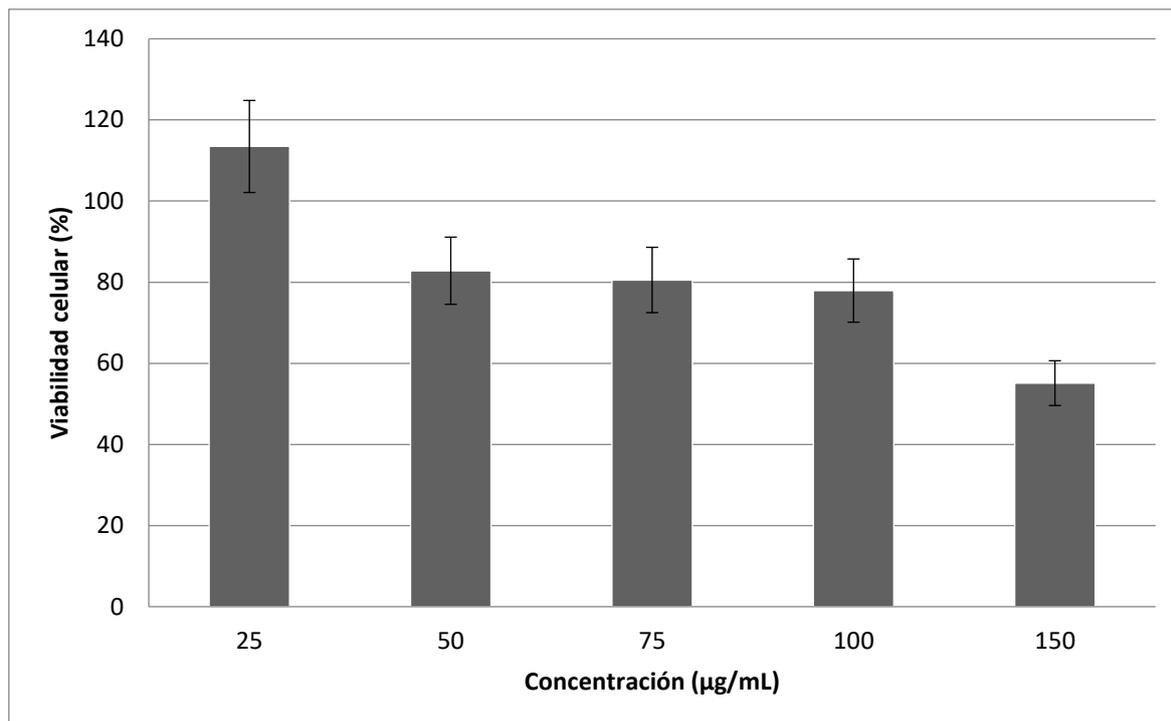


Figura 15. Toxicidad de las nanopartículas de oro sobre cultivos celulares Sk-mel.

### 5.1.2. Ensayos de hipertermia óptica

Tal y como se ha explicado con anterioridad los ensayos de hipertermia se han realizado por triplicado, variando la concentración de nanopartículas aplicada y el tiempo de irradiación sobre los cultivos celulares.

En primer lugar, se ha comprobado el efecto de aplicar hipertermia sobre cultivos celulares sin nanopartículas, para comprobar si la aplicación de la irradiación provoca alguna alteración en la viabilidad celular.

En la Figura 16 se representa la viabilidad celular tras exponer a los cultivos a tres tiempos de irradiación: 5, 10 y 15 minutos. Se observa que no se produce mortalidad celular asociada al aumento de temperatura debido a la irradiación, pues la viabilidad celular es prácticamente del 100% en todos los casos.

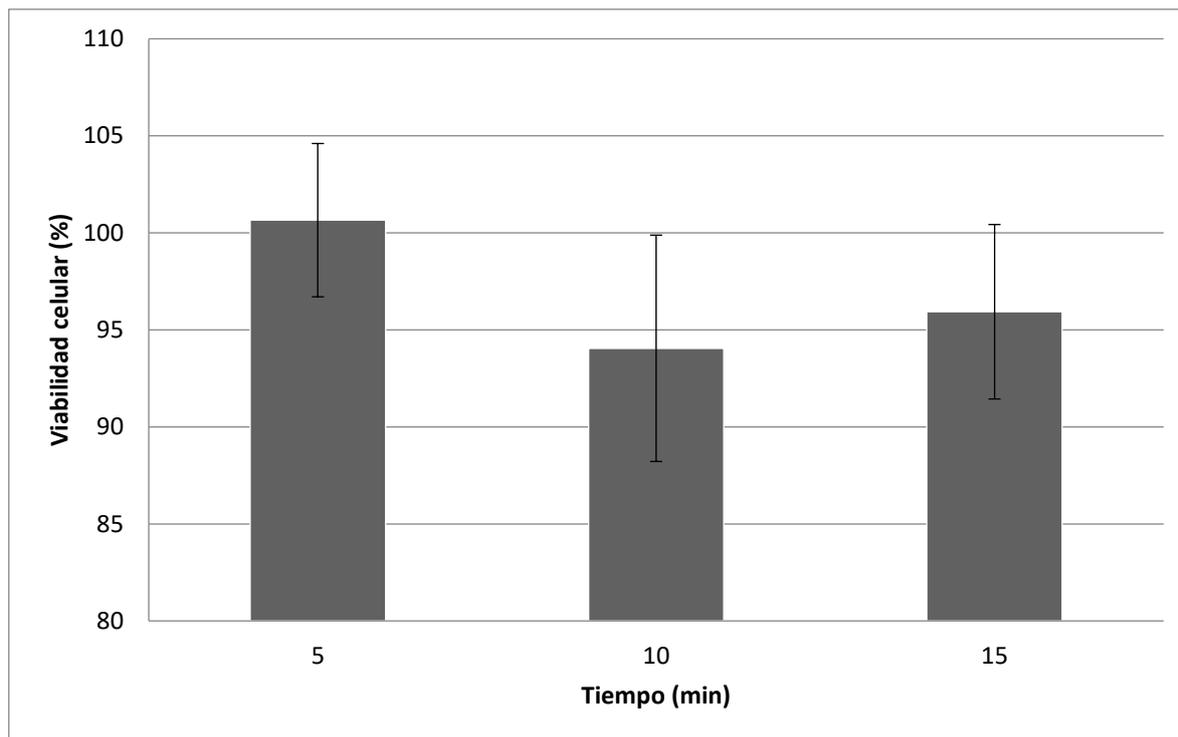


Figura 16. Viabilidad celular dependiente del tiempo de aplicación de calor sin nanopartículas.

En la Figura 17 se observa la viabilidad celular de los distintos datos recogidos durante experimentales con 4 concentraciones diferentes.

Para una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  la muerte celular es inexistente. La viabilidad celular es del 100% y por tanto esta concentración no es suficiente para conseguir elevar la temperatura y provocar la apoptosis celular. Se puede considerar el caso de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  como análogo para tiempos entre 0 y 10 minutos, pero sí que se observa una mortalidad reducida en 15 minutos de irradiación, donde muere entre un 5 y un 10 % de las células.

A partir de la concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se empieza a obtener el efecto deseado. Para 5 minutos de irradiación hay muy poca mortalidad. pero a partir de 10 y 15 minutos se llega a producir una mortalidad de entorno al 20%.

La menor viabilidad celular se produce en 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de concentración, con un valor del 50% para 5 minutos y un valor del 30% en 15 minutos de irradiación.

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

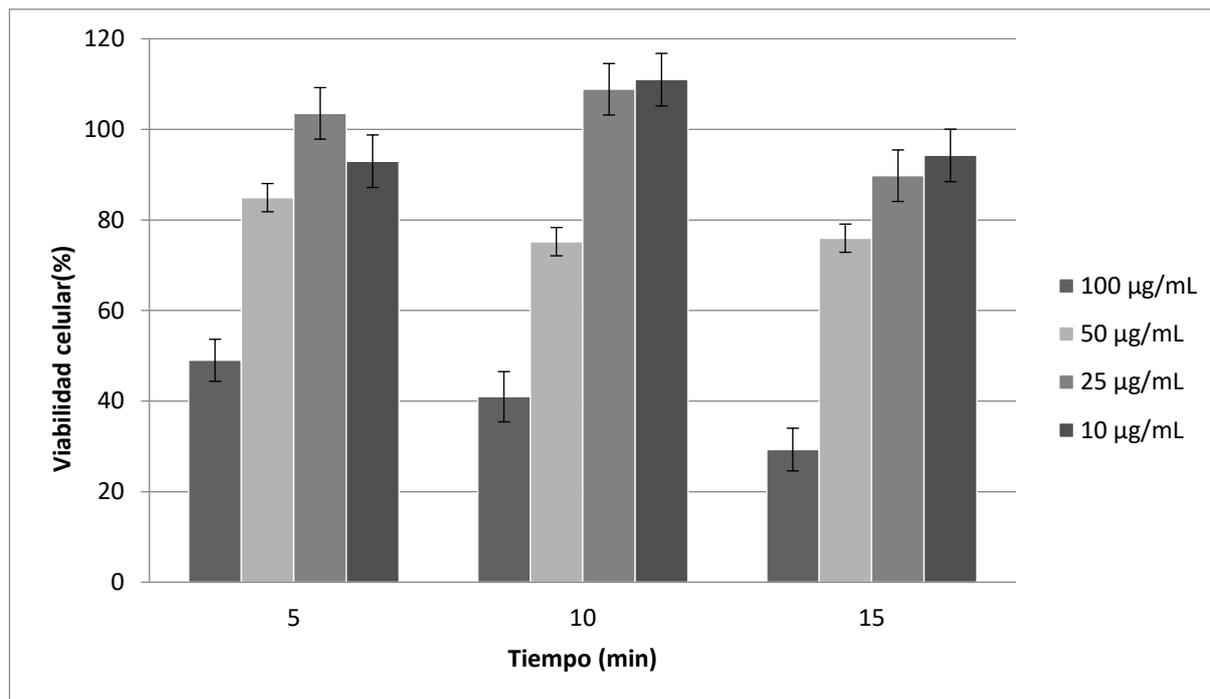


Figura 17. Viabilidad celular sobre cultivos HeLa tras aplicar hipertermia.

A su vez se ha estudiado la viabilidad celular tras aplicar distintas concentraciones de nanopartículas y tiempos de irradiación sobre cultivos celulares de Sk-mel. Se ha fijado una concentración máxima de 100 µg/mL que tal y como se observa en la Figura 18 produce una mortalidad celular muy elevada en todos los tiempos de estudio. También se observan valores óptimos para la concentración de 50 µg/mL, para la que se provoca una muerte celular mucho mayor que en el cultivo HeLa para la misma concentración. La concentración de 10 µg/mL no produce un efecto significativo en 5 minutos, pero causa una mortalidad del 30% aproximadamente en 15 minutos. En este caso, se puede considerar que el valor más óptimo se obtiene para una concentración de 50 µg/mL.

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

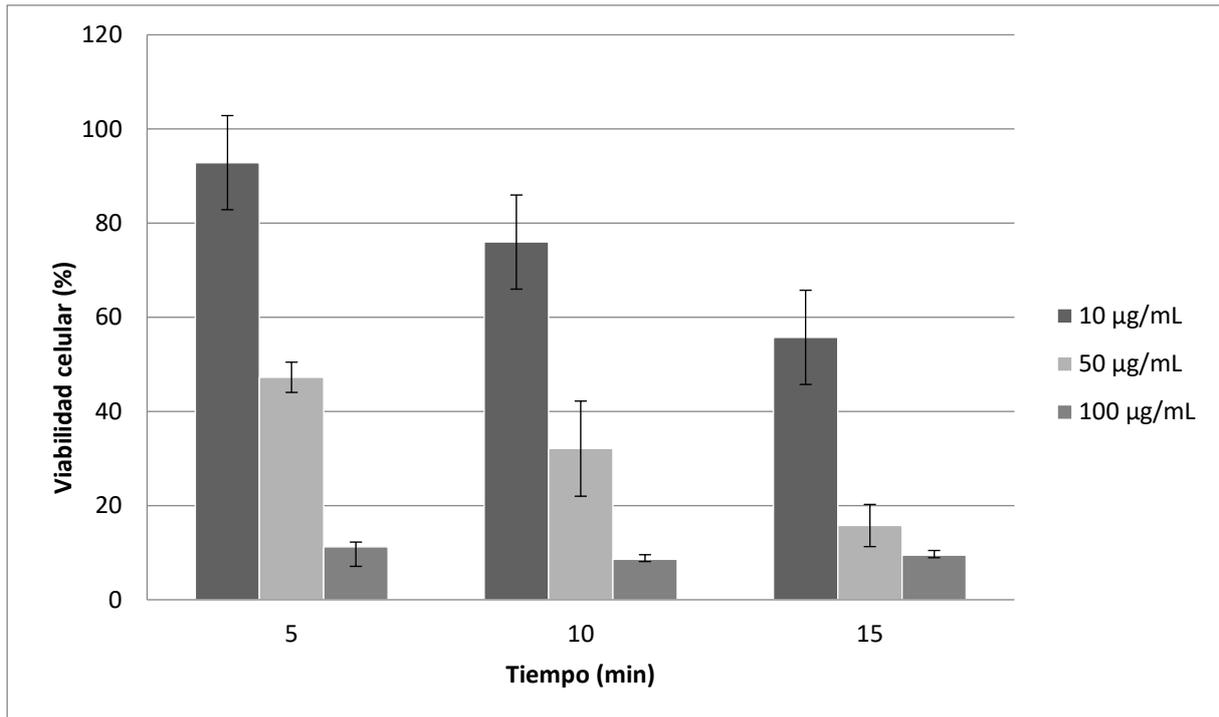


Figura 18. Viabilidad celular sobre cultivos Sk-mel tras aplicar hipertermia.

Teniendo en cuenta los resultados mostrados en la Figura 18, se puede considerar que a partir de 10 minutos empieza a producirse un efecto notable de la temperatura para concentraciones menores sobre los cultivos celulares. En la Figura 19, se muestra el efecto de aplicar las mismas concentraciones durante 10 minutos de irradiación sobre ambas líneas celulares.

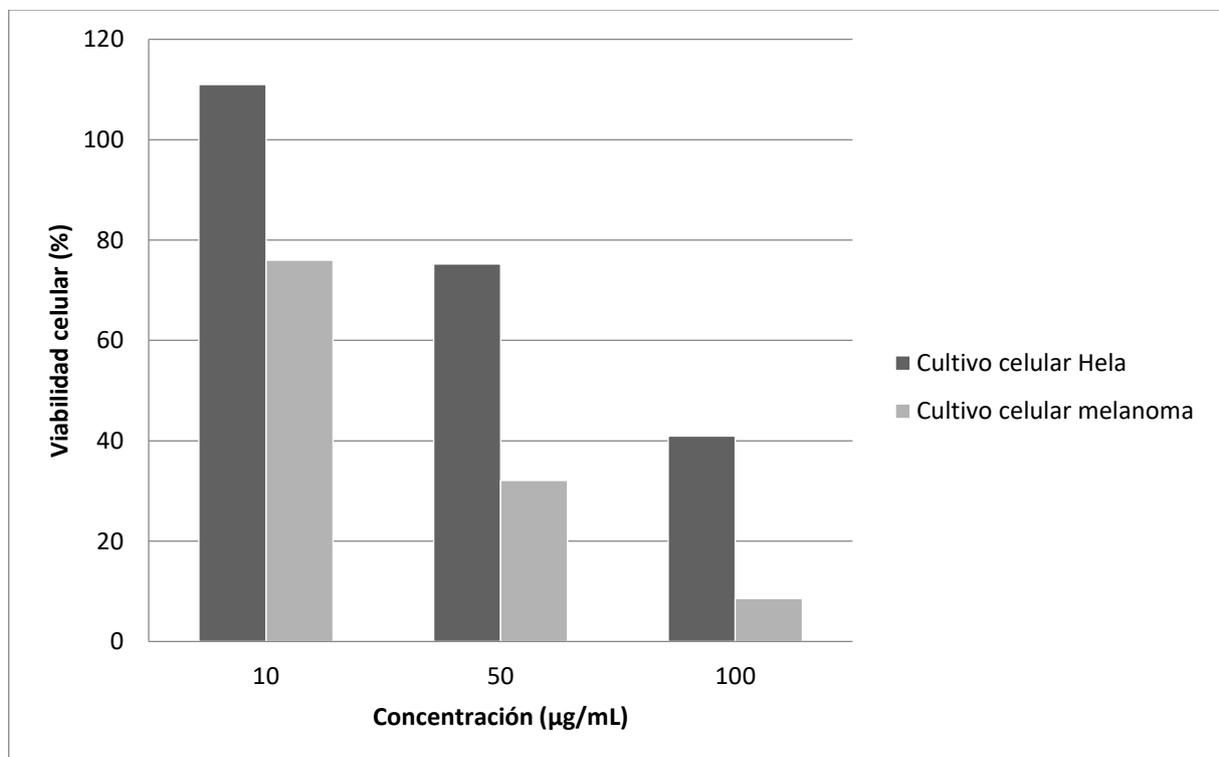


Figura 19. Viabilidad celular sobre cultivos HeLa y Sk-mel tras irradiar durante 10 minutos.

En la Figura 20, se representa la viabilidad celular tras 15 minutos de irradiación y de forma análoga a la comparativa de resultados entre ambos cultivos celulares para 10 minutos de irradiación, se observa mayor mortalidad en cultivos celulares de melanoma.

Se concluye que los cultivos celulares Sk-mel presentan menor resistencia a la aplicación de hipertermia óptica que los cultivos celulares HeLa.

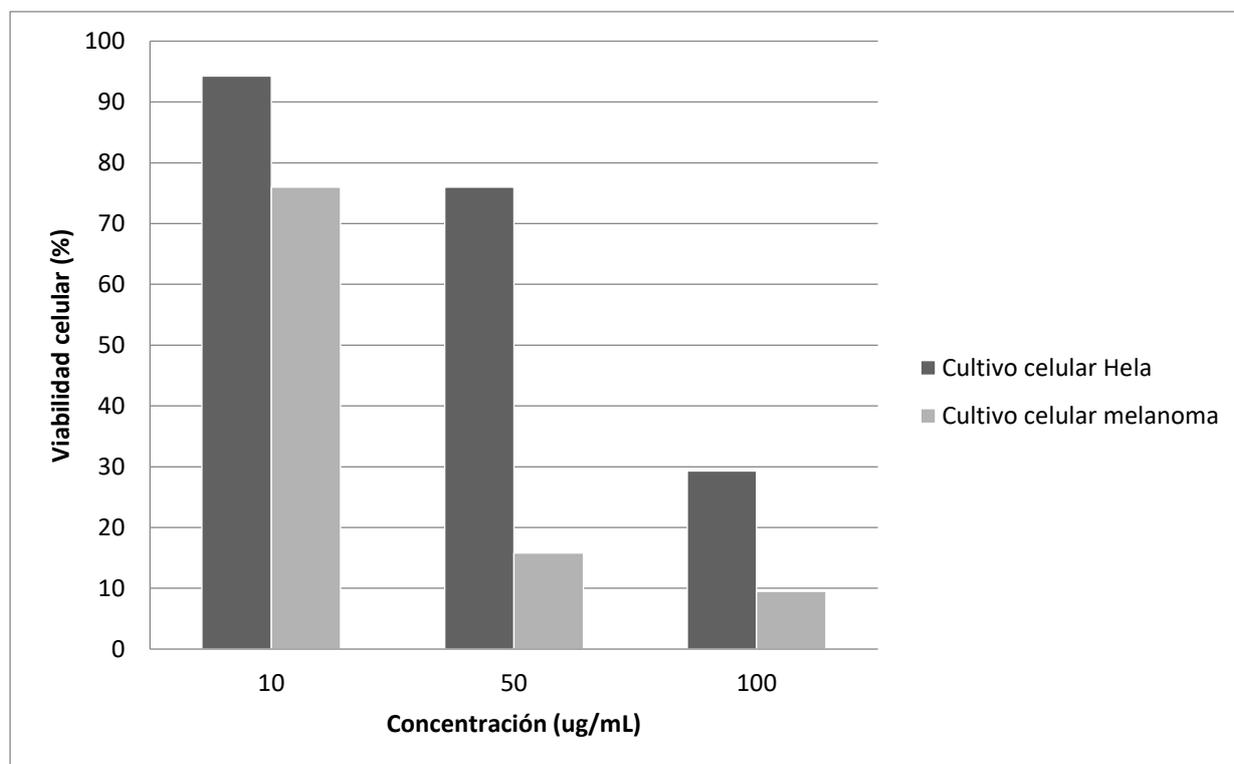


Figura 20. Viabilidad celular sobre cultivos HeLa y Sk-mel tras irradiar durante 15 minutos.

Hasta el momento se han considerado la concentración de nanoestrellas y el tiempo de irradiación, pero ambos se tienen que comparar con la temperatura alcanzada. La muerte de zonas cancerígenas en tejidos se produce a partir de 42 °C y por tanto se tiene que estudiar para qué concentraciones y tiempos se produce este efecto.

Tal y como se observa en la Figura 21, la concentración de 25 µg/mL no consigue alcanzar la temperatura deseada y por tanto, concentraciones menores que esta quedan descartadas. La concentración de 100 µg/mL eleva demasiado la temperatura celular, lo que podría causar daños en tejidos sanos si se extrapolara el uso de esta técnica a aplicaciones sobre cáncer cutáneo. Teniendo en cuenta que además a partir de esta concentración se empieza a ver un mínimo efecto tóxico se descarta como valor objetivo.

El valor más óptimo se consigue para una concentración de 50 µg/mL, donde el cultivo celular alcanza una temperatura de 42 °C cerca de los 10 minutos, y además es un valor que no presenta toxicidad en ninguno de los cultivos celulares.

El gráfico de tendencias por concentración y tiempo se ha representado a partir de las temperaturas alcanzadas durante los ensayos experimentales registrados por el programa.

Para obtenerlo se ha realizado una aproximación según la Ecuación 13.

$$T = m + n \cdot \exp(-v \cdot t) \quad (13)$$

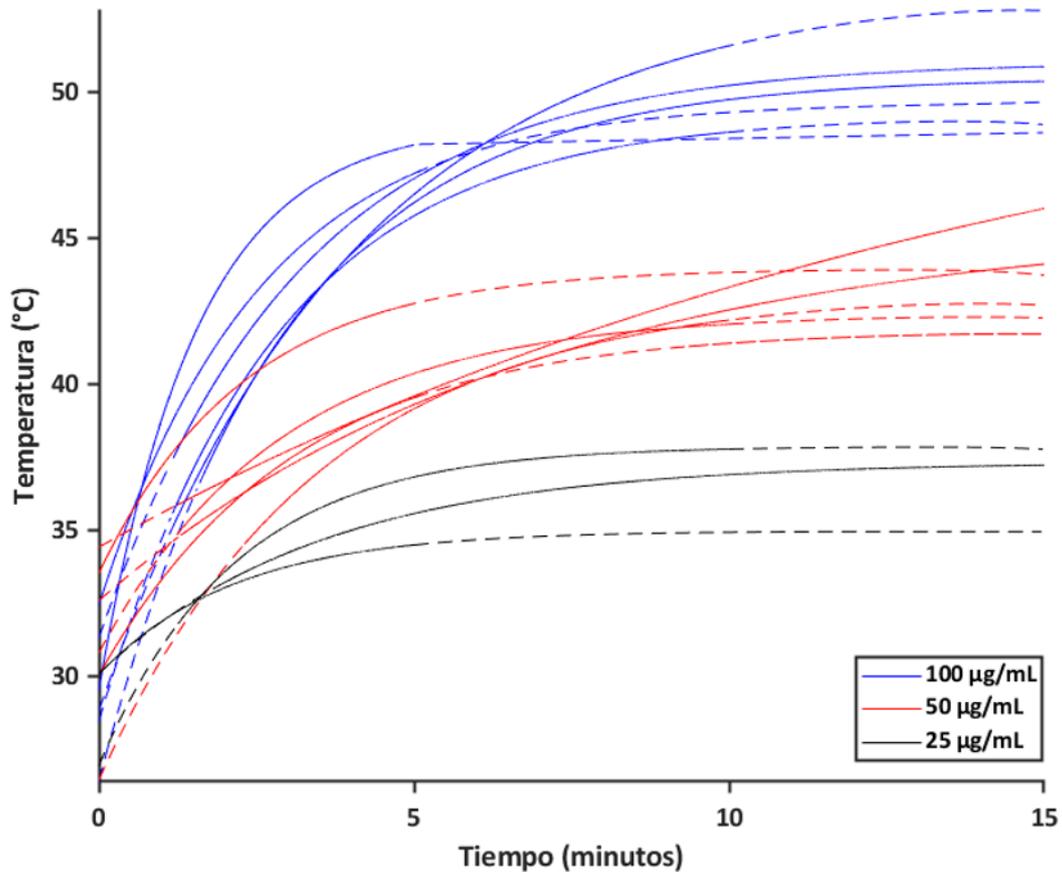


Figura 21. Tendencias de temperatura por concentración y tiempo.

## 5.2. Resultados computacionales

Se va a desarrollar un estudio computacional para conocer los parámetros más óptimos para el tratamiento de hipertermia óptica. Para ello, se han diseñado cuatro modelos con características diferentes.

En cada modelo se utiliza una potencia de aplicación diferente y se estudia qué concentración de nanoestrellas y tiempo de irradiación son más idóneos para conseguir provocar la muerte celular. Además, se estudia el efecto de aumentar el radio de aplicación láser en cada modelo. El objetivo es conocer el parámetro más óptimo para el tratamiento con un equipo de estas características.

Para provocar los efectos deseados mediante hipertermia, se tiene que lograr alcanzar una temperatura de entre 42 °C y 44 °C en la zona dañada. En las pruebas experimentales se han aplicado tiempos de 5, 10 y 15 minutos, y de la misma forma se va a realizar en las pruebas computacionales. Un aspecto a considerar a la hora de realizar tratamientos es conseguir la mayor comodidad posible.

Cuanto menor sea el tiempo de aplicación del haz láser el tratamiento será más fácil y confortable para el paciente.

Además, se van a tener en cuenta los valores no tóxicos de las concentraciones administradas en el procedimiento experimental. Las condiciones experimentales distan de las simuladas, pues las pruebas experimentales se realizan sobre cultivos celulares y en este caso la simulación aplica el tratamiento de hipertermia sobre un modelo de tejido real, que considera la vascularización y las condiciones de convección y propiedades térmicas citadas anteriormente. Aun así, como experimentalmente se ha observado que dichas condiciones consiguen elevar la temperatura hasta la adecuada para causar hipertermia, se va a comprobar si de la misma forma se puede provocar sobre piel, sabiendo que son concentraciones que no causan toxicidad en los cultivos celulares.

### 5.2.1. Modelo 1

En el primer modelo de estudio, se utiliza una potencia de 500 mW para dos radios de aplicación del haz láser, de 2 mm y de 5 mm.

En la Figura 22, se representa la evolución temporal de la temperatura para distintas concentraciones de nanopartículas para un radio de aplicación de 2 mm y 500 mW de potencia. Las líneas discontinuas marcadas establecen los límites inferior y superior que consiguen causar la apoptosis celular.

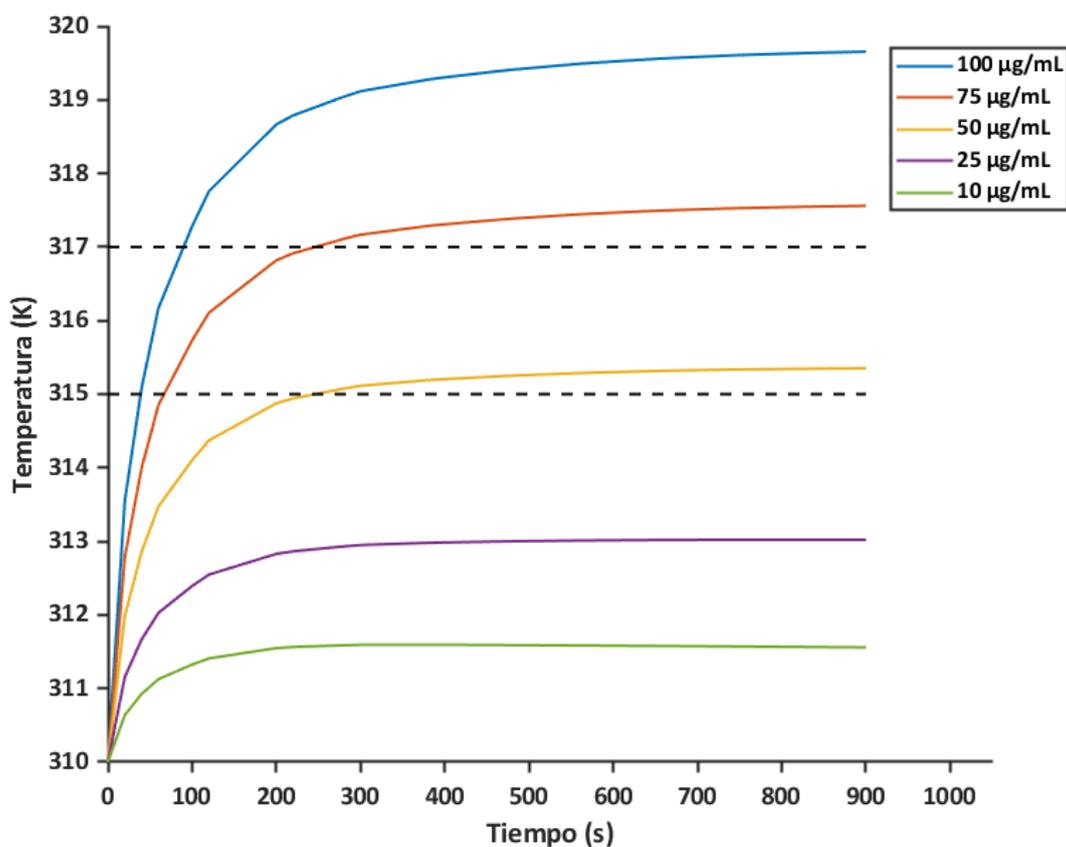


Figura 22. Evolución temporal de la temperatura para distintas concentraciones de nanopartículas para una potencia de 500 mW y un radio de aplicación de 2 mm.

Se observa que a partir de una concentración administrada de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se consigue elevar la temperatura al valor mínimo de hipertermia, que es de 42  $^{\circ}\text{C}$ . Por tanto, se estudia la distribución temporal de la temperatura para encontrar el valor más óptimo entre las concentraciones comprendidas entre 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

En la Figura 23, se representa la distribución temporal para concentraciones comprendidas entre 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Aunque se estén utilizando concentraciones de nanopartículas no tóxicas es importante escoger el valor de concentración mínimo que consiga elevar la temperatura lo suficiente para causar la apoptosis celular, para evitar una posible mortalidad asociada a una concentración excesiva de nanopartículas.

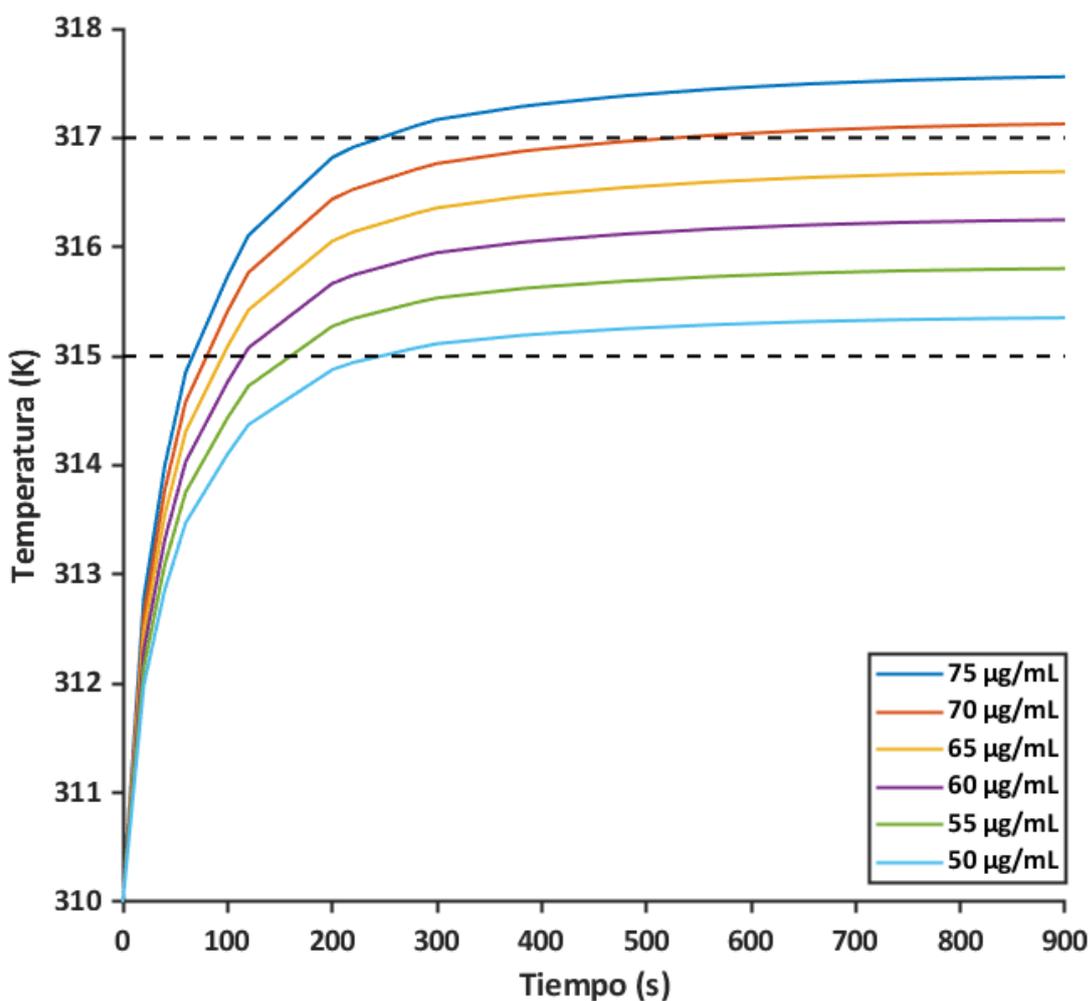


Figura 23. Evolución temporal de la temperatura para concentraciones de nanopartículas comprendidas entre 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para una potencia de 500 mW y un radio de aplicación de 2 mm.

En la Tabla 6 se muestran los valores temporales de la temperatura para las distintas concentraciones de interés.

Tabla 6. Valores temporales de temperatura para concentraciones comprendidas entre 50  $\mu\text{g/mL}$  y 75  $\mu\text{g/mL}$ .

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Temperatura (K)		
	5 min	10 min	15 min
50	315.1	315.3	315.4
55	315.5	315.7	315.9
60	315.9	316.2	316.3
65	316.4	316.6	316.7
70	316.7	317	317.7
75	317.1	317.5	317.6

Se escoge como concentración objetivo 60  $\mu\text{g/mL}$ , por ser la concentración que consigue alcanzar la temperatura intermedia para causar hipertermia. Tal y como se observa en la Tabla 6, la diferencia de temperatura entre los tiempos de irradiación es reducida, ya que su valor aumenta durante los primeros 5 minutos, pero no presenta una gran variación para el resto de tiempos. Es importante que el valor de concentración escogido consiga elevar la temperatura por encima de los 42 °C en la superficie, pues la temperatura es inversamente proporcional a la profundidad del tejido y se debe provocar la apoptosis celular en todo el tejido cancerígeno, que tiene una profundidad de 5 mm.

En la Figura 24, se observa que en estas condiciones de irradiación se consigue elevar la temperatura hasta 42.9 °C en el punto central y hasta 42.4 °C una profundidad de 5 mm del volumen de aplicación. Se observa a su vez que en las zonas más profundas del tejido la temperatura no se distribuye de igual forma, y que además se consigue la temperatura objetivo en un radio del volumen reducido.

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

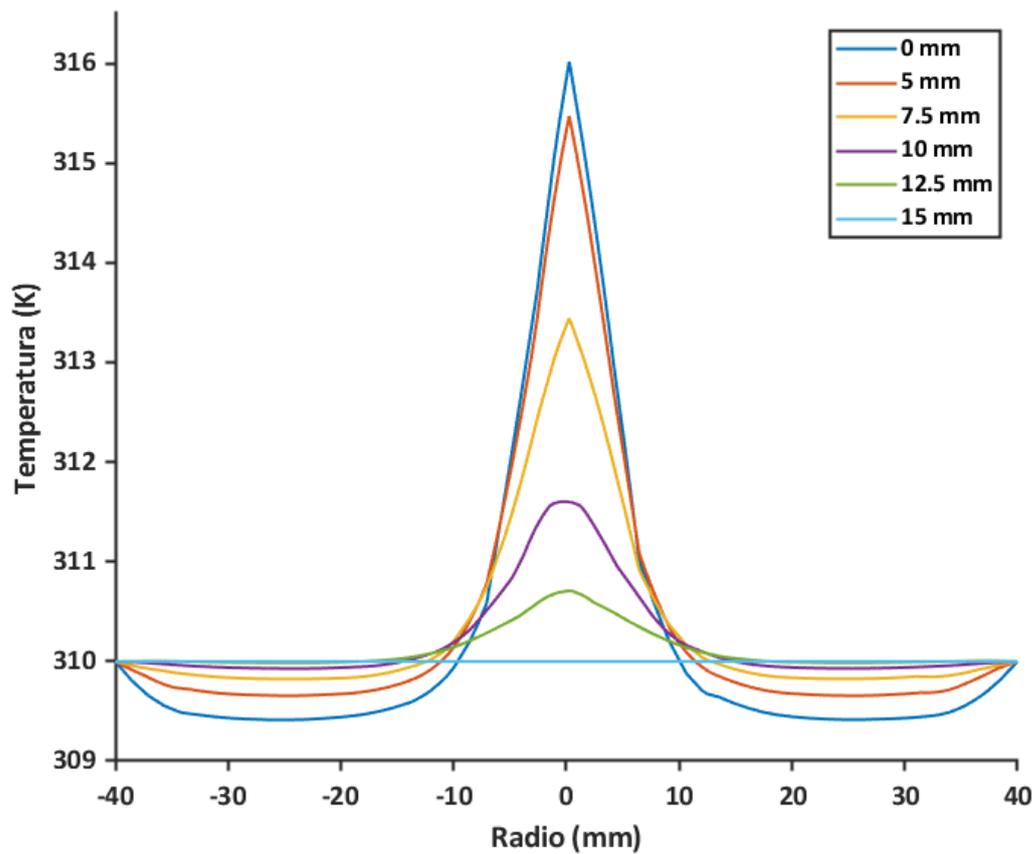


Figura 24. Distribución radial de la temperatura para 5 minutos de irradiación y una concentración de  $60 \mu\text{g/mL}$ .

En la Figura 25, se muestra la distribución volumétrica de la temperatura.

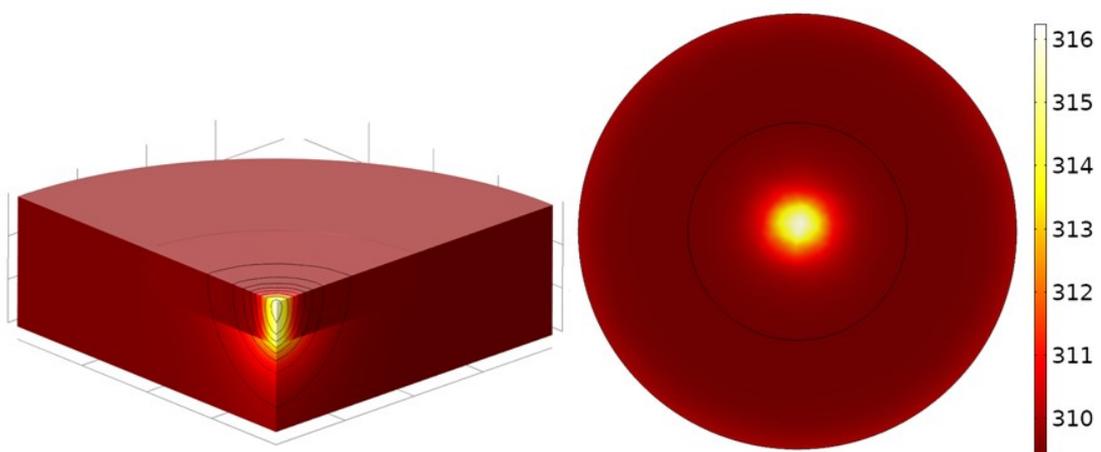


Figura 25. Distribución volumétrica de la temperatura para 5 minutos de irradiación y una concentración de  $60 \mu\text{g/mL}$ .

Para comprobar si es posible elevar la temperatura en un área mayor se aumenta el radio de aplicación del haz láser a 5 mm.

En este caso, la irradiancia aplicada será menor que para 2 mm, pues esta magnitud es inversamente proporcional al radio de aplicación.

En la Figura 26, se representa la evolución temporal de la temperatura para distintas concentraciones comprendidas entre los límites de toxicidad establecidos en los ensayos experimentales. Se observa que para estas condiciones no se consigue elevar la temperatura a 42 °C para 100 µg/mL de concentración, y por tanto no se puede provocar hipertermia en estas condiciones de irradiación, pues se superarían los límites de toxicidad establecidos.

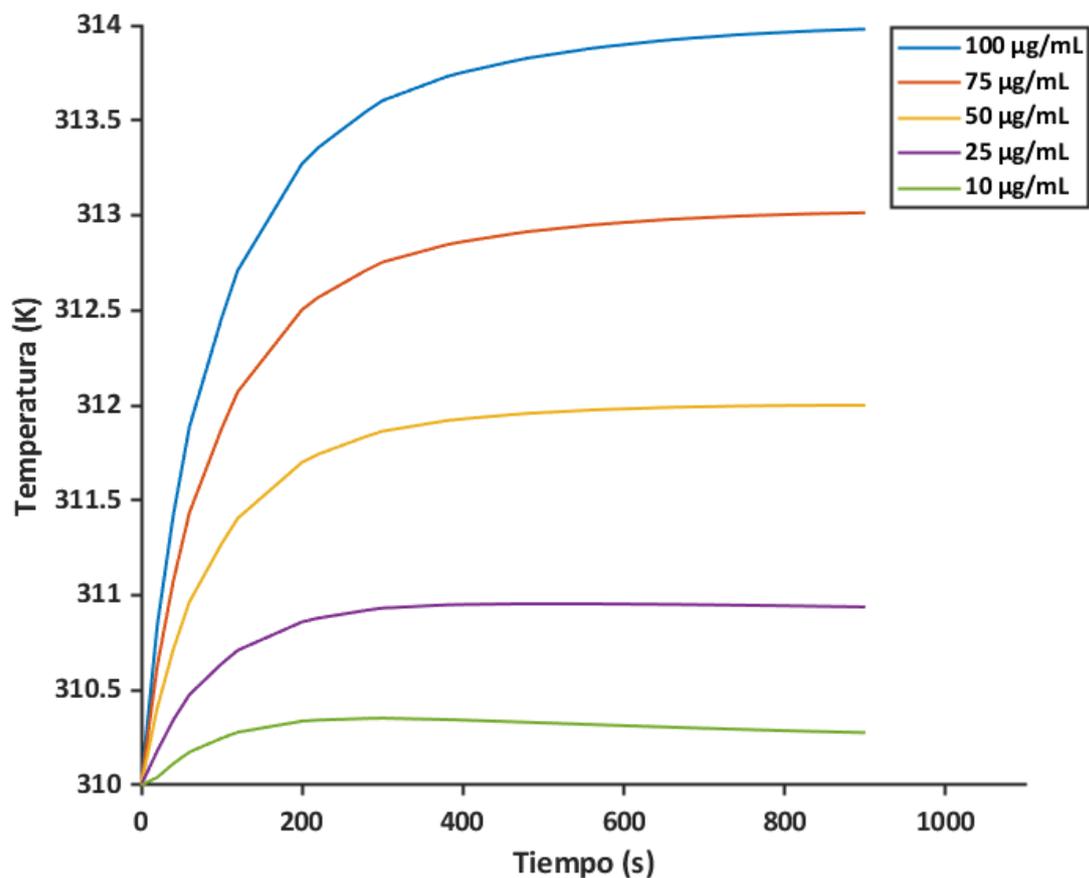


Figura 26. Evolución temporal de la temperatura para distintas concentraciones de nanopartículas para una potencia de 500 mW y un radio de aplicación de 5 mm.

### 5.2.2. Modelo 2

En el modelo 2 de estudio se aumenta la potencia de aplicación a 700 mW.

En primer lugar, se va a estudiar el efecto de irradiar con esta potencia utilizando un radio de aplicación de 2 mm, para un rango de concentraciones administradas entre 10 µg/mL y 100 µg/mL.

En la Figura 27, se representa la evolución temporal de la temperatura en estas características. Se observa que la temperatura alcanzada es mayor que en el modelo 1, en el que la potencia es menor. A partir de una concentración de 50 µg/mL la temperatura alcanzada supera los 44 °C en 5 minutos, por lo que se establece como límite superior. Para una concentración de 25 µg/mL no se consigue la temperatura objetivo, por lo que se establece este valor como límite inferior.

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

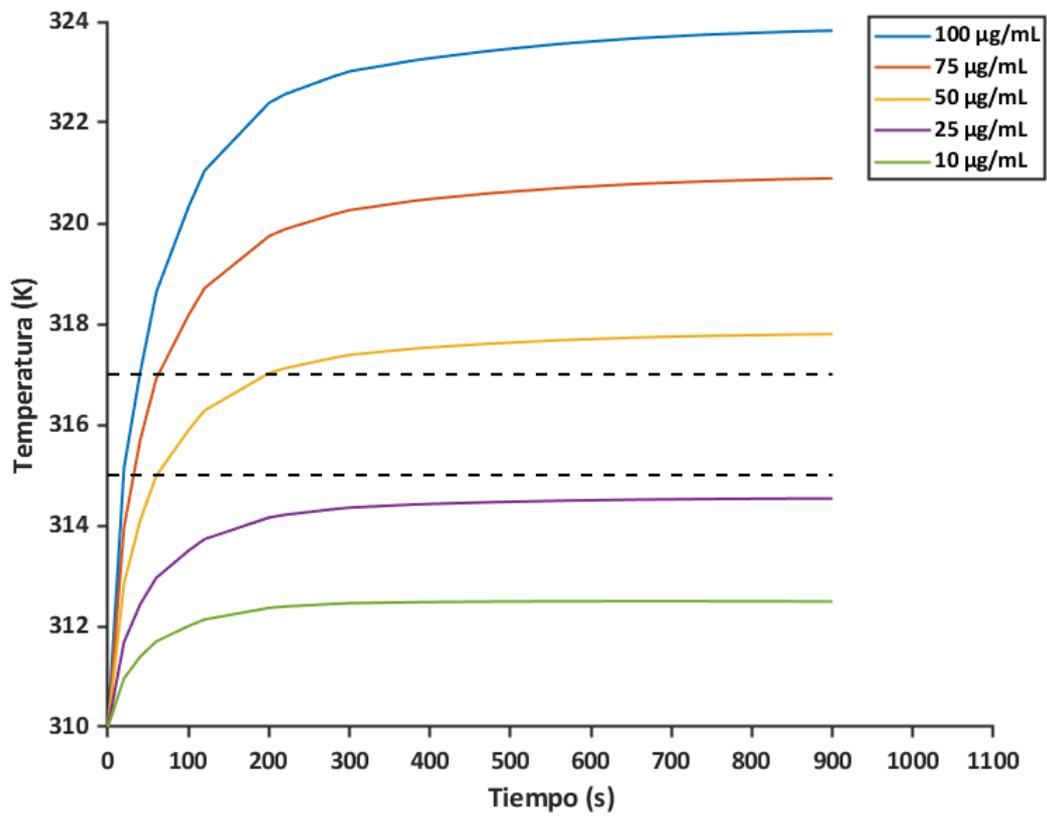


Figura 27. Evolución temporal de la temperatura para distintas concentraciones de nanopartículas para una potencia de 700 mW y un radio de aplicación de 2 mm.

En la Figura 28, se observa la evolución temporal de la temperatura para el rango de concentraciones establecido con anterioridad.

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

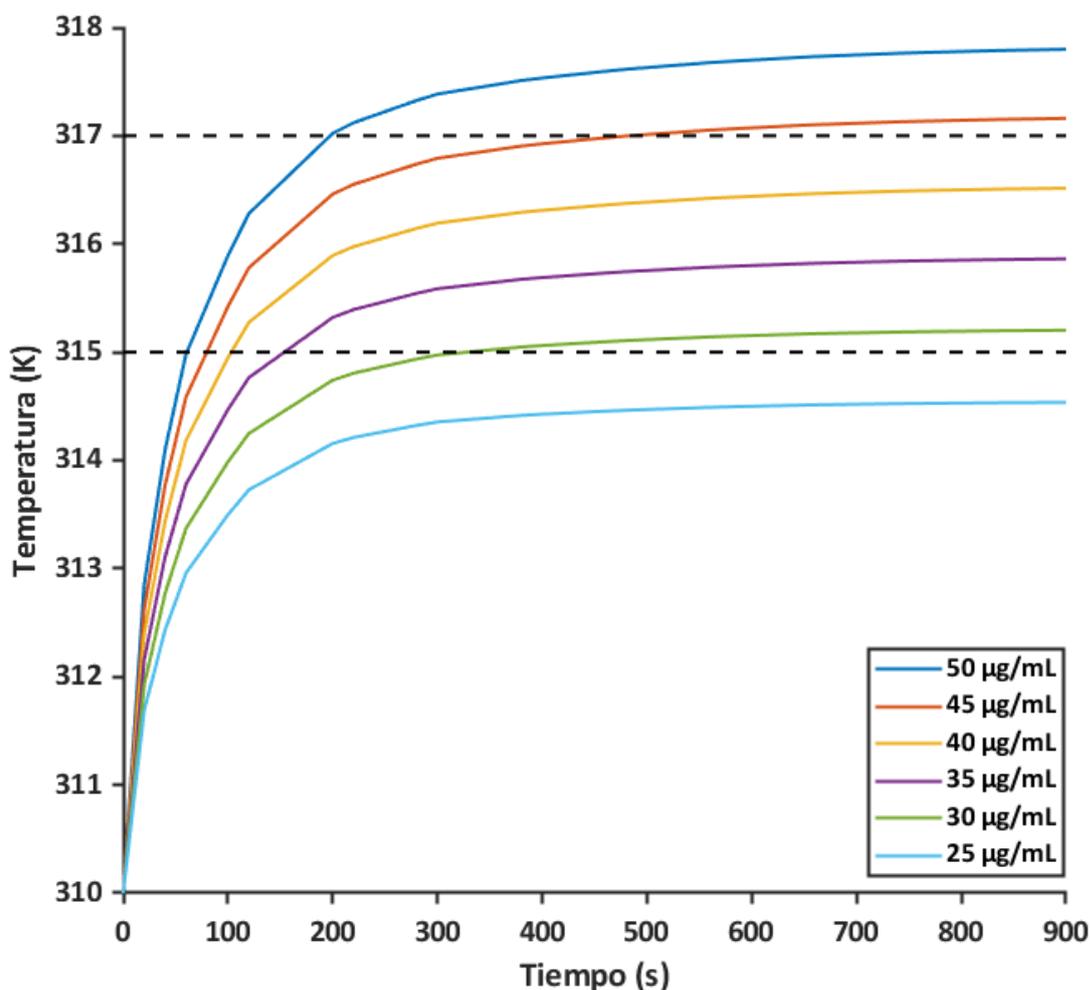


Figura 28. Evolución temporal de la temperatura para distintas concentraciones de nanopartículas comprendidas entre 25 µg/mL y 50 µg/mL.

A partir de los valores recogidos en la Tabla 7, se observa que entre 35 µg/mL y 45 µg/mL se consigue el efecto de hipertermia. Como para la concentración de 40 µg/mL se consigue una temperatura de 43.1 °C en 5 minutos de aplicación, se escoge este valor como concentración objetivo. Además, es una concentración con un nivel de toxicidad muy reducido. Se observa que la temperatura para el resto de tiempos de aplicación aumenta de forma poco considerable, por lo que se establece 5 minutos de irradiación como tiempo objetivo.

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

Tabla 7. Valores temporales de temperatura para concentraciones comprendidas entre 25  $\mu\text{g/mL}$  y 50  $\mu\text{g/mL}$ .

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Temperatura (K)		
	5 min	10 min	15 min
25	314.3	314.5	314.5
30	314.9	315.1	315.2
35	315.5	315.8	315.9
40	316.1	316.4	316.5
45	316.7	317	317.1
50	317.3	317.7	317.8

En la Figura 29, se representa la distribución radial de temperatura para 5 minutos de irradiación y para la concentración objetivo, que en este caso es de 40  $\mu\text{g/mL}$ . Se representan los valores de temperatura para distintas profundidades del volumen de aplicación, y se observa que la temperatura alcanzada es inversamente proporcional a la profundidad del volumen de aplicación. Esto permite tratar el tumor, que se encuentra en la zona superficial y a poca profundidad, sin aumentar la temperatura excesivamente en el tejido sano.

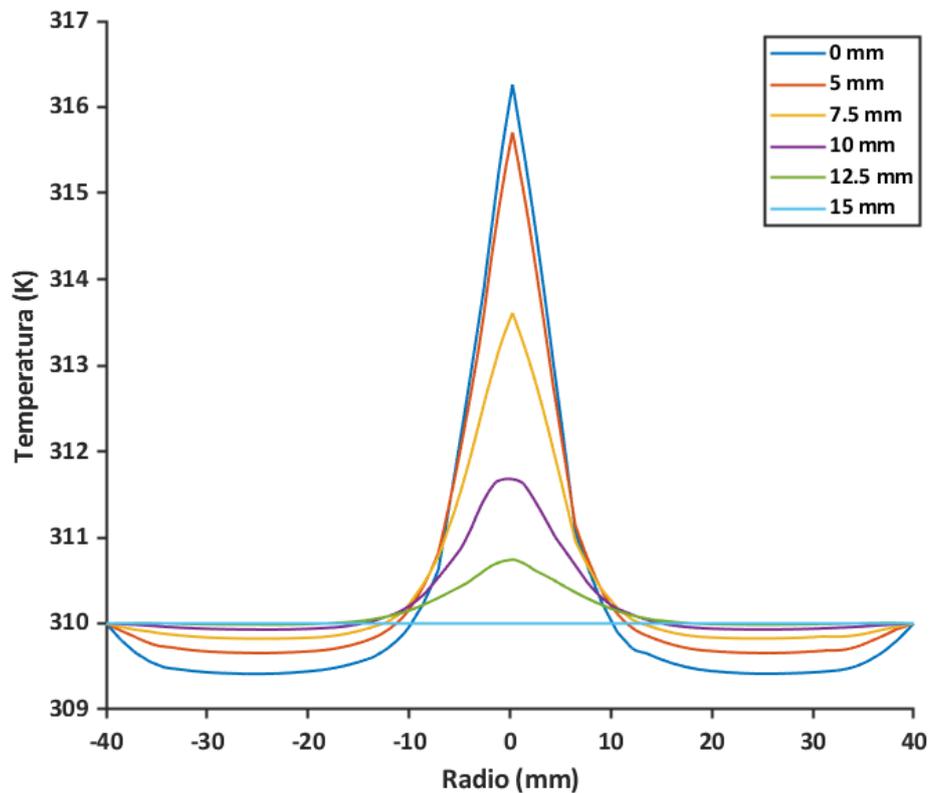


Figura 29. Distribución radial de la temperatura para 5 minutos de irradiación y una concentración de 40  $\mu\text{g/mL}$ .

En la Figura 30, se muestra la distribución volumétrica de la temperatura en estas condiciones de irradiación.

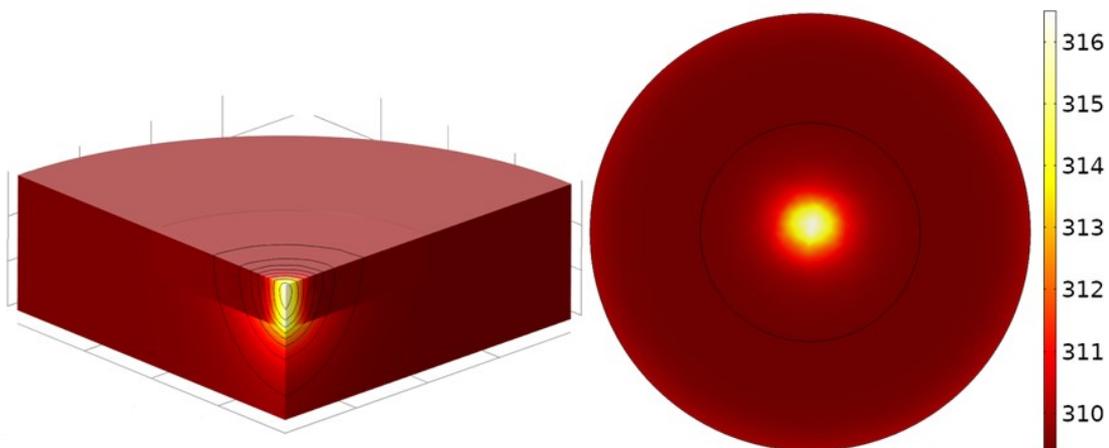


Figura 30. Distribución volumétrica de la temperatura para 5 minutos de irradiación y una concentración de 40  $\mu\text{g/mL}$ .

Análogamente al modelo anterior se observa que se consigue obtener la temperatura deseada, pero para un radio del volumen de aplicación reducido. Por este motivo se quiere comprobar el efecto de aumentar el radio de aplicación manteniendo constante el valor de potencia.

En la Figura 31, se observa que la temperatura alcanzada es menor que para un radio de aplicación de 2mm, debido a que el valor de irradiancia se ha visto reducido al aumentar el radio de aplicación.

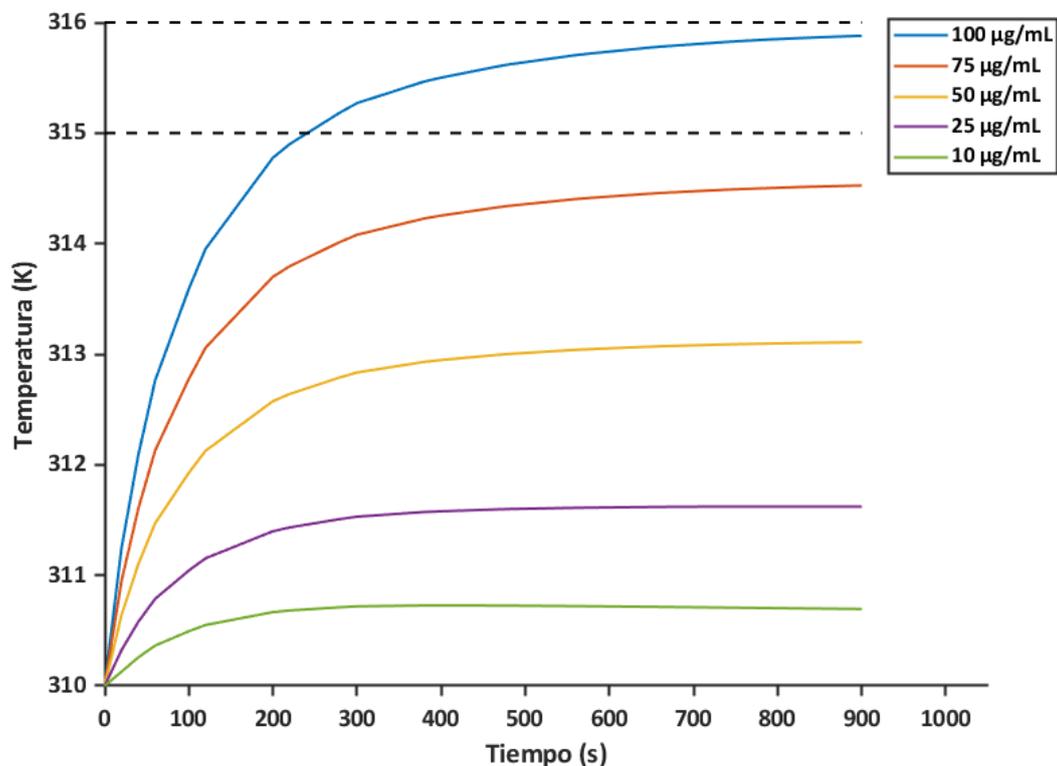


Figura 31. Evolución temporal de la temperatura para distintas concentraciones de nanopartículas para una potencia de 700 mW y un radio de aplicación de 5mm.

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

Para una concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$  se consigue aumentar la temperatura hasta 42.3  $^{\circ}\text{C}$ , tal y como se observa en la Tabla 8, y por ello se estudia la distribución de temperatura para este valor de concentración.

Tabla 8. Valores temporales de temperatura para concentraciones comprendidas entre 100  $\mu\text{g/mL}$  y 10  $\mu\text{g/mL}$ .

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Temperatura (K)		
	5 min	10 min	15 min
10	310.7	310.7	310.7
25	311.5	311.6	311.7
50	312.8	313	313.1
75	314	314.4	314.5
100	315.3	315.7	315.8

A partir de los datos recogidos en la Tabla 8, se establece como concentración objetivo 100  $\mu\text{g/mL}$ , pues es el mínimo valor de concentración que consigue causar hipertermia en los primeros 5 minutos de irradiación. Aun así, como la temperatura alcanzada en 5 minutos es de 42.3  $^{\circ}\text{C}$ , se va a aplicar irradiación durante 10 minutos, para aumentar la temperatura hasta 42.7  $^{\circ}\text{C}$  sin aumentar el valor de la concentración.

En la Figura 32, se representa la distribución radial de la temperatura para 10 minutos de irradiación y una concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$ , para distintos valores de profundidad del tejido.

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

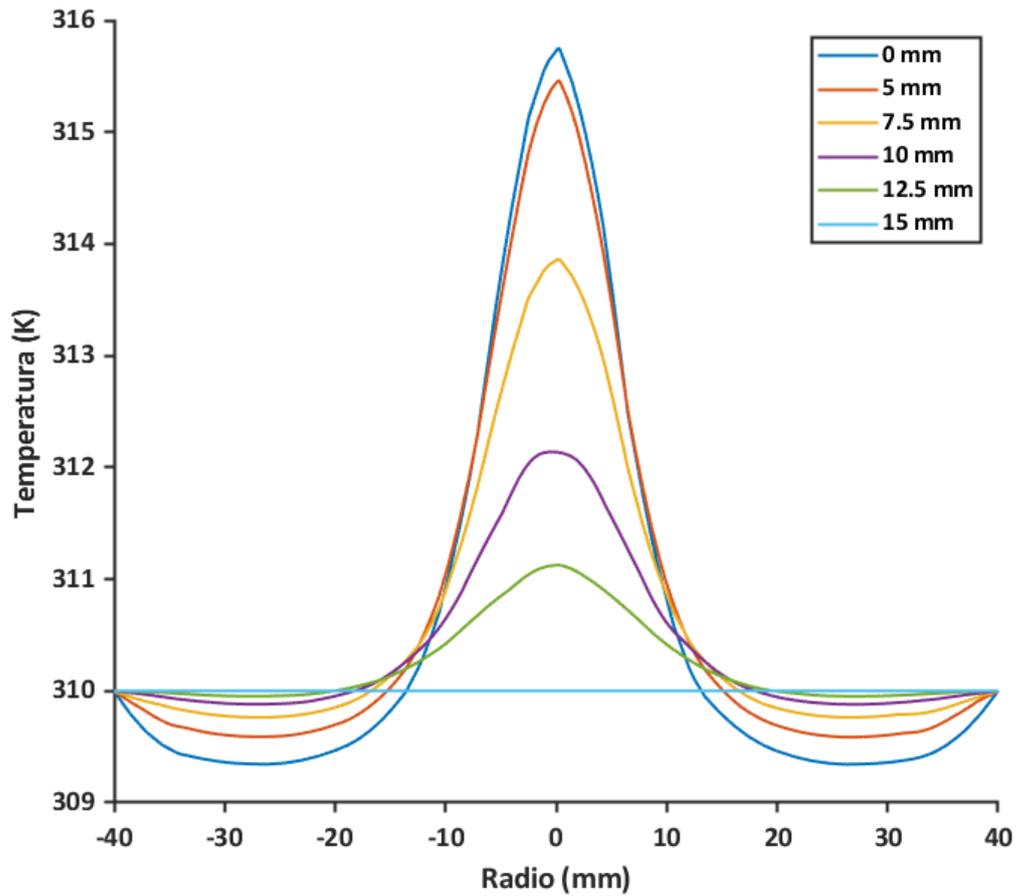


Figura 32. Distribución radial de la temperatura para 10 minutos de irradiación y una concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$ .

En la Figura 33, se representa la distribución volumétrica en estas condiciones de irradiación.

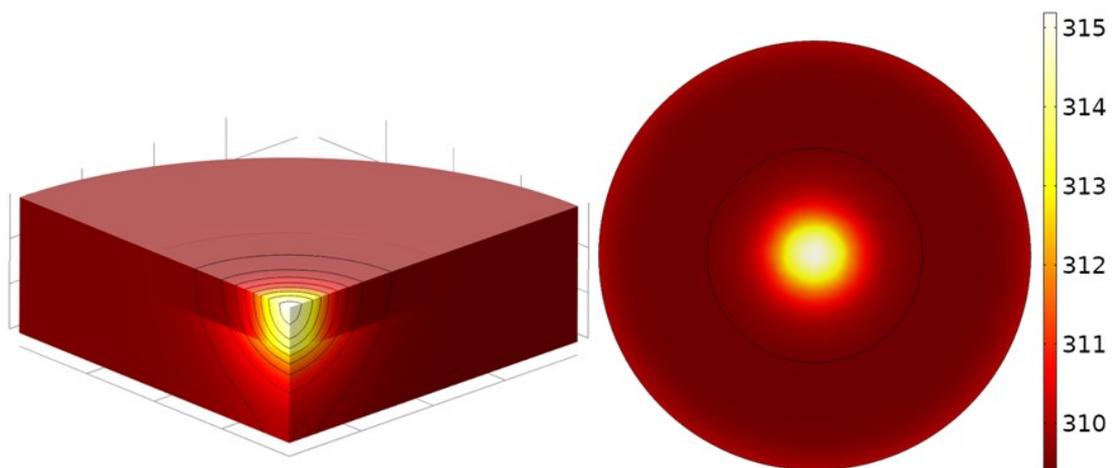


Figura 33. Distribución volumétrica de la temperatura para 10 minutos de irradiación y una concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$ .

### 5.2.3. Modelo 3

En el tercer modelo de estudio se aplica una potencia del láser de 1 W.

En la Figura 34, se muestra la evolución temporal de la temperatura para distintas concentraciones de nanopartículas en estas condiciones de potencia para un radio de aplicación de 2mm.

En primer lugar, se observa que la temperatura aumenta drásticamente en todos los casos durante los 200 primeros segundos pero que a partir de los 400 segundos tiene muy poca variación.

Se quiere conocer qué valores de concentración consiguen causar la muerte celular. Tal y como se observa en la Figura 34, a partir de una concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se alcanzan temperaturas demasiado elevadas. Además, para la concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  la temperatura no alcanza los 42  $^{\circ}\text{C}$ , por lo que tampoco se provoca muerte celular en estas condiciones de irradiación.

Por tanto, se establecen como márgenes de interés las concentraciones de 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

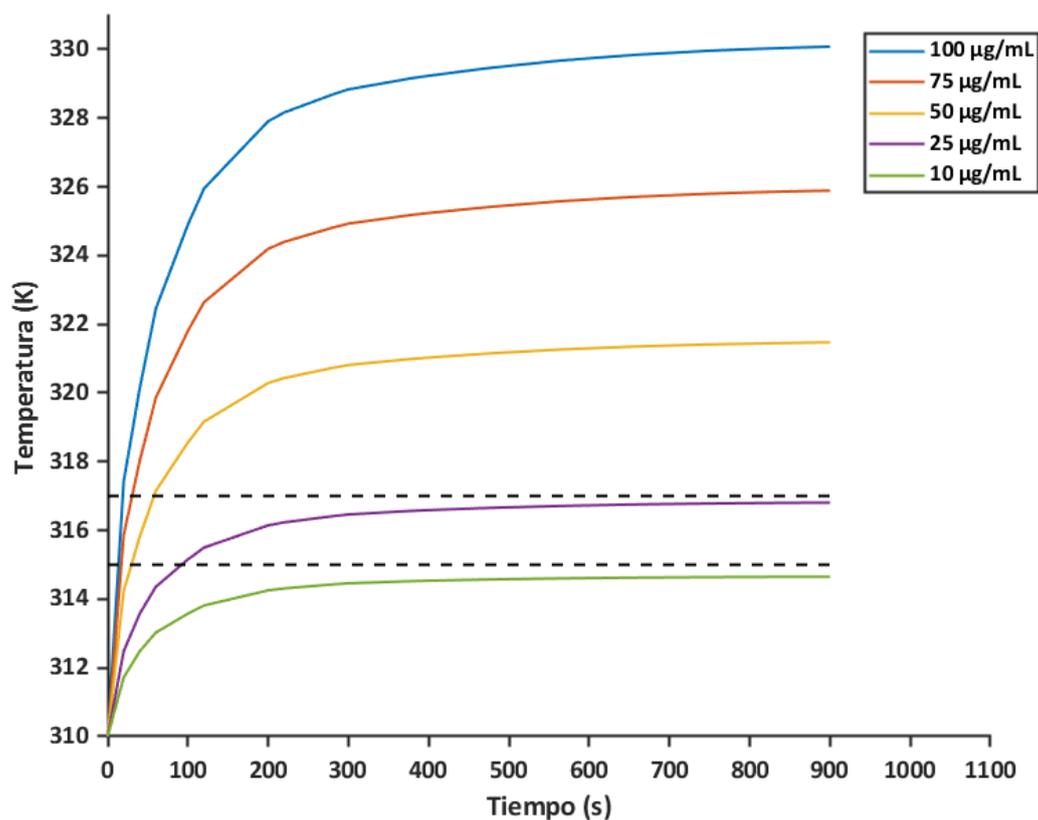


Figura 34. Evolución temporal de la temperatura para distintas concentraciones de nanopartículas para una potencia de 1W y un radio de aplicación de 2mm.

En la Figura 35, se representa la distribución temporal de temperatura para concentraciones mayores que 15  $\mu\text{g/mL}$  y menores que 30  $\mu\text{g/mL}$ .

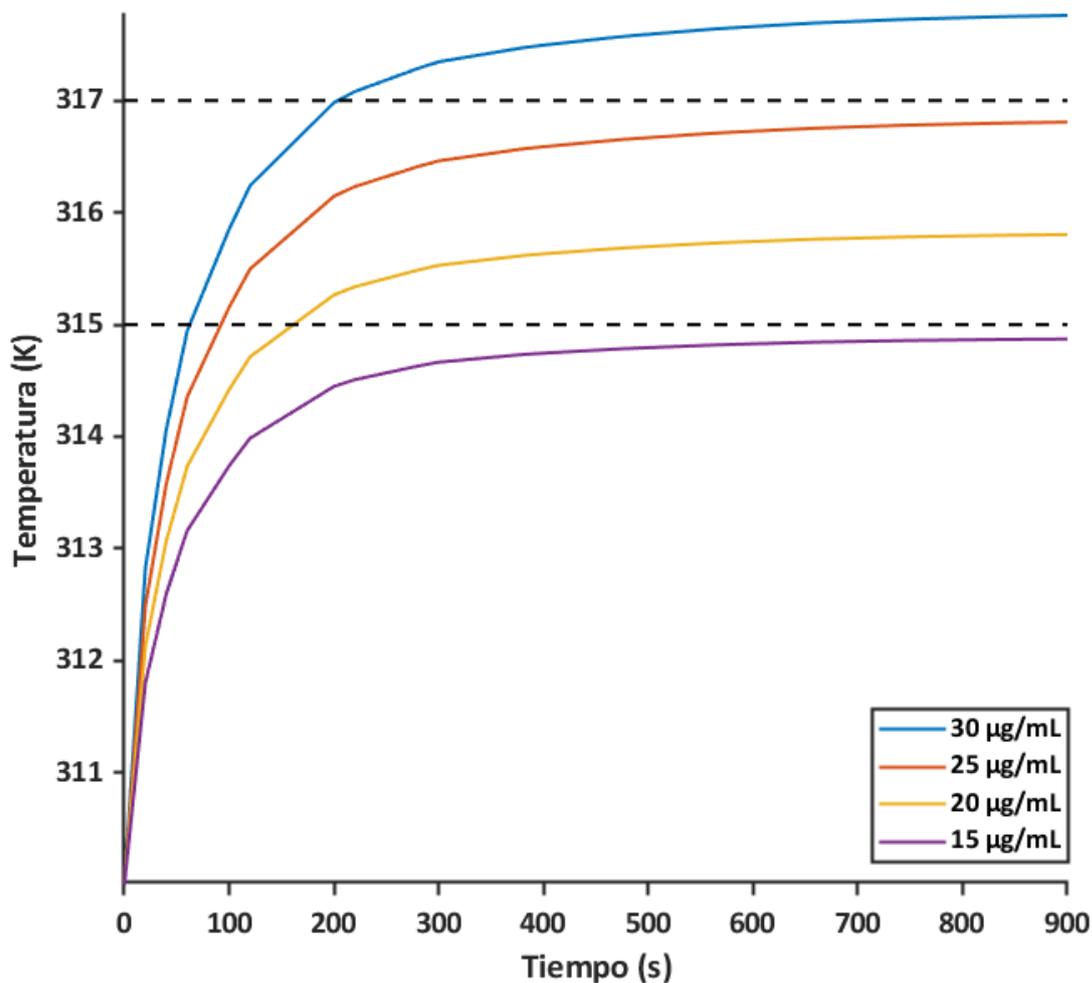


Figura 35. Evolución temporal de la temperatura para concentraciones comprendidas entre 15  $\mu\text{g/mL}$  y 30  $\mu\text{g/mL}$ .

Los valores obtenidos para las distintas concentraciones y tiempos de irradiación son los que se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Valores temporales de temperatura para concentraciones comprendidas entre 15  $\mu\text{g/mL}$  y 30  $\mu\text{g/mL}$ .

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Temperatura (K)		
	5 min	10 min	15 min
15	314.7	314.8	314.9
20	315.5	315.7	315.8
25	316.5	316.7	316.8
30	317.4	317.6	317.7

Se observa que la evolución temporal no influye notablemente en el aumento de temperatura, pues a partir de los 5 minutos la temperatura se empieza a estabilizar teniendo pequeñas variaciones. El valor más óptimo de concentración se encuentra entre 20  $\mu\text{g/mL}$  y 25  $\mu\text{g/mL}$ . Se va a utilizar una concentración de 25  $\mu\text{g/mL}$ , pues los niveles de toxicidad son muy reducidos y consigue elevar la temperatura hasta 43.5  $^{\circ}\text{C}$ .

La diferencia de temperatura entre 10 y 15 minutos de irradiación es despreciable, por lo que se establece como tiempo de irradiación óptimo para esta potencia de 5 minutos.

En la Figura 36 y en la Figura 37 se representa, respectivamente, la distribución radial de la temperatura para distintas profundidades del volumen de aplicación y la distribución volumétrica de temperatura.

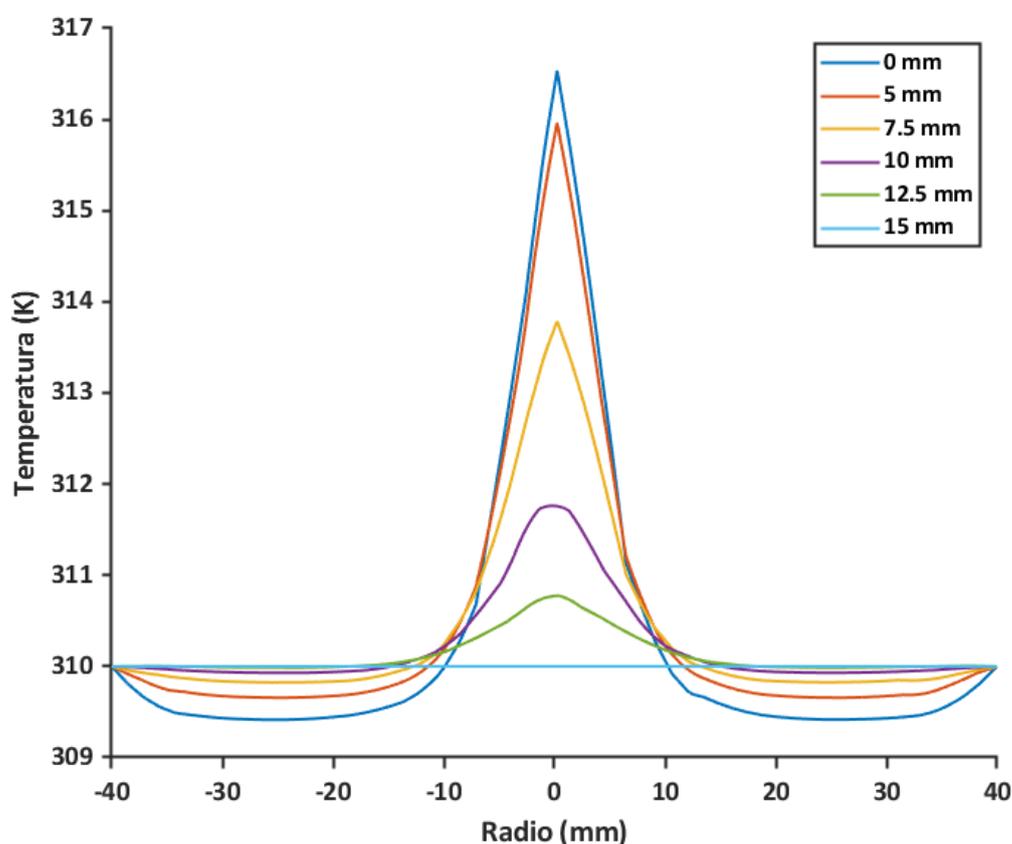


Figura 36. Distribución radial de la temperatura para 5 minutos de irradiación y una concentración de 25  $\mu\text{g/mL}$ .

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

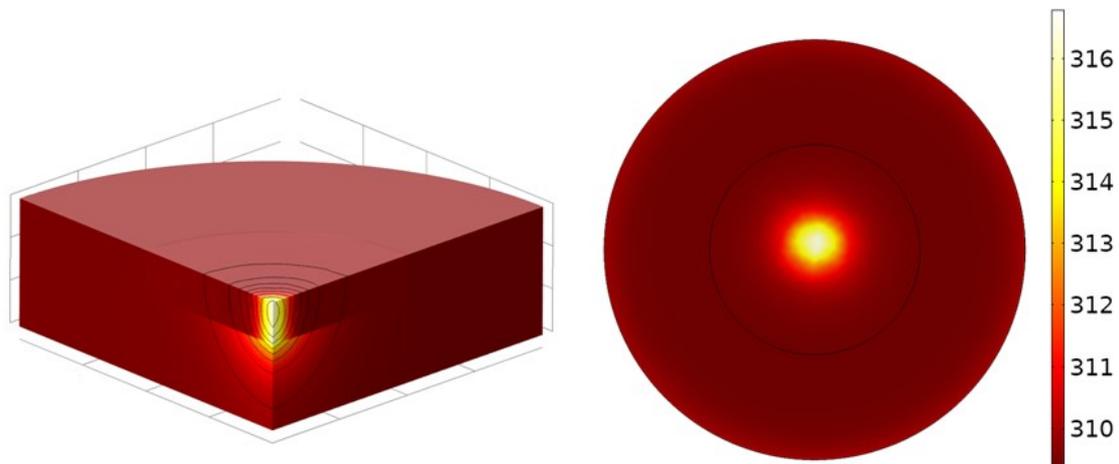


Figura 37. Distribución volumétrica de la temperatura para 5 minutos de irradiación y una concentración de 25  $\mu\text{g/mL}$ .

Se observa de nuevo como el radio de aplicación condiciona el área de aumento de temperatura, pues solamente se consigue elevar la temperatura en un radio de 2 mm. Además, se observa que en la superficie se alcanza la mayor temperatura. Para un valor de profundidad de 7.5 mm ya no se logra causar hipertermia., lo cual no supone ningún problema en este caso ya que el tumor tiene una profundidad de 5 mm.

Para conocer si es posible aumentar la temperatura en un radio mayor, para poder tratar homogéneamente tumores de mayor tamaño se estudia el efecto de irradiar 1 W de potencia en un haz de 5 mm de radio.

En la Figura 38, se observa que, al aumentar el radio de aplicación, la temperatura alcanzada es menor. Esto es debido a que el valor de la irradiancia es inversamente proporcional al radio de aplicación. Por este motivo son necesarios valores de concentración más elevados para conseguir las temperaturas de interés.

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

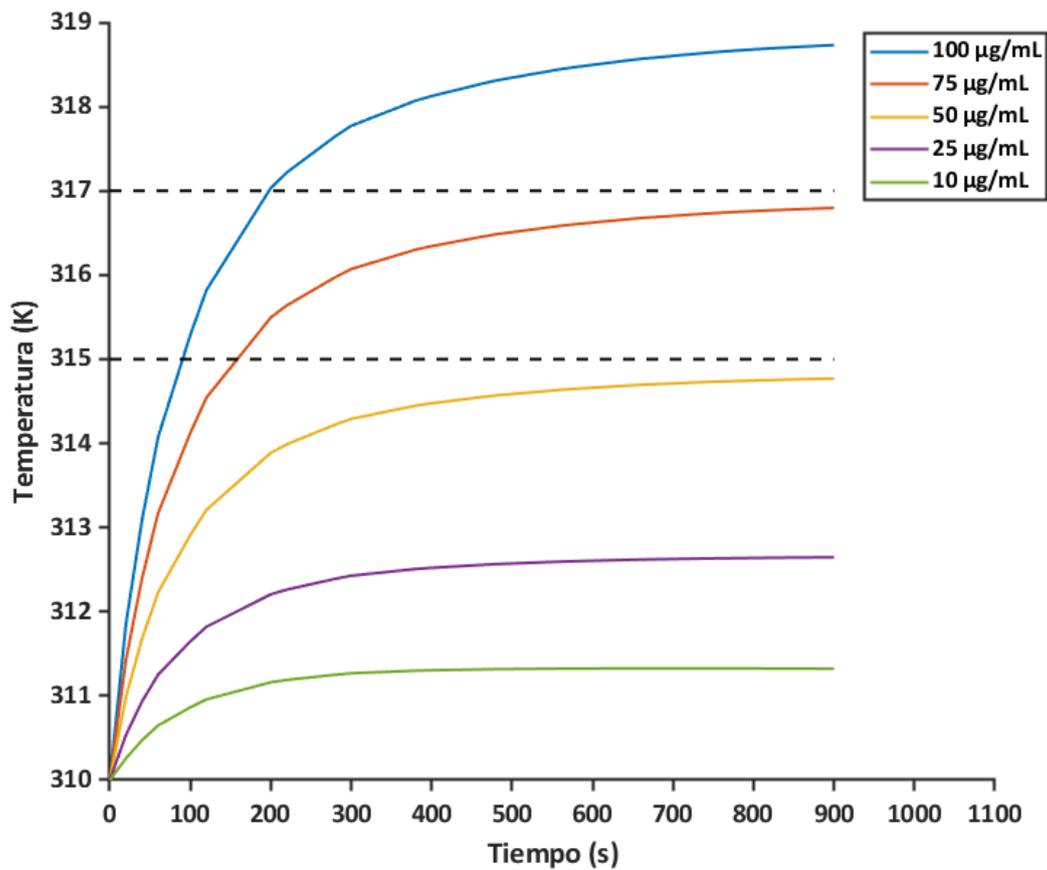


Figura 38. Evolución temporal de la temperatura para distintas concentraciones de nanopartículas para una potencia de 1 W y un radio de aplicación de 5mm.

Los valores de concentración que logran aumentar suficientemente la temperatura son los mayores que 50 µg/mL y menores que 100 µg/mL. En la Figura 39, se representa la distribución temporal para distintos valores de concentración en este rango de aplicación.

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

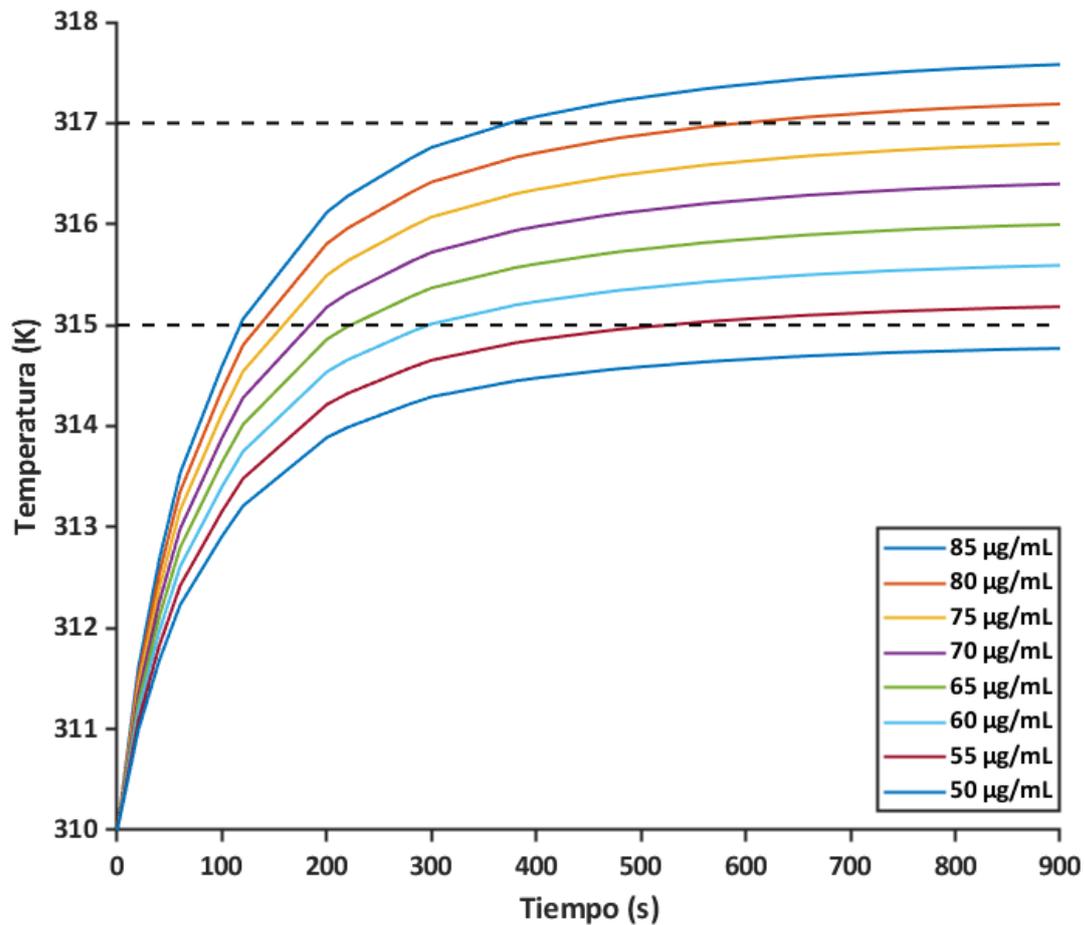


Figura 39. Evolución temporal de la temperatura para concentraciones comprendidas entre 50 µg/mL y 85 µg/mL.

Entre los valores representados en la Tabla 11, los más óptimos son los obtenidos para las concentraciones de 65 µg/mL a 85 µg/mL. Se establece como valor óptimo el de 75 µg/mL por ser el valor intermedio de concentración y de temperatura para causar hipertermia. Además, tal y como ha ocurrido para un radio de aplicación de 2 mm y misma potencia, el tiempo de irradiación más idóneo es el de 5 minutos, ya que consigue la temperatura de interés.

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

Tabla 10. Valores temporales de temperatura para concentraciones comprendidas entre 50  $\mu\text{g/mL}$  y 85  $\mu\text{g/mL}$ .

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Temperatura (K)		
	5 min	10 min	15 min
50	314.3	314.6	314.8
55	314.6	315	315.2
60	315	315.5	315.6
65	315.3	315.8	316
70	315.7	316.2	316.3
75	316	316.6	316.8
80	316.5	317	317.2
85	316.7	317.4	317.6

En la Figura 40, se comprueba que al aumentar el radio de aplicación, se eleva la temperatura en un área mayor. Aun así, se consigue alcanzar 42 °C para un radio de 4 mm y 43 °C para un radio de 2.5 mm.

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

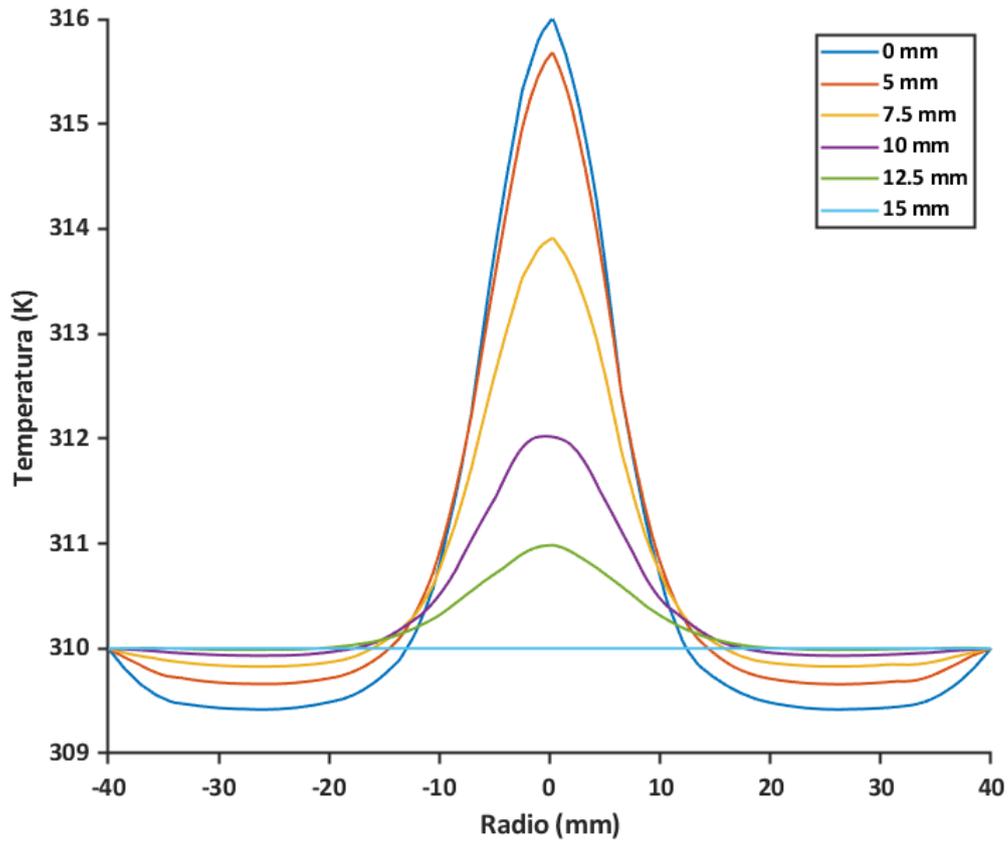


Figura 40. Distribución radial de la temperatura para 5 minutos de irradiación y una concentración de 75  $\mu\text{g/mL}$ .

En la Figura 41, se representa la distribución volumétrica de la temperatura en estas condiciones de irradiación.

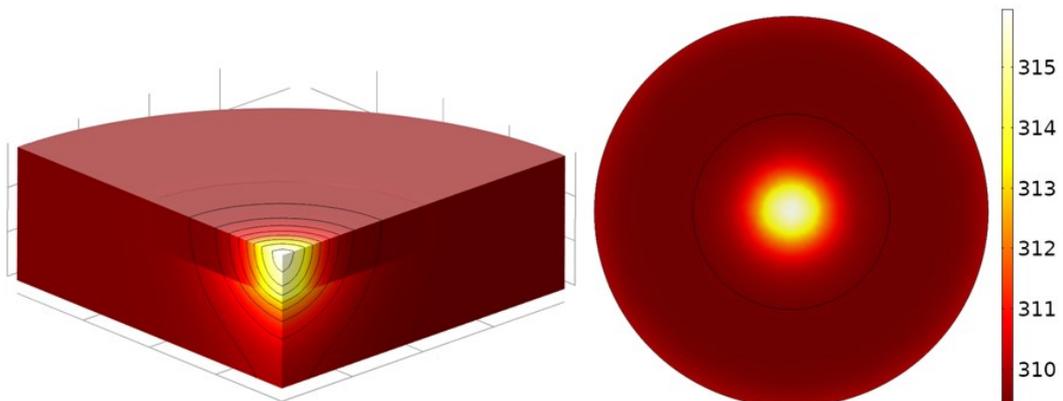


Figura 41. Distribución volumétrica de la temperatura para 5 minutos de irradiación y una concentración de 75  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 5.2.4. Modelo 4

En el cuarto modelo de estudio se aumenta la potencia de aplicación hasta 1.2 W.

En primer lugar, se va a estudiar el efecto de irradiar con esta potencia en un radio de aplicación de 2mm.

En la Figura 42, se observa la evolución temporal de la temperatura para distintas concentraciones bajo estas características de irradiación. El rango de temperaturas alcanzado es el mayor de todos los modelos debido al aumento de la potencia de aplicación. En este caso se consigue aumentar la temperatura hasta valores objetivo para concentraciones mucho menores, por debajo de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

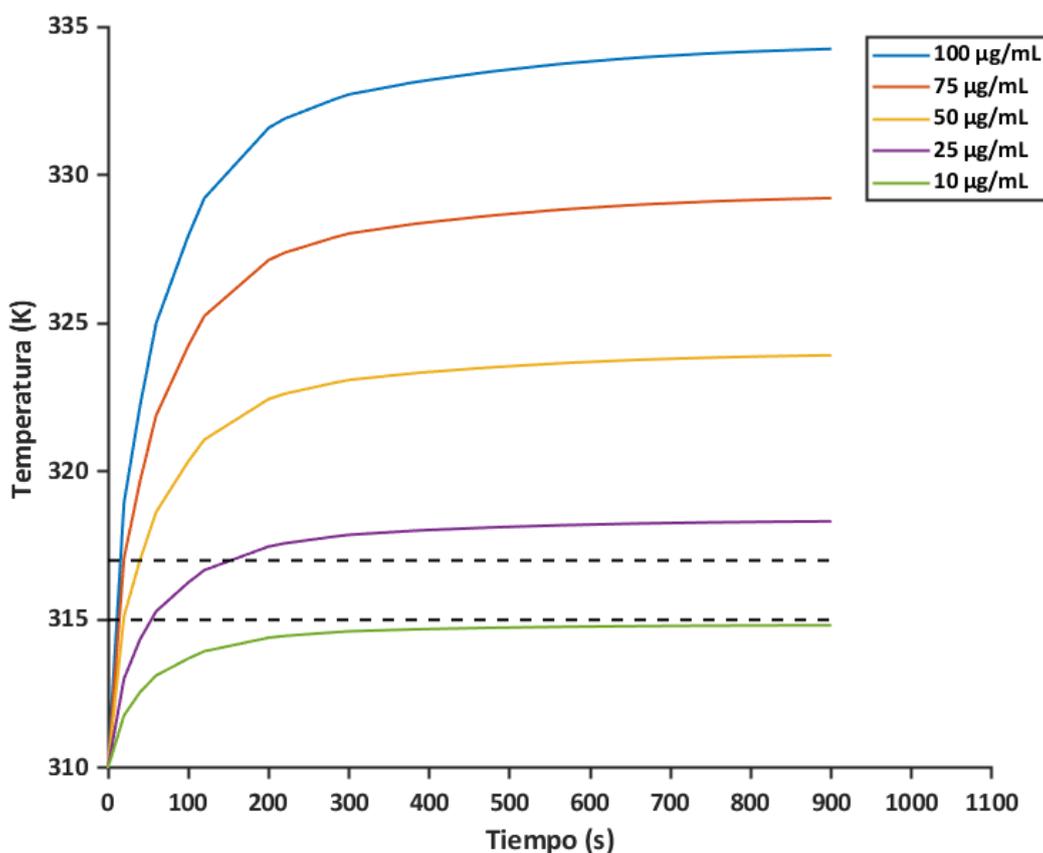


Figura 42. Evolución temporal de la temperatura para distintas concentraciones de nanopartículas para una potencia de 1.2 W y un radio de aplicación de 2 mm.

En la Figura 43, se representa la evolución temporal de la temperatura para las concentraciones objetivo. Como para una concentración de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se eleva demasiado la temperatura, se estudia la distribución temporal de la temperatura para concentraciones comprendidas entre 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Entre los valores obtenidos en la Tabla 12, se concluye que el valor más óptimo de concentración es de 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , para 5 minutos de aplicación, pues se consigue alcanzar una temperatura de 42.7  $^{\circ}\text{C}$ , suficiente para causar la apoptosis celular.

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

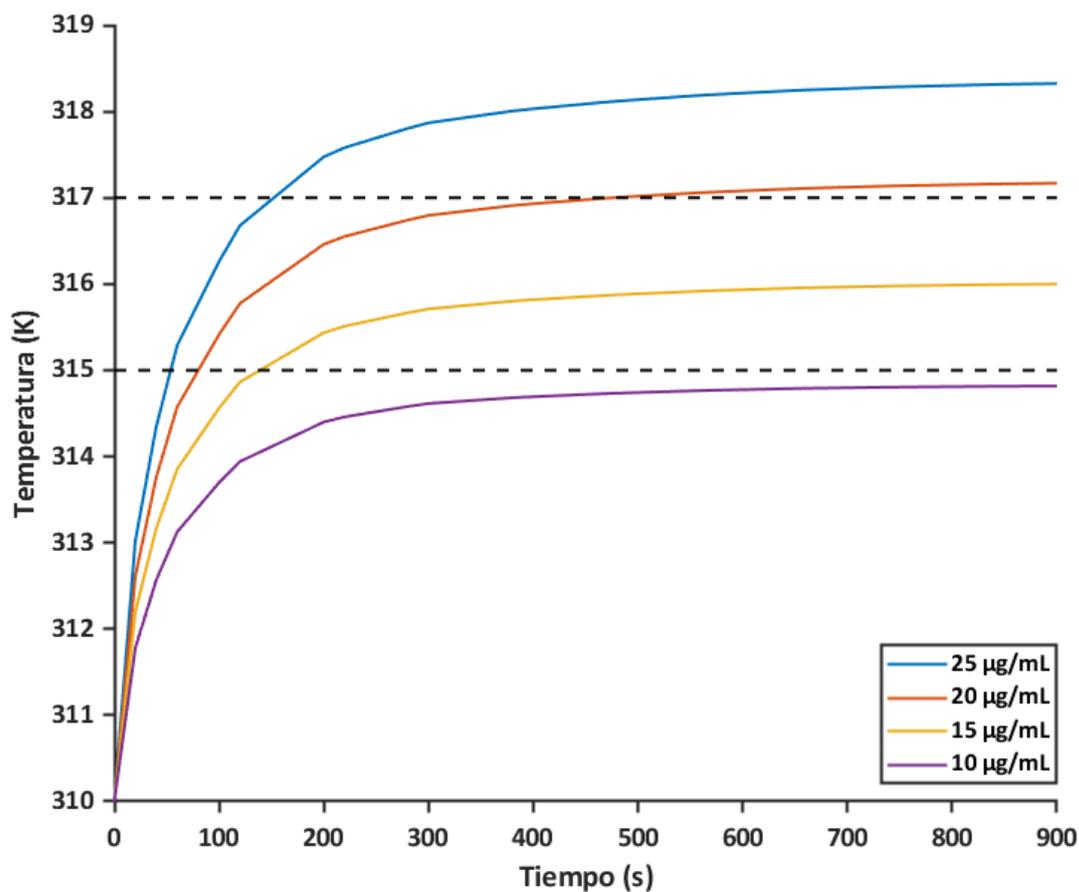


Figura 43. Evolución temporal de la temperatura para concentraciones comprendidas entre 10 µg/mL y 25 µg/mL.

Tabla 11. Valores temporales de temperatura para concentraciones comprendidas entre 10 µg/mL y 25 µg/mL.

Concentración (µg/mL)	Temperatura (K)		
	5 min	10 min	15 min
10	314.6	314.7	314.8
15	315.7	316	316.1
20	316.8	317	317.2
25	317.9	318.2	318.3

En la Figura 44, se representa la distribución radial de la temperatura para 5 minutos de irradiación y para una concentración administrada de 15 µg/mL. Se observa, de la misma forma que en los modelos anteriores, que se consigue alcanzar la temperatura sobre la zona más próxima al punto de irradiación y que la temperatura alcanzada es mayor en las zonas superficiales del volumen que en las internas.

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

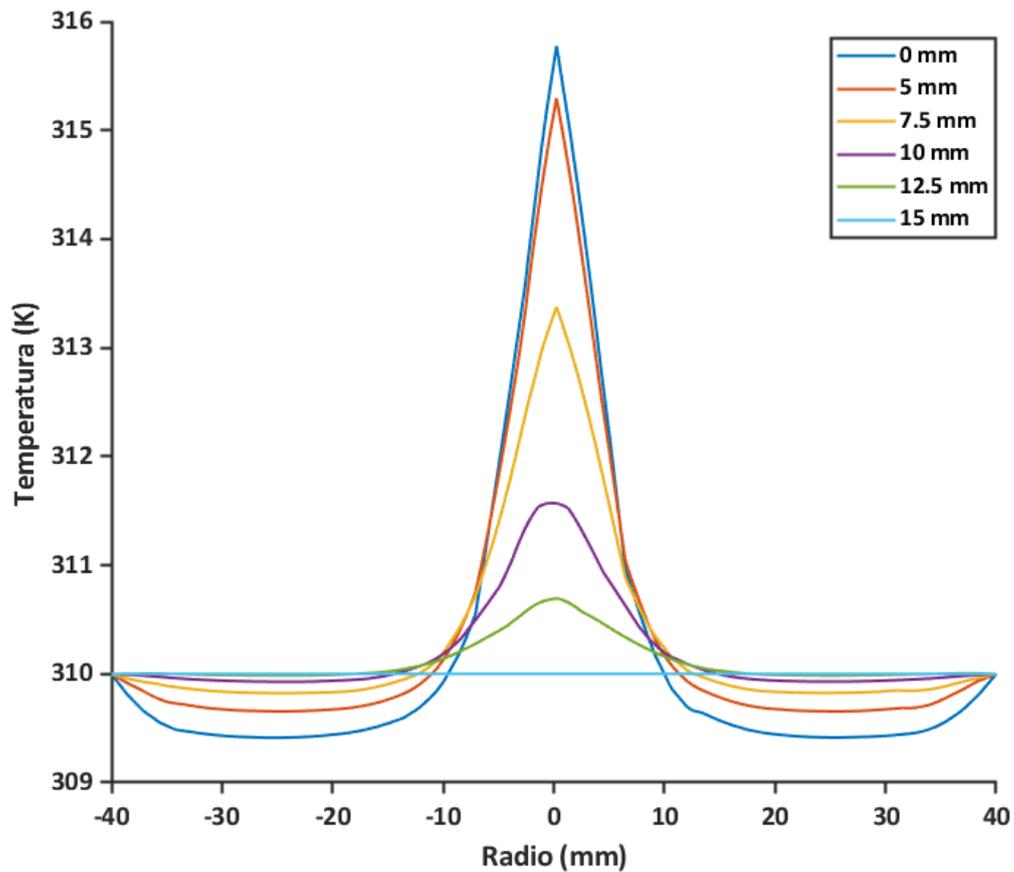


Figura 44. Distribución radial de la temperatura para 5 minutos de irradiación y una concentración de 15  $\mu\text{g/mL}$ .

En la Figura 45, se representa la distribución volumétrica de la temperatura en estas condiciones de irradiación.

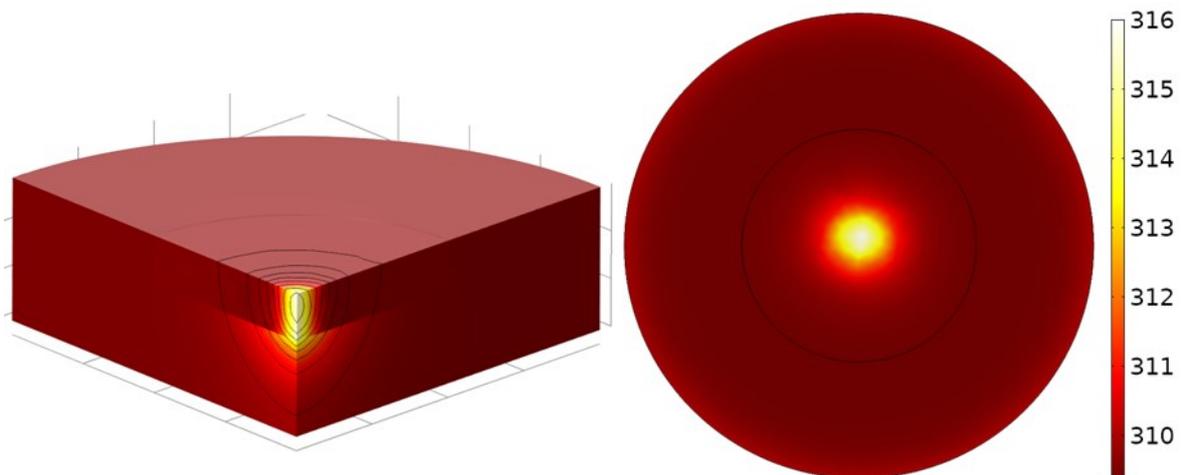


Figura 45. Distribución volumétrica de la temperatura para 5 minutos de irradiación y una concentración de 15  $\mu\text{g/mL}$ .

Para comprobar si para esta potencia se puede aumentar la temperatura en una área más significativa se incrementa el radio de aplicación del láser a 5 mm.

En la Figura 46, se representa la evolución temporal de la temperatura en estas condiciones de irradiación.

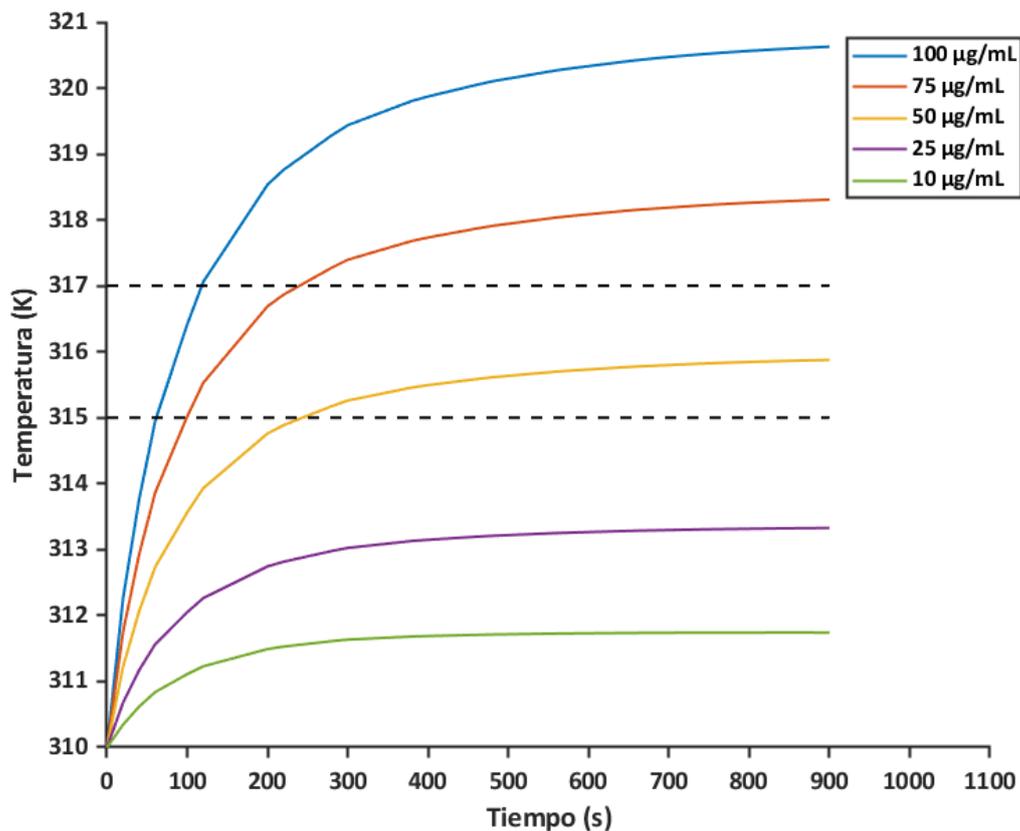


Figura 46. Evolución temporal de la temperatura para distintas concentraciones de nanopartículas para una potencia de 1.2 W y un radio de aplicación de 5 mm.

Para una concentración de 50 µg/mL se consigue causar el efecto de hipertermia óptica.

Por este motivo se estudia la distribución temporal de la temperatura para concentraciones entre 50 µg/mL y 75 µg/mL, tal y como se muestra en la Figura 47. Los valores obtenidos en la Tabla 13 y representados en la Figura 47, muestran que los valores más óptimos de concentración para conseguir causar la muerte celular son los comprendidos entre 55 µg/mL y 70 µg/mL. Administrando 60 µg/mL se consigue elevar la temperatura a 43 °C, por lo que se establecen estas condiciones como las más óptimas.

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

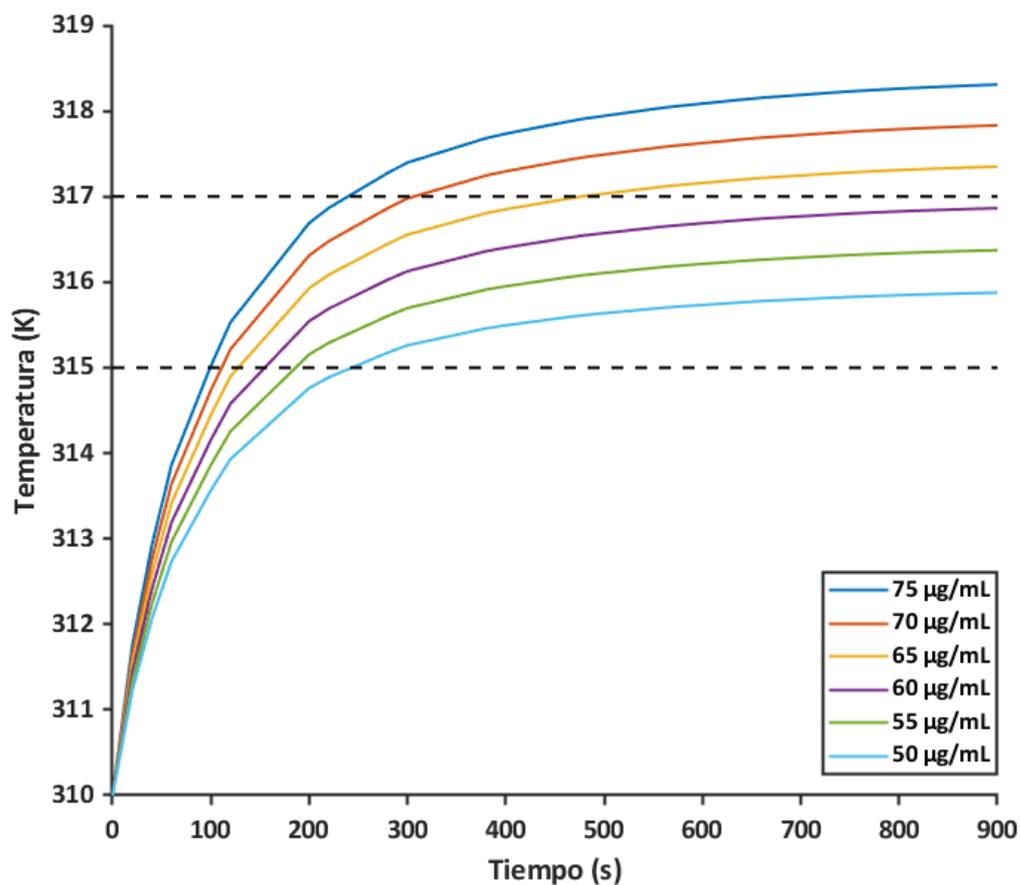


Figura 47. Evolución temporal de la temperatura para concentraciones comprendidas entre 50 µg/mL y 75 µg/mL.

Tabla 12. Valores temporales de temperatura para concentraciones comprendidas entre 50 µg/mL y 75 µg/mL

Concentración (µg/mL)	Temperatura (K)		
	5 min	10 min	15 min
50	315.3	315.7	315.9
55	315.7	316.2	316.4
60	316.1	316.7	316.8
65	316.5	317.1	317.3
70	316.9	317.6	317.8
75	317.4	318	318.3

En la Figura 48, se representa la distribución radial de la temperatura para 5 minutos de irradiación y una concentración de 60 µg/mL, con un radio de aplicación de 5 mm.

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

Se puede observar que se consigue aumentar la temperatura en un radio mayor. Además, análogamente al caso anterior, las zonas más superficiales consiguen una temperatura más elevada.

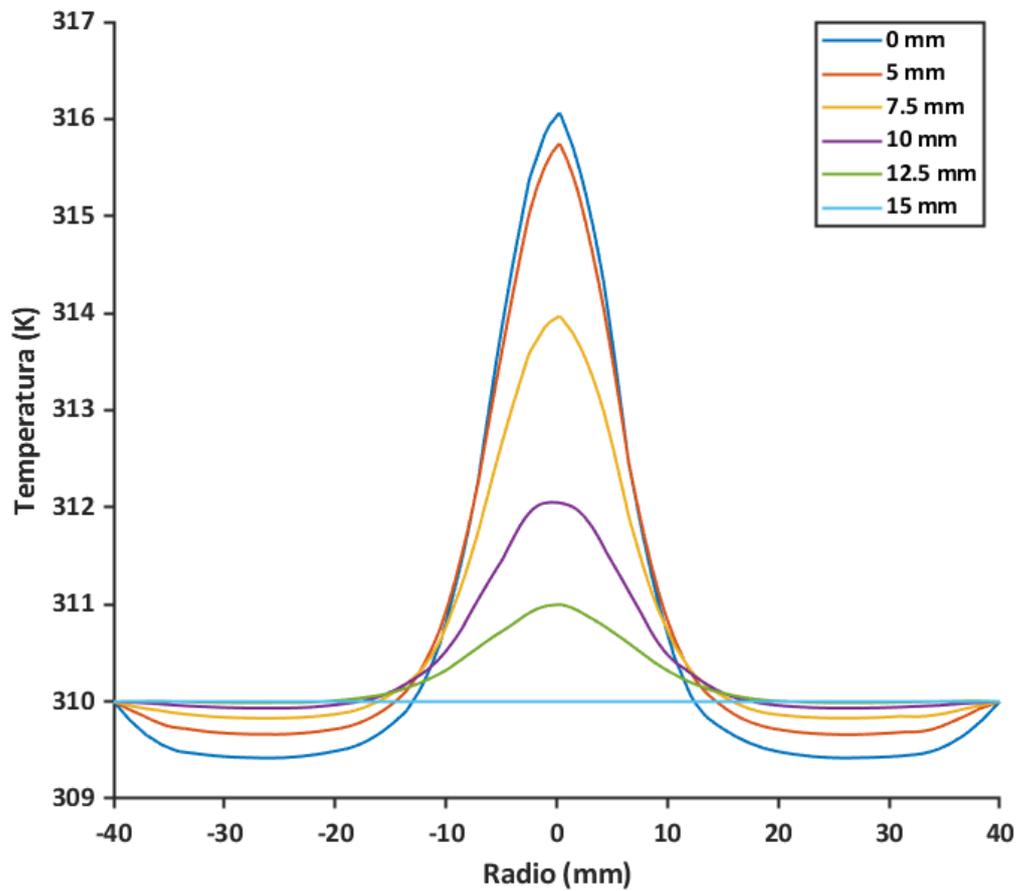


Figura 48. Distribución radial de la temperatura para 5 minutos de irradiación y una concentración de  $60 \mu\text{g/mL}$ .

En la Figura 49, se representa la distribución volumétrica de la temperatura.

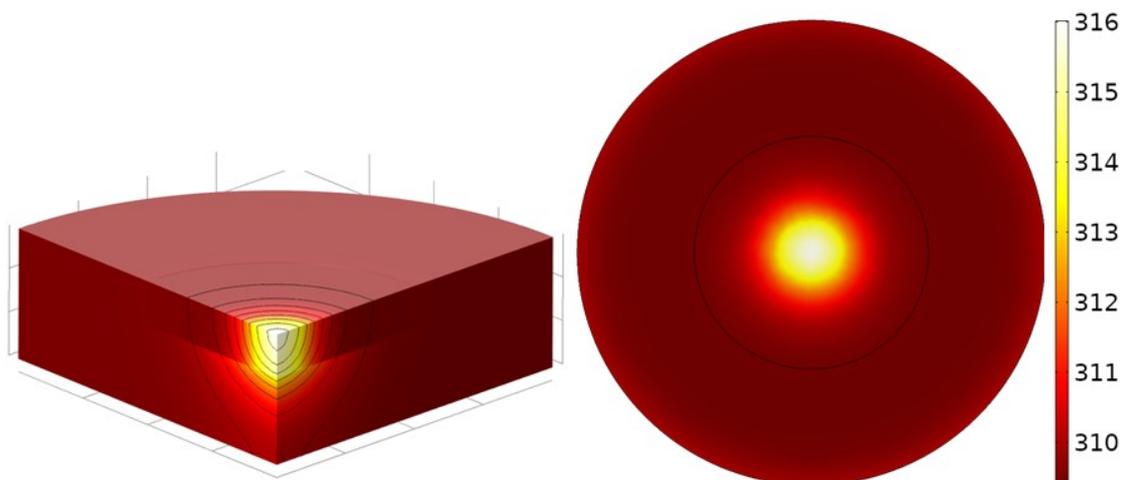


Figura 49. Distribución volumétrica de la temperatura para 5 minutos de irradiación y una concentración de  $60 \mu\text{g/mL}$ .

### 5.2.5. Comparativa de los resultados

Los resultados experimentales y computacionales muestran distintas dependencias entre parámetros.

En los ensayos experimentales se ha estudiado el nivel de citotoxicidad de las nanoestrellas administradas. Se ha demostrado que a partir de una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se empieza a producir un efecto tóxico sobre los cultivos celulares. Aun así, resulta más óptimo administrar las dosis más reducidas posibles en tratamientos terapéuticos, para favorecer su posterior eliminación y causar un efecto adverso nulo. Debido a este motivo, en los distintos estudios computacionales realizados para los cuatro modelos de irradiación, se han seleccionado las concentraciones de nanopartículas más bajas que consiguen elevar la temperatura hasta el rango objetivo en la zona de interés.

Se ha observado que la potencia y la concentración administrada son inversamente proporcionales. Cuando mayor es la potencia, menor es la concentración necesaria para conseguir aumentar la temperatura hasta los valores de interés.

Además, los resultados indican que se produce un elevado aumento de la temperatura durante los 5 primeros minutos de irradiación pero que después, la temperatura empieza a estabilizarse con una ligera tendencia positiva.

En la Figura 50, se muestra como los valores de concentración utilizados se ven reducidos a medida que se aumenta la potencia, para un radio de aplicación de 2 mm y 5 minutos de irradiación.

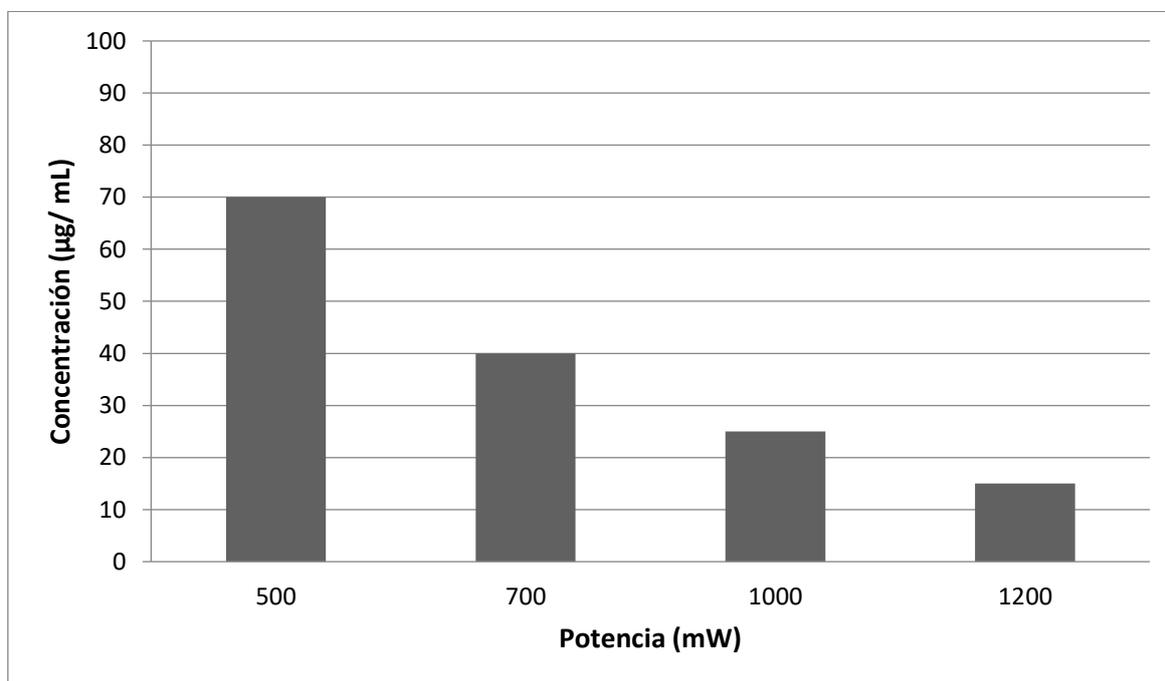


Figura 50. Comparativa de las distintas dosis de nanopartículas administradas para cada potencia estudiada con un radio de aplicación de 2 mm.

Por lo que hace al radio de irradiación, a medida que aumenta disminuye la temperatura alcanza al aplicar una misma potencia. Esto se debe a que el valor de irradiancia se ve reducido. Aumentar el radio de aplicación permite tratar el volumen completo de un tumor de forma

homogénea, aplicando la irradiación en el centro. El problema de aumentar el radio de aplicación es que aumenta a su vez la concentración administrada para lograr las temperaturas de interés. Una solución en este caso es aumentar el tiempo de irradiación, pues aunque varía ligeramente puede conseguir llegar a los valores de temperatura necesarios para causar hipertermia.

Respecto a la temperatura alcanzada a distintas profundidades del tejido se observa que se consigue elevar la temperatura correctamente hasta 5 mm de profundidad, valor idóneo, pues el tumor que se está simulando tiene esta profundidad.

Se puede considerar que el valor más óptimo entre los estudiados se encuentra entre las potencias de 1 W y 1.2 W, pues consiguen causar la apoptosis celular en 5 minutos de aplicación y para concentraciones más reducidas. Se puede seleccionar como mejor alternativa un haz laser de 1 W de potencia, ya que no existen diferencias significativas entre la concentración utilizada en estas dos potencias de aplicación. Además, para esta potencia de aplicación las concentraciones necesarias para un radio de 5 mm no son elevadas, por lo que se puede aplicar en ambas variantes.

## CAPÍTULO 6: Conclusiones

El objetivo de este Trabajo de Fin de Máster era verificar el funcionamiento de un equipo de hipertermia óptica mediante tratamientos sobre cultivos celulares mediados por nanoestrellas y desarrollar un software para la simulación de la respuesta térmica del tejido cutáneo ante la producción de hipertermia óptica.

En primer lugar, se ha conseguido verificar el correcto funcionamiento del equipo de hipertermia óptica, así como realizar los distintos ensayos de toxicidad para conocer el efecto de administrar las nanoestrellas diseñadas sobre los tejidos celulares objetivo.

En segundo lugar, se ha desarrollado un software que simula la aplicación de hipertermia óptica sobre tejido cutáneo, así como la respuesta ante la variación de los parámetros de esta técnica.

Las conclusiones concretas que se han extraído en este proyecto son las que se mencionan a continuación.

El equipo de hipertermia óptica, así como el software que lo respalda funciona correctamente en aplicaciones experimentales sobre cultivos celulares, ya que consigue aumentar la temperatura de las distintas muestras, así como ajustar y almacenar los parámetros de estudio.

Las nanoestrellas diseñadas se pueden utilizar sobre las líneas celulares HeLa y Sk-mel con concentraciones de hasta 100  $\mu\text{g/mL}$ , para evitar los efectos citotóxicos asociados a una concentración excesiva de estas.

Los cultivos celulares Sk-mel presentan una menor resistencia al tratamiento experimental de hipertermia óptica que los cultivos celulares HeLa.

El software diseñado para la simulación de la producción de hipertermia óptica permite recrear un tratamiento de estas características de forma correcta.

La concentración de nanopartículas administrada sobre tejido celular es inversamente proporcional a la potencia aplicada.

El radio de aplicación de irradiación es inversamente proporcional a la temperatura obtenida en el tejido, para condiciones iguales de potencia y de concentración.

El aumento de la temperatura se concentra en las zonas superficiales y cercanas al punto de incidencia del haz láser mientras que el tejido adyacente permanece a temperatura más baja.

Por último, se determina que dependiendo del tamaño del cáncer puede ser necesario aplicar varios puntos de irradiación para tratar la totalidad del volumen cancerígeno.

## CAPÍTULO 7: Limitaciones y líneas de trabajo futuras

En este proyecto se presentan una serie de limitaciones. En primer lugar, debido a la situación ocasionada por la pandemia del COVID-19 no se han podido realizar suficientes ensayos de hipertermia sobre cultivos celulares, para conocer el efecto de variar empíricamente parámetros como la potencia. Además, no se han podido ajustar los valores de concentración administrada más óptimos para los tratamientos de hipertermia.

En segundo lugar, la simulación no incorpora la distribución real de las nanopartículas en el tejido cutáneo, pues se ha considerado una distribución uniforme en la zona de aplicación.

Se establecen por tanto las líneas futuras de este Trabajo de Fin de Máster que se citan a continuación.

- Estudiar experimentalmente la variación de los parámetros del equipo de hipertermia óptica en estudios sobre cultivos celulares.
- Conocer los valores de concentración más adecuados para cada aplicación.
- Realizar pruebas experimentales sobre tejidos cutáneos.
- Estudiar el efecto de biofuncionalizar las nanopartículas para conseguir una terapia mediada por fármacos.
- Realizar un modelo computacional que considere la distribución no uniforme de las nanopartículas en tejido cutáneo.
- Estudiar experimentalmente el efecto de aplicar los valores de potencia y concentraciones óptimos obtenidos en la simulación computacional.
- Establecer una estrategia de aplicación del láser en el mínimo número de puntos para producir hipertermia en toda la superficie tumoral. Para ello sería conveniente reducir el tiempo de exposición de cada punto al mínimo, aumentando si es necesaria la concentración de nanopartículas dentro de los niveles de toxicidad establecidos.

## CAPÍTULO 8: Referencias bibliográficas

- [1] R. Montes-Robles *et al.*, “Design of a low-cost equipment for optical hyperthermia,” *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 255, pp. 61–70, 2017, doi: 10.1016/j.sna.2016.12.018.
- [2] A. Hernández Montoto *et al.*, “Janus Gold Nanostars-Mesoporous Silica Nanoparticles for NIR-Light-Triggered Drug Delivery,” *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, vol. 25, no. 36, pp. 8471–8478, 2019, doi: 10.1002/chem.201900750.
- [3] A. Hernández Montoto *et al.*, “Gold Nanostars Coated with Mesoporous Silica Are Effective and Nontoxic Photothermal Agents Capable of Gate Keeping and Laser-Induced Drug Release,” *ACS applied materials & interfaces*, vol. 10, no. 33, pp. 27644–27656, 2018, doi: 10.1021/acsami.8b08395.
- [4] José Manuel Terrés Haro, “Diseño y desarrollo de un equipo de laboratorio para hipertermia óptica con posicionamiento de muestras e interfaz gráfica de usuario,” Trabajo Fin de Máster, Universitat Politècnica de València, València, 2018.
- [5] Z. Apalla, D. Nashed, R. B. Weller, and X. Castellsagué, “Skin Cancer: Epidemiology, Disease Burden, Pathophysiology, Diagnosis, and Therapeutic Approaches,” *Dermatology and therapy*, vol. 7, Suppl 1, pp. 5–19, 2017, doi: 10.1007/s13555-016-0165-y.
- [6] J. Schierbeck, T. Vestergaard, and A. Bygum, “Skin Cancer Associated Genodermatoses: A Literature Review,” *Acta dermato-venereologica*, vol. 99, no. 4, pp. 360–369, 2019, doi: 10.2340/00015555-3123.
- [7] B. Pedro Lobos and S. Andrea Lobos, “Cáncer de piel no-melanoma,” *Revista Médica Clínica Las Condes*, vol. 22, no. 6, pp. 737–748, 2011, doi: 10.1016/S0716-8640(11)70486-2.
- [8] M. Watson, D. M. Holman, and M. Maguire-Eisen, “Ultraviolet Radiation Exposure and Its Impact on Skin Cancer Risk,” *Seminars in oncology nursing*, vol. 32, no. 3, pp. 241–254, 2016, doi: 10.1016/j.soncn.2016.05.005.
- [9] J. Kato, K. Horimoto, S. Sato, T. Minowa, and H. Uhara, “Dermoscopy of Melanoma and Non-melanoma Skin Cancers,” *Frontiers in medicine*, vol. 6, p. 180, 2019, doi: 10.3389/fmed.2019.00180.
- [10] K. Tanese, Y. Nakamura, I. Hirai, and T. Funakoshi, “Updates on the Systemic Treatment of Advanced Non-melanoma Skin Cancer,” *Frontiers in medicine*, vol. 6, p. 160, 2019, doi: 10.3389/fmed.2019.00160.
- [11] T. Soleymani, M. Abrouk, and K. M. Kelly, “An Analysis of Laser Therapy for the Treatment of Nonmelanoma Skin Cancer,” *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.]*, vol. 43, no. 5, pp. 615–624, 2017, doi: 10.1097/DSS.0000000000001048.
- [12] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, “Cancer statistics, 2020,” *CA: a cancer journal for clinicians*, vol. 70, no. 1, pp. 7–30, 2020, doi: 10.3322/caac.21590.

- [13] K. Wolff, R. A. Johnson, A. P. Saavedra, and T. B. Fitzpatrick, *Fitzpatrick's color atlas and synopsis of clinical dermatology: Klaus Wolff, Richard Allen Johnson, Arturo P. Saavedra*, 7th ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2013.
- [14] Z. Apalla, A. Lallas, E. Sotiriou, E. Lazaridou, and D. Ioannides, "Epidemiological trends in skin cancer," *Dermatology practical & conceptual*, vol. 7, no. 2, pp. 1–6, 2017, doi: 10.5826/dpc.0702a01.
- [15] C. Naidoo, C. A. Kruger, and H. Abrahamse, "Simultaneous Photodiagnosis and Photodynamic Treatment of Metastatic Melanoma," *Molecules (Basel, Switzerland)*, vol. 24, no. 17, 2019, doi: 10.3390/molecules24173153.
- [16] M. Valko-Rokytovska, K. Bruchata, J. Simkova, M. Milkovicova, and Z. Kostecka, "Current trends in the treatment of malignant melanoma," *Neoplasma*, vol. 63, no. 3, pp. 333–341, 2016, doi: 10.4149/301\_151015N533.
- [17] American Cancer Society, *Treating Melanoma Skin Cancer*.
- [18] P. Terheyden, A. Krackhardt, and T. Eigentler, "The Systemic Treatment of Melanoma," *Deutsches Arzteblatt international*, vol. 116, 29-30, pp. 497–504, 2019, doi: 10.3238/arztebl.2019.0497.
- [19] J. Li *et al.*, "Celastrol Self-Stabilized Nanoparticles for Effective Treatment of Melanoma," *International journal of nanomedicine*, vol. 15, pp. 1205–1214, 2020, doi: 10.2147/IJN.S232603.
- [20] C. Beiu, C. Giurcaneanu, A. M. Grumezescu, A. M. Holban, L. G. Popa, and M. M. Mihai, "Nanosystems for Improved Targeted Therapies in Melanoma," *Journal of clinical medicine*, vol. 9, no. 2, 2020, doi: 10.3390/jcm9020318.
- [21] S. C. Baetke, T. Lammers, and F. Kiessling, "Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer," *The British journal of radiology*, vol. 88, no. 1054, p. 20150207, 2015, doi: 10.1259/bjr.20150207.
- [22] I. Brigger, C. Dubernet, and P. Couvreur, "Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, pp. 24–36, 2012, doi: 10.1016/j.addr.2012.09.006.
- [23] N. Elahi, M. Kamali, and M. H. Baghersad, "Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review," *Talanta*, vol. 184, pp. 537–556, 2018, doi: 10.1016/j.talanta.2018.02.088.
- [24] N. M. Dimitriou, A. Pavlopoulou, I. Tremi, V. Kouloulis, G. Tsigaridas, and A. G. Georgakilas, "Prediction of Gold Nanoparticle and Microwave-Induced Hyperthermia Effects on Tumor Control via a Simulation Approach," *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, vol. 9, no. 2, p. 167, 2019, doi: 10.3390/nano9020167.
- [25] R. S. Riley and E. S. Day, "Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: applications and opportunities for multimodal cancer treatment," *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*, vol. 9, no. 4, 2017, doi: 10.1002/wnan.1449.
- [26] P. Singh, S. Pandit, V. R. S. S. Mokkalapati, A. Garg, V. Ravikumar, and I. Mijakovic, "Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer," *International journal of molecular sciences*, vol. 19, no. 7, 2018, doi: 10.3390/ijms19071979.

- [27] Gian Franco Baronzio, E. Dieter Hager, *Hyperthermia in Cancer Treatment: A primer*. USA: Springer, 2006.
- [28] Y. Cheng, S. Weng, L. Yu, N. Zhu, M. Yang, and Y. Yuan, "The Role of Hyperthermia in the Multidisciplinary Treatment of Malignant Tumors," *Integrative cancer therapies*, vol. 18, 2019, doi: 10.1177/1534735419876345.
- [29] L. Zhu *et al.*, "Ultrasound Hyperthermia Technology for Radiosensitization," *Ultrasound in medicine & biology*, vol. 45, no. 5, pp. 1025–1043, 2019, doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2018.12.007.
- [30] A. N. Yakunin, Y. A. Avetisyan, and V. V. Tuchin, "Quantification of laser local hyperthermia induced by gold plasmonic nanoparticles," *Journal of biomedical optics*, vol. 20, no. 5, p. 51030, 2015, doi: 10.1117/1.JBO.20.5.051030.
- [31] K. Orthaber, M. Pristovnik, K. Skok, B. Perić, and U. Maver, "Skin Cancer and Its Treatment: Novel Treatment Approaches with Emphasis on Nanotechnology," *Journal of Nanomaterials*, vol. 2017, pp. 1–20, 2017, doi: 10.1155/2017/2606271.
- [32] X. Huang and M. A. El-Sayed, "Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy," *Journal of Advanced Research*, vol. 1, no. 1, pp. 13–28, 2010, doi: 10.1016/j.jare.2010.02.002.
- [33] K. Shurrab, N. Kochaji, and W. Bachir, "Development of Temperature Distribution and Light Propagation Model in Biological Tissue Irradiated by 980 nm Laser Diode and Using COMSOL Simulation," *Journal of lasers in medical sciences*, vol. 8, no. 3, pp. 118–122, 2017, doi: 10.15171/jlms.2017.21.
- [34] A. Sazgarnia, N. Naghavi, H. Mehdizadeh, and Z. Shahamat, "Investigation of thermal distribution for pulsed laser radiation in cancer treatment with nanoparticle-mediated hyperthermia," *Journal of thermal biology*, vol. 47, pp. 32–41, 2015, doi: 10.1016/j.jtherbio.2014.10.011.
- [35] Kawther Mohammad Shurrab, Moustafa Sayen EL-Daher, "Simulation and Study of Temperature Distribution in Living Biological Tissue under Laser Irradiation," *Journal of lasers in medical sciences*, vol. 5, no. 3, pp. 135–139, 2014.
- [36] N. N. Behnaz Gheflati, Ed., *Optimization of Laser Power for Laser-Induced Hyperthermia in the presence of nanoparticles using MATLAB and COMSOL Multiphysics*, 2019.
- [37] M. Pérez-Hernández, *Nanomaterials for Magnetic and Optical Hyperthermia Applications: Mechanisms of Cell Death Induced by Optical Hyperthermia*: Elsevier, 2019.
- [38] T. Fernandez Cabada, C. Sanchez Lopez de Pablo, A. Martinez Serrano, F. Del Pozo Guerrero, J. J. Serrano Olmedo, and M. Ramos Gomez, "Induction of cell death in a glioblastoma line by hyperthermic therapy based on gold nanorods," *International journal of nanomedicine*, vol. 7, pp. 1511–1523, 2012, doi: 10.2147/IJN.S28470.
- [39] ATCC, *HeLa ATCC® CCL-2™*. [Online]. Available: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-2.aspx#documentation> (accessed: Nov. 28 2020).

- [40] ATCC, *SK-MEL-2 ATCC® HTB-68™ Homo sapiens skin:derived from meta*. [Online]. Available: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-68.aspx> (accessed: Nov. 28 2020).
- [41] A. Villanueva *et al.*, “Hyperthermia HeLa Cell Treatment with Silica-Coated Manganese Oxide Nanoparticles,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 114, no. 5, pp. 1976–1981, 2010, doi: 10.1021/jp907046f.
- [42] *Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium·bromide* › *SERVA Electrophoresis GmbH*. [Online]. Available: [https://www.serva.de/enDE/ProductDetails/353\\_20395\\_3\\_4\\_5\\_Dimethyl\\_2\\_thiazolyl\\_2\\_5\\_diphenyl\\_2H\\_tetrazolium\\_bromide\\_research\\_grade\\_html](https://www.serva.de/enDE/ProductDetails/353_20395_3_4_5_Dimethyl_2_thiazolyl_2_5_diphenyl_2H_tetrazolium_bromide_research_grade_html) (accessed: Nov. 28 2020).
- [43] H. H. Pennes, “Analysis of Tissue and Arterial Blood Temperatures in the Resting Human Forearm,” *Journal of Applied physiology*, vol. 1, no. 2, pp. 93–123, 1948.
- [44] E. H. Wissler, “Pennes’ 1948 paper revisited,” *American Physiological Society*, 2020.
- [45] A. Lakhssassi, E. Kengne, and H. Semmaoui, “Modified pennes’ equation modelling bio-heat transfer in living tissues: analytical and numerical analysis,” *NS*, vol. 02, no. 12, pp. 1375–1385, 2010, doi: 10.4236/ns.2010.212168.
- [46] S. Soni, H. Tyagi, R. A. Taylor, and A. Kumar, “Investigation on nanoparticle distribution for thermal ablation of a tumour subjected to nanoparticle assisted thermal therapy,” *Journal of thermal biology*, vol. 43, pp. 70–80, 2014, doi: 10.1016/j.jtherbio.2014.05.003.
- [47] “Framework of the Bio-Heat Transfer for Laser/Cancer Treatment: Mhamed Nour, Mohammed Bougataya, Emmanuel Kengne, Karim El Guemhioui, Ahmed Lakhssassi,” *International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences*, vol. 5, no. 4, pp. 194–201, 2016.
- [48] O. B. P. Barvinschi, “A finite element method model to simulate the thermal response of vascularized tissue to laser irradiation.,” no. 610, 2017.

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA  
SUPERIOR INGENIERÍA  
INDUSTRIAL VALENCIA

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

# PRESUPUESTO

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

## ÍNDICE PRESUPUESTO

<b>1. Introducción</b> .....	101
<b>2. Coste personal</b> .....	101
<b>3. Coste de software</b> .....	101
<b>4. Coste hardware</b> .....	102
<b>5. Costes materiales experimentales</b> .....	103
<b>6. Coste total</b> .....	106

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Costes de personal. ....	101
<b>Tabla 2.</b> Costes de software. ....	102
<b>Tabla 3.</b> Costes equipos.....	103
<b>Tabla 4.</b> Costes equipos experimentales.....	104
<b>Tabla 5.</b> Costes materiales. ....	105
<b>Tabla 6.</b> Coste total sin IVA. ....	106
<b>Tabla 7.</b> Coste total. ....	106

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

## 1. Introducción

Se ha realizado el presupuesto del presente Trabajo de Fin de Máster con la finalidad de conocer los costes asociados al desarrollo e implementación de los procedimientos llevados a cabo.

Para ello se tienen que tener en cuenta los costes asociados al personal, al software y hardware que han sido empleados tanto en el diseño computacional como en el experimental. Además, se tienen que considerar los materiales utilizados en el desarrollo experimental.

A continuación, se detalla cada uno de los costes que se han citado con anterioridad.

## 2. Coste personal

El coste de personal es el coste asociado al trabajo realizado por las personas que han intervenido en el desarrollo del proyecto. En este caso se tiene en cuenta el trabajo llevado a cabo por una ingeniera industrial, que es la tutora del proyecto y por la autora del trabajo, una estudiante del máster en Ingeniería Biomédica.

En la Tabla 1 se incluyen los costes asociados al personal, teniendo en cuenta las horas trabajadas y el coste unitario estándar.

*Tabla 1. Costes de personal.*

<b>Perfil personal</b>	<b>Horas trabajadas</b>	<b>Coste unitario (€)</b>	<b>Coste total (€)</b>
<b>Ingeniera industrial</b>	30	60	1800
<b>Ingeniera biomédica</b>	350	40	14000
<b>TOTAL</b>			<b>15800</b>

## 3. Coste de software

Para el desarrollo computacional y experimental se han utilizado una serie de programas específicos, cuyo coste se encuentra recogido en la Tabla 2. En esta se detallan tanto las tareas implementadas por cada uno de los programas como el coste de la licencia y amortización.

Tabla 2. Costes de software.

Software	Tarea desarrollada	Amortización (meses)	Coste licencia (€)	Periodo de uso (meses)	Coste total según el periodo de uso (€)
Comsol Multiphysics	Modelado y simulación del proyecto	24	6485	5	1351
Matlab R2019b	Visualización y tratamiento de los datos obtenidos en el proyecto	6	Licencia de estudiante	5	-
Office 365	Word Excel PowerPoint	3	150	5	150
Windows 10	Sistema operativo utilizado	3	140	5	140
<b>TOTAL</b>					<b>1641</b>

#### 4. Coste hardware

Los costes asociados a los equipos hardware empleados se muestran en la Tabla 3. Por un lado, se ha utilizado un ordenador portátil para el desarrollo del estudio computacional y experimental y para la elaboración de la memoria. Entre estos costes se incluye a su vez el equipo de hipertermia óptica para la realización de las pruebas experimentales.

Tabla 3. Costes equipos.

Hardware	Tarea realizada	Periodo amortización (meses)	Coste unitario (€)	Periodo de uso (meses)	Coste total según el periodo de uso (€)
Ordenador portátil HP	Desarrollo del estudio computacional, control del equipo de hipertermia y redacción.	40	700	5	88
Equipo de hipertermia óptica	Realización de las pruebas de irradiación sobre cultivos celulares.	24	11882	2	990
<b>TOTAL</b>					1078

## 5. Costes materiales experimentales

Los costes experimentales se pueden dividir en los costes asociados a los reactivos y a los equipos del laboratorio. En la Tabla 4 se detallan los distintos equipos utilizados para la medida de los procedimientos llevados a cabo y la realización de las pruebas experimentales.

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

Tabla 4. Costes equipos experimentales.

<b>Material</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Periodo amortización (meses)</b>	<b>Coste unitario (€)</b>	<b>Periodo de uso (meses)</b>	<b>Coste total según el periodo de uso (€)</b>
<b>Incubadora</b>	1	3	325	2	217
<b>Sonicadora Fisherbrand FB 15047</b>	1	6	1316	2	439
<b>Campana Telster Bio IIA</b>	1	24	5716	2	476
<b>Baño de calor</b>	1	2	165	2	165
<b>Congelador</b>	1	5	1600	2	640
<b>Centrifugadora Koch Bunsen</b>	1	4	640	2	320
<b>Microscopio NIKON eclipse T5100</b>	1	6	1565	2	522
<b>TOTAL</b>					2779

Además, se han utilizado una serie de reactivos, materiales y cultivos celulares, tal y como se muestra en la Tabla 5.

Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo

Tabla 5. Costes materiales.

Material	Cantidad	Coste unitario (€)	Coste total (€)
Cámara de Neubauer	1	50	50
Células HeLa	1	758	758
Células Sk-mel	1	760	760
Medio DMEM	2	39	39
PBS	1	94	94
Antibiótico PS	1	17	17
DMSO	1	80	80
Tripsina	1	107	107
MTT Serva	1	17	17
Tripan Blue	1	23	23
Pipeta serológica (1 MI) (pack 100 ud)	1	14	14
Pipeta de dilución manual	4	215	860
Puntas de pipeta (pack 960 ud)	2	70	140
Falcon (pack 50 ud)	1	28	28
Placas de cultivo multipocillo (pack 50 ud)	1	65	65
Placas de cultivo (pack 20 ud)	1	16	16
<b>TOTAL</b>			<b>3095</b>

## 6. Coste total

El coste total engloba todos los costes asociados al desarrollo e implementación del Trabajo de Fin de Máster “Estudio del efecto de la concentración de nanopartículas en la aplicación de hipertermia óptica para el tratamiento de cáncer cutáneo”.

En la Tabla 6, se incluye el coste total sin IVA, mientras que en la tabla 7, se encuentra el coste total del presente trabajo.

*Tabla 6. Coste total sin IVA.*

<b>Categoría</b>	<b>Coste (€)</b>
<b>Coste de personal</b>	15800
<b>Coste de software</b>	1641
<b>Coste de hardware</b>	1078
<b>Coste de materiales experimentales</b>	5874
<b>COSTE TOTAL SIN IVA</b>	24393

*Tabla 7. Coste total.*

<b>Categoría</b>	<b>Coste (€)</b>
<b>Coste total sin IVA</b>	24393
<b>IVA (21%)</b>	5123
<b>COSTE FINAL</b>	29516