



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA**

Trabajo de Tesis Doctoral:

**ESTRATEGIAS APLICATIVAS DE LA TERAPIA
FOTODINÁMICA DEL CÁNCER EMPLEANDO
LEDs EN LUGAR DE LÁSERES BASADAS EN ESTUDIOS
SOBRE CULTIVOS DE CÉLULAS
TUMORALES, MODELOS ANIMALES Y RUTAS DE
TRASLACIÓN A PACIENTES.**

Director: GARAVAGLIA MARIO

Codirector: PONZINIBBIO CARLOS

Tesista: ETCHEVERRY MARÍA EUGENIA

Año:2019

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR

Dr. Mario Garavaglia

Dr. en Física

Profesor Emérito, UNLP

CODIRECTOR de TESIS

Dr. Carlos Ponzinibbio

Hematólogo

Profesor UNLP

CODIRECTOR de BECA

Dr. Miguel Pasquale

Dr. en Química

Profesor, UNLP

ASESORES MÉDICOS

Dr. Horacio Poteca, Oncólogo Especialista en TFD

Dr. Pedro González, Profesor UNLP

Dr. Martín Rabassa

ASESORA EN HPV

Lic. Estela Albanesi

Bioquímica, UNLP

ASESORES INGENIEROS

Ing. Aníbal Laquidara

Ing. Pablo Ixtaina, Director del LAL

Agradecimientos

No podemos determinar el momento exacto en el que nace la amistad.
Como al llenar un recipiente gota a gota,
hay una gota final que hace que se desborde,
del mismo modo que en una serie de gentilezas
hay una final que acelera los latidos del corazón.
(Fahrenheit 451, Ray Bradbury)

Mi más sincero agradecimiento a los Profesores Dr. Mario Garavaglia y al Dr. Miguel Pasquale, directores de mi trabajo, por sus valiosos consejos técnicos y humanos, y por la confianza depositada en mí.

Quiero mostrar un agradecimiento especial a los integrantes de la Cátedra de Patología B de la Facultad de Ciencias Médicas, en particular al Dr. Carlos Ponzinibio por la codirección y continua colaboración. También, agradezco al Dr. Horacio Poteca, por su inestimable asesoramiento en los aspectos clínicos de esta tesis.

Debo agradecer al Ing. Pablo Rubén Ixtaina del Laboratorio de Acústica y Luminotecnia (CIC) Lic. Luis Martorel y Sr. Miguel Ángel Ascocese Laboratorio de Óptica, Calibración y Ensayo (Facultad de Ciencias Astronómicas y Geofísicas, UNLP) y al Dr. Fausto Bredice e Ing. Aníbal Pablo Laquidara del Centro de Investigaciones Óptica, por sus recomendaciones y trabajos elaborados.

Dedico de manera muy especial a mi familia, Luca, León y Alan, pues ella es el principal cimiento de mi vida.

A mi papá, mi mamá y hermanos, Agustín y Lisandro, por ofrecerme su amor y calidez.

A mis compañeros y amigos, presentes y pasados, quienes sin esperar nada a cambio, estuvieron a mi lado acompañándome.

Y a todas aquellas personas que de una u otra manera me dieron su apoyo.

Comunicaciones

La siguiente Tesis dio lugar a los siguientes trabajos comunicados en congresos y en revistas.

1. Artículos de revista

- Título: *Photodynamic Therapy of HeLa cultures by using LED or Laser sources* Autores: Etcheverry M.E., Pasquale M. and Garavaglia M. Revista: *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* (2016) pp. 271-277
DOI:10.1016/j.jphotobiol.2016.04.013
- Título: *Infrared imaging and fluorescence measurements in Photodynamic Therapy of fibrosarcome animal model* Autores: María Eugenia Etcheverry, Agustina Corti, Solange Bibé, Carlos Ponzinibbio, Miguel A. Pasquale, Mario Garavaglia Revista: *Medicina. Buenos Aires Volumen 77 suplemento I.* 2017
- Título: *Photodynamic therapy in fibrosarcoma BALB/c animal model: Observation of the rebound effect* Autores: Etcheverry María Eugenia, Pasquale Miguel Ángel, Gutiérrez Anabella, Bibé Solange, Ponzinibbio Carlos, Poteca Horacio, Garavaglia Mario Revista: *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* Volume 21 , March 2018, Pages 98- 107.
DOI: 10.1016/j.pdpdt.2017.11.006
- Título: *Photodynamic therapy in human cervix carcinoma cells in 2D and 3D culture employing LED light sources emitting at different wavelength* Autores: María E. Etcheverry, Miguel A. Pasquale, Carlos Ponzinibbio, and Mario Garavaglia.
Revista : *Physics in Medicine & Biology, IOP.*
DOI: 10.1088/1361-6560/ab589a

2. Comunicaciones orales:

- Expositor en las X Jornadas de Becarios del INIFTA 2015. La Plata, Buenos Aires Argentina (2015).

- Expositor en las XI Jornadas de Becarios del INIFTA 2016: *TERAPIA FOTODINÁMICA EN MODELO MURINO DE FIBROSARCOMA SEGUIDA POR MEDIDAS DE FLUORESCENCIA*. La Plata, Buenos Aires, Argentina (2016)
- Presentación oral Lesiones intraepitelales causadas por HPV: *DIAGNOSTICO Y TERAPIA FOTODINÁMICA*. AFA SAN MIGUEL DE TUCUMÁN, Argentina (2016).
- Expositor en las XII Jornadas de Becarios del INIFTA: *Termografía infrarroja y Fluorescencia en Patologías y Terapia Fotodinámica*. La Plata, Buenos Aires, Argentina (2017).
- Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias: *Imágenes Infrarrojas y Medidas de Fluorescencia en Terapia Fotodinámica en modelo animal de Fibrosarcoma*, Buenos Aires, Argentina (2017).
- Expositor en las XII Jornadas de Becarios del INIFTA: *Termografía infrarroja y Fluorescencia en Patologías y Terapia Fotodinámica*. La Plata, Buenos Aires, Argentina (2018).

3. Comunicaciones murales

- Presentación mural en el ICGEB (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology) DNA Tumour Virus Meeting. *ScOp and Photodynamic Therapy in tissues infected by HPV*. Trieste, Italia (2015).
- Presentación mural en 6 jornadas de jóvenes investigadores y jóvenes extensionistas. *ScOp y Terapia Fotodinámica en tejidos infectados por HPV*, Facultad de Ciencias Exactas y Museo, UNLP (2015).
- Presentación mural SAB XLIV. *Ensayo de viabilidad celular para distintas fuentes de iluminación en la Terapia Fotodinámica del Cáncer*. Santiago del Estero, Argentina (2015)
- Lesiones intraepitelales causadas por HPV: *Diagnóstico y Terapia Fotodinámica*. San Miguel de Tucumán, Argentina (2016).
- Workshop Imaging Techniques for Biotechnology and Biomedical Applications. *Optical Biopsies: Thermal Infrared and Visible Fluorescent Images from Normal and Cancerous Tissues. Photodynamic Diagnostic and Photodynamic Therapy*. La Plata, Argentina (2016).
- 102 Reunión de la Asociación Física Argentina: *Imágenes de radiación infrarroja como herramienta de monitoreo de la Terapia*

Fotodinámica en fibrosarcoma murino. La Plata, Buenos Aires, Argentina (2017).

- Reunión Conjunta de sociedades de Biociencias: *Infrared imaging and fluorescence measurements in Photodynamic Therapy of a fibrosarcome animal model*. CABA, Argentina (2018).
- 103 Reunión de la Asociación Física Argentina: *Imágenes de radiación infrarroja como herramienta de monitoreo de la Terapia Fotodinámica en fibrosarcoma murino* CABA, Argentina (2018).
- XLVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica (SAB), *HeLa Cells spheroids as drug difussion and light dosimetry model in Photodynamic Therapy*. Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, La Plata, Argentina (2018).
- 104 Reunión de la Asociación Física Argentina: *Termografía y medidas de fluorescencia en la Terapia Fotodinámica en modelo animal*. Santa Fé, Argentina (2019).

Índice general

1. Fundamentos	21
1.1. Antecedentes históricos de la fototerapia	22
1.2. Antecedentes de la TFD	22
1.3. Antecedentes clínicos y experimentales de la TFD	24
1.4. Otras aplicaciones de la TFD	27
1.5. TFD y Virus del Papiloma Humano	27
1.6. Fotometría y Radiometría	30
1.7. Propagación de la luz en el tejido	37
1.7.1. Absorción en tejido	39
1.8. Mecanismo de drogas fotosensibilizadoras (Fs)	40
1.9. Dosimetría	42
1.9.1. Directa	43
1.9.2. Implícita	44
1.9.3. Explícita	45
1.10. Mecanismo de destrucción del tumor	46
1.11. Efectos inmunológicos de la TFD	50
1.12. La fluorescencia de los <i>Fs</i> : Diagnóstico Fotodinámico	51
1.13. Termografía infrarroja para detección de afecciones y seguimiento de la TFD	52
2. Materiales y métodos	55
2.1. Sistemas biológicos	56
2.1.1. <i>in vitro</i> : cultivos celulares	56
2.1.2. <i>in vitro</i> : esferoides de células HeLa	57
2.1.3. <i>in vivo</i> : fibrosarcomas en murinos BALB/c	58
2.1.4. <i>in vivo</i> : modelo de cáncer de cérvix en murinos BALB/n	58
2.2. Drogas fotoactivables	59
2.3. Fuentes de iluminación	61
2.3.1. Sistemas de iluminación para tratamiento de los sistemas <i>in vitro</i>	66
2.3.2. Sistemas de iluminación <i>in vivo</i>	67

2.3.3.	Caracterización fotométrica de lámparas	68
2.4.	Visualización por microscopía óptica y de fluorescencia	70
2.5.	Determinación del daño celular en experimentos en cultivos	71
2.5.1.	Ensayo MTT	71
2.5.2.	Ensayo TUNEL	72
2.5.3.	Naranja de Acridina e Ioduro de Propidio (NA/IP)	72
2.6.	Observaciones por Microscopía Láser Confocal de Barrido para determinar la distribución del daño espacial	73
2.7.	Dinámica de cultivos de células HeLa 2D y 3D	74
2.8.	Análisis de imágenes	74
2.9.	Seguimientos en murinos de la TFD	76
2.9.1.	A través de mediciones por fluorescencia	76
2.9.2.	A través de la termografía infrarroja	78
2.10.	Evaluación de la masa tumoral de la TFD	78
2.11.	Transmisión de la luz en cúmulos de células HeLa y en piel de ratones BALB/c	79
3.	Resultados	81
3.1.	Caracterización de lámparas LEDs	82
3.1.1.	Mediciones Fotométricas	82
3.1.2.	Simulación en Zemax	84
3.2.	Comparación entre las fuentes láser y LED <i>in vitro</i>	95
3.2.1.	Localización intracelular del Fs	95
3.2.2.	Rango de toxicidad del m-THPC en células de cultivo con y sin iluminación	96
3.2.3.	Efecto del tiempo absorción del Fs	97
3.2.4.	Variación en el tiempo de iluminación en células	98
3.3.	TFD en modelo murino. Seguimiento de tratamiento y mejora del protocolo de aplicación	101
3.3.1.	Mediciones de fluorescencia a lo largo del tiempo, determinación de la máxima concentración de Fs	103
3.3.2.	Mediciones de fluorescencia en diferentes sitios del tumor antes y después de la iluminación. TFD con iluminación única	105
3.3.3.	Aumento de la fluorescencia luego de la iluminación, “efecto rebote”. Doble aplicación de la TFD	107
3.3.4.	Descripción histológica de un fibrosarcoma	111
3.3.5.	Mediciones de transmisión de la luz y de fluorescencia <i>ex vivo</i>	112

3.3.6.	Evaluación de la TFD en el crecimiento de los tumores de fibrosarcoma en modelo murino	115
3.3.7.	Monitoreos <i>in vivo</i>	117
3.4.	Comparación de la TFD con fuentes LEDs de distintas longitudes de onda en modelos 2D y 3D de células HeLa	120
3.4.1.	Cuantificación de muerte celular en cultivos celulares 2D: ensayo TUNEL	125
3.4.2.	Muerte celular inducida en esferoides de células HeLa luego de la TFD	127
3.4.3.	Esferoides celulares: dinámica de colonias en la evaluación del tratamiento de TFD	129
3.4.4.	Esferoides celulares: imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia en esferoides celulares luego del tratamiento de TFD	132
3.4.5.	Transmisión de luz en cúmulos de células HeLa	137
3.5.	Vinculación con la práctica clínica	138
3.5.1.	Autofluorescencia natural, caso 1	138
3.5.2.	Diagnóstico Fotodinámico (DFD) y TFD, caso 3	142
3.5.3.	Autofluorescencia, termografía infrarroja y TFD, caso 4	143
4.	Conclusiones	147
5.	Apéndice	149
5.1.	Datos técnicos de la fibra óptica, FD1	150
5.2.	Protocolo para determinar el tipo de muerte celular	151
5.3.	Protocolo Foscan [®]	152
5.3.1.	Nombre del medicamento	152
5.3.2.	Composición cualitativa y cuantitativa	152
5.3.3.	Indicaciones terapéuticas	153
5.3.4.	Posología y forma de administración	153
5.3.5.	Advertencias y precauciones especiales de empleo	154
5.3.6.	Efectos sobre la capacidad para conducir y utilizar máquinas	154
5.3.7.	Reacciones adversas	154
5.3.8.	Sobredosis	155
5.4.	Código Python para cuantificar la intensidad de color	155
5.5.	Protocolo para aplicaciones dérmicas	156

Abreviaturas

TFD: Terapia Fotodinámica

LED: Light Emitting Diode

Fs: Fotosensibilizador/es

m-THPC: m-tetrahidroxifenil clorina, es el *Fs* utilizado en esta tesis

HeLa: células de linaje humano provenientes del cérvix de Henrietta Lacks

BALB/c: Cepa de ratón albino

BALB/n: Cepa de ratón inmunodeprimido sin pelo

TUNEL: Identificador de la terminal deoxinucleotidil transferasa o TdT

CIN: Neoplasia intraepitelial cervical precancerosa

DFD: Diagnóstico Fotodinámico

Hp: Hematoporfirina

HpD: Derivado de hematoporfina

BCC: Carcinoma de células basales

SCC: Carcinoma de células escamosas cutáneas

BLC: Cistoscopia de luz azul

ALA: 5-aminolevulinic acid

ICG: Verde de indocianina

MRSA: Staphylococcus aureus resistente a la meticilina

IARC: Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer

TFDa: Terapia Fotodinámica antibacteriana

VHB: Hepatitis B

VHC: Hepatitis C

VPH: Virus del Papiloma Humano

HbO₂: Hemoglobina oxigenada

Hb: Hemoglobina

TTR: Teoría de Transporte Radiativo

MMP-9: Matrix de metaloproteinasa -9

RI: Reacción tipo I

RII: Reacción tipo II

¹O₂: Oxígeno singulete

pH: indicador de la actividad media de iones de hidrógeno

pO_2 : Presión parcial de oxígeno
CIE: Commission internationale de l'éclairage
SFB: Suero fetal bovino (en inglés, FBS)
TMC: Células tumorales de un fibrosarcoma
RPMI: El medio Roswell Park Memorial Institute
PMMA: Poli (metil metacrilato)
MTT: Thiazolyl blue tetrazolium bromide
TdT: Terminal deoxynucleotidyl transferase
PBS: Phosphate Buffered Saline DMSO: Dimetilsulfóxido
NA: Naranja de Acridina
IP: Ioduro de Propidio
FDA: Food and Drug Administration
 E_tO : Óxido de etileno
FWHM: Full Width at Half Maximum
CAD: Archivo informático de dibujo computarizado
UA: Unidades Arbitrarias
UV: Ultravioleta
MLL: Mixed Lineage Leukemia
PpIX: Protoporfirina IX

Resumen

La siguiente tesis tiene como objetivo el desarrollo y caracterización fotométrica de fuentes de iluminación basadas en LEDs con la posibilidad de aplicarlas en la Terapia Fotodinámica (TFD) del cáncer, así como también, a proponer introducir mejoras en protocolos de aplicación preestablecidos. Brevemente, en la TFD, se utiliza luz de longitud de onda y potencia apropiada a las características del espectro de absorción de la droga fotoactivable *Fs* que, en presencia de oxígeno, desencadena un proceso fotodinámico que induce a las células a morir.

En el siguiente trabajo de tesis se realizaron experimentos aplicativos de la TFD en cultivos celulares bidimensionales, tridimensionales y en modelo animal, empleando la temoporfin (meta-tetra(hidroxifenil)clorina) como fotosensibilizador y un láser médico y lámparas construidas con LEDs. Se analizan experimentos realizados empleando distintas longitudes de onda, para mejorar la selectividad de la terapia y se sigue la terapia mediante las medidas de fluorescencia y termografía infrarroja. Esto permite proponer mejoras concretas en los protocolos de la TFD. Finalmente, se presentan casos en pacientes utilizando herramientas complementarias a la aplicación de la TFD.

Introducción

El aprendizaje es experiencia,
todo lo demás es información.
Albert Einstein

Los cánceres más relevantes inciden mundialmente por año con 14,1 millones de casos, una mortalidad de 8,2 millones y una prevalencia de 32,6 millones. Así, el cáncer de cérvix en Argentina incide anualmente en 23,2 cada 100.000 mujeres, diagnosticándose unos 5000 nuevos casos y 1500 muertes. La terapia fotodinámica es una estrategia de tratamiento de mínima invasividad para ciertas neoplasias que en algunos casos es ventajosa sobre otras terapias más difundidas. La siguiente tesis apunta al desarrollo y caracterización fotométrica de fuentes de iluminación basadas en LEDs con la posibilidad de aplicarlas en la Terapia Fotodinámica (TFD) del cáncer, así como también, se propone introducir mejoras en protocolos de aplicación preestablecidos.

La tesis se estructura de la siguiente manera: una primera parte en la que se describen los fundamentos, en el capítulo 2 los materiales y métodos, y en el capítulo 3, los resultados; a su vez, este último está formado por las secciones 1,2,3,4 y 5. En la sección 1, se describen las fuentes LEDs utilizadas en los ensayos que se describen en las secciones posteriores. En la sección 2, se realizaron experiencias sobre cultivos celulares. La TFD en cultivos de células HeLa se realizó utilizando una lámpara LED de 637 nm con 1,06 W de potencia y m-tetrahidroxifenil clorina (m-THPC) como fotosensibilizador F_s y se comparó su eficiencia con la generada con una fuente láser clínica que emite a 654 nm con la misma potencia y empleando el mismo F_s .

También fueron evaluados, la localización intracelular del F_s y los efectos de su concentración (C_F), del tiempo de absorción (T_A) y el tiempo de iluminación (T_I). Se observó que para $C_F > 40 \mu\text{g/ml}$ y $T_A > 24 \text{ h}$, el m-THPC presentó toxicidad en células en cultivo, incluso en ausencia de iluminación. No se observó efecto sobre las células para $C_F < 0,05 \mu\text{g/ml}$, $T_A = 48 \text{ h}$ y $T_I = 10 \text{ min}$ y continuaron proliferando. Para concentraciones de drogas mayores a $0,05 \mu\text{g/ml}$, se observó un mayor deterioro al aumentar T_A y T_I . También, evaluamos la viabilidad de las células, antes y después del

tratamiento, empleando colorantes supravitales y microscopías de contraste de fase y de fluorescencia. Se obtuvieron evidencias de diferentes tipos de muerte celular.

Estos resultados demuestran la viabilidad de usar una lámpara LED como alternativa a la fuente de láser de uso médico ya que la característica principal no es la coherencia de la luz, sino el logro de una tasa de fluencia y longitud de onda adecuada.

A partir de estos resultados, se continuó con la utilización de dicha lámpara LED de 637 nm para llevar a cabo las experiencias presentadas en la sección 3. Aquí se describe un análisis espectrofluorométrico *in vivo* durante la TFD para obtener información sobre la cinética de blanqueo del *Fs*. Usando un espectrofluorómetro con una fuente de excitación que emite a una longitud de onda de 395 nm y un analizador espectral que varía de 500 nm a 800 nm, se estudió la evolución del espectro de fluorescencia del m-THPC, tanto en el tejido tumoral de los ratones BALB/c con fibrosarcomas localizados en su flanco, como en regiones de tejido normal.

La fluorescencia en diferentes partes del tumor, en la cola y en la axila de los ratones, se midió inmediatamente después de la inyección y se realizó un seguimiento diario. La intensidad de fluorescencia promedio en el tumor alcanzó un máximo después de 24-72 h. Posteriormente, se realizaron iluminaciones 24, 48, 72 y 96 h después de la inyección, y la fluorescencia se midió inmediatamente antes y después de cada iluminación. Finalmente, 24 h después de la iluminación, la fluorescencia en ciertas partes del tumor aumentó en comparación con la medida inmediatamente después de la iluminación. Este efecto, que denominamos “efecto rebote”, se debió a la nueva acumulación local del *Fs* y se aprovechó para realizar una segunda iluminación en algunos ratones y aumentar la cantidad de reacción fotodinámica, mejorando significativamente el resultado de la TFD. También se realizaron mediciones de fluorescencia *ex vivo* del tumor y la piel con el objetivo de caracterizar mejor la señal *in vivo* en diferentes partes del tumor. Estos resultados son alentadores para optimizar la TFD en el modelo animal propuesto, pensando en la posible traslación a los humanos.

Otra herramienta importante para el seguimiento de la TFD resulta ser el control de la temperatura local en el tumor y en zonas aledañas, durante la iluminación. También, se hicieron determinaciones en modelo de fibrosarcoma en murinos BALB/c y, recientemente, en modelo de HeLa en murinos inmunodeprimidos BALB/n. En estos últimos, se evaluó la penetración a través de la piel de la luz de los LEDs de 635 nm y 420 nm, así como también, la eficiencia de la TFD combinando 420 nm de luz LED y m-THPC como *Fs*.

En la sección 4, se comparó la eficiencia de la TFD empleando luz de distintas

longitudes de onda provenientes de fuentes LEDs en modelos 2D (monocapas de células HeLa) y 3D (cúmulos de células HeLa). La luz de diferentes longitudes de onda se puede utilizar para obtener un resultado más eficiente y selectivo de la TFD, según las bandas de absorción del *Fs* m-THPC. Los cultivos 2D y 3D fueron iluminadas con sistemas LED emitiendo a 395, 460, 635 y 660 *nm* a varios T_I comprendidos entre 0,5 y 30 *min*. Los resultados indicaron una mayor eficiencia con luz de 395 *nm* seguida de la de 660 *nm*. Por otro lado, se realizó el seguimiento dinámico (a lo largo de 10 días) del crecimiento de esferoides de células HeLa luego de ser tratadas mediante TFD con 395 *nm* y 660 *nm*.

Los resultados de los cultivos en 3D indican que la penetración de la luz de 395 *nm* es apropiada para eliminar las células HeLa varias capas por debajo, mostrando el daño y muerte celular no solo en el borde exterior de los esferoides iluminados, donde existe una acumulación de *Fs*, sino también, en la región más interna. Debido a que el espesor del cuello uterino es de, aproximadamente, 250 μm dimensión que se compara con la de los cultivos 3D, los resultados indican que la luz LED de 395 *nm* podría ser útil para tratar lesiones intraepiteliales escamosas (CIN).

En la sección 5, se presenta el caso de un paciente con cáncer de piel no melanoma y otro, con presencia de lunares volumétricos visualizados con las lámparas LED desarrolladas. También, para el caso de los pacientes tratados con TFD, se analiza el uso de herramientas como la termografía infrarroja en un tumor de parótida y, el DFD en un carcinoma de células escamosas *in situ*. Finalmente, en el capítulo 4, se presentan las conclusiones de la tesis.

Capítulo 1

Fundamentos

Here comes the sun

Here comes the sun

And I say

It's all right

(Here Comes The Sun, The Beatles 1969)

1.1. Antecedentes históricos de la fototerapia

La fototerapia puede ser definida como la utilización, solamente, de la luz para propósitos terapéuticos. Sin embargo, moléculas sensibles a la luz de carácter endógeno se involucran en los procesos fototerapéuticos dando lugar a un proceso fotodinámico. La luz solar ha sido usada para el tratamiento de numerosas afecciones, tales como, el vitiligo, psoriasis, raquitismo, cáncer de piel, e incluso psicosis [1][2]. La fototerapia ha sido aplicada por humanos hace 3000 años en Egipto, India y China [3]. En Grecia, Heródoto (484-424 ac), la llamó helioterapia y la recomendaba para la restauración de la salud. En el siglo XVIII, Carvin escribió que la luz solar tenía un efecto curativo en Escrófula (enfermedad causada por las bacterias *Mycobacterium tuberculosis*), raquitismo, reumatismo, escorbuto (bajos niveles de vitamina C), parálisis y debilidad muscular [4]. En 1822, el Polaco Físico Sniadecki documentó la importancia de la exposición solar para la prevención de raquitismo [5]. Más tarde, en 1903, el Danés, Niels Finsen fue galardonado con el Premio Nobel por su trabajo en el uso de luz UV proveniente de una fuente de arco de carbono para el tratamiento de lupus vulgaris (tuberculosis de piel) y fue conocido como el fundador de la fototerapia moderna [6]. También, trató la viruela con luz roja y encontró que dicho tratamiento prevenía la supuración de pústulas. En 1950 Richar Cremer en Inglaterra introdujo la fototerapia para el tratamiento de ictericia (exceso de bilirrubina que provoca color amarillento en la piel o en los ojos) en recién nacidos [7]. Además, la luz como agente terapéutico para la depresión y el mantenimiento de los ritmos biológicos podrían convertirse en una herramienta en un futuro próximo [8][9]. Es tema de estudio el hecho de que la luz azul inhiba la producción de melatonina, la hormona que regula nuestros ciclos de sueño[10].

1.2. Antecedentes de la TFD

La TFD es una prometedora modalidad emergente para el tratamiento de patologías en varios órganos, la cual, relaciona la presencia simultánea de tres componentes: luz, una droga fotoactivable y oxígeno. El daño celular es causado por las especies reactivas de oxígeno, inducidas por la activación de la droga fotoactivable mediante la luz. La frase Terapia Fotodinámica fue introducida por primera vez por von Tappeiner y Jodlbauer en 1907 [11]. Un estudiante de von Tappeiner, Oscar Raab, hizo observaciones de los efectos de la acridina *in vitro* en paramecios [11], concluyendo que la energía transferida por la luz al colorante era el desencadenante de la inducción de la toxicidad.

En colaboración con un dermatólogo, von Tappeiner, trató afecciones dérmicas utilizando eosina y luz blanca [12]. Fue algunos años después que observó la importancia de la presencia de oxígeno para que la reacción fotodinámica se generara [13].

Las porfirinas constituyen una clase de compuestos que han sido utilizadas ya sea para propósito de fotodiagnóstico, así también como, fototerapéutico. En 1911, Hausmann demostró la presencia de fotosensibilidad en ratón usando hematoporfirina, *Hp* [14].

Luego, en 1913, Friedrich Meyer-Betz fue el primero en demostrar la fotosensibilización en humanos, tras autoinyectarse 200 mg de *Hp* y experimentar dolor y enrojecimiento en áreas de la piel expuestas a la luz ambiental, lo cual le duró alrededor de dos meses [15].

En 1924, Policard, observó la fluorescencia de la porfirina en sarcomas de ratas [16] y, en 1931, Korbler en carcinoma de mama [17] en humanos.

En 1942 Auler y Banzer hicieron las primeras aplicaciones de la TFD en un tumor animal usando porfirina [18].

Alrededor del año 1950, las propiedades de fluorescencia de la *Hp* junto con su habilidad para acumularse selectivamente en tejido maligno fue investigado en tejido animal y humano [19]. En 1955, Schwartz, demostró que la *Hp* consiste en diversas sustancias diferentes, de las cuales, la *Hp* pura exhibe una selectividad tumoral pobre. Luego, junto con Lipson, aislaron la hematoporfirina derivada, *HpD* y mejoraron la localización tumoral comparada con la *Hp* [20][21]. Después de 1960, Kosaki, Ikeda, Takatsuka y Saka confirmaron que las porfirinas tienden a acumularse en las mitocondrias de las células [22]. Pero hubo que esperar hasta el año 1966 cuando Lipson utilizó la *HpD* para el tratamiento de cáncer, tratamiento en un único paciente con carcinoma de mama recurrente [23], que a pesar de tratamientos repetidos la lesión recurrió. Weishaupt, Gomer y Dougherty fueron los primeros en demostrar la erradicación tumoral en modelo animal combinando *HpD* y luz roja [24]. En 1976, Kelly y Snell, utilizaron *HpD* y una barra de cuarzo para dirigir la luz en la vejiga de un paciente con carcinoma recurrente de vejiga [25].

Con el descubrimiento del láser (1960) la TFD logró un crecimiento importante y, actualmente, existe una tendencia en el desarrollo de fuentes LEDs que, a diferencia de los láseres, no requieren sistemas de seguridad sofisticados; también existen otras tecnologías como la de los diodos orgánicos emisores de luz (OLED) cuya flexibilidad podrían mejorar la homogeneidad de la entrega de luz en una superficie curva [92]. Gran parte de los hechos históricos que fueron relevantes en la TFD se representan en la figura 1.

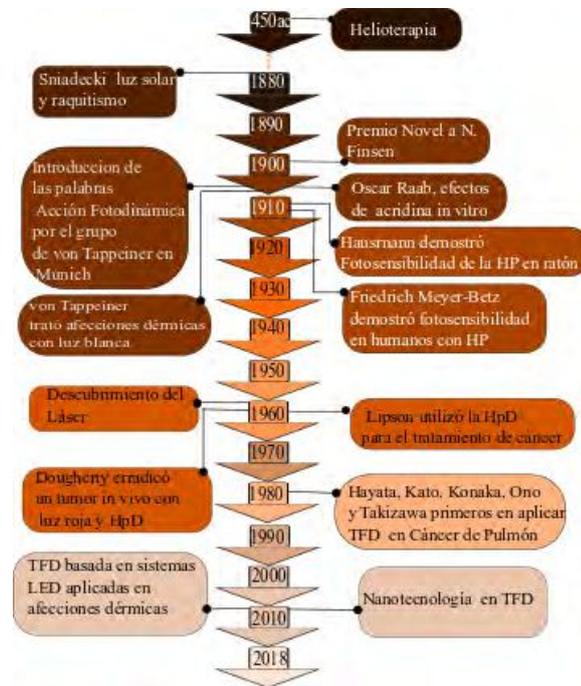


Figura 1. Línea del tiempo con antecedentes históricos relevantes en el avance de la TFD hacia las aplicaciones médicas.

1.3. Antecedentes clínicos y experimentales de la TFD

En particular, la TFD presenta un potencial atractivo para el tratamiento de lesiones superficiales y para aquellas que se localizan en zonas de fácil acceso, como lo son, las ubicadas en la cavidades naturales del cuerpo. La TFD tópica es altamente efectiva en el tratamiento de queratosis actínicas, la enfermedad de Bowen, carcinoma de células basales (BCC) nodulares y superficiales [27]. Sin embargo el uso de *Fs* tópicos para el tratamiento de carcinoma de células escamosas (SCC) ha sido desaprobado [28].

La TFD fue exitosamente empleada para el carcinoma temprano en la cavidad oral, faringe y laringe preservando el tejido normal y sus funciones vitales como el habla y la deglución [29]. Las únicas complicaciones observadas, en pacientes tratados con lesiones tempranas en la cavidad oral, laringe, faringe y nasofaringe fueron la de fotosensibilidad y dolor local luego de la terapia, pero el mismo se controló con analgésicos orales [30][31][32].

El esófago de Barrett y varios estadios de displasia y cáncer de esófago tem-

prano han sido los más estudiados del sistema gastrointestinal en la TFD [33][34]. Mientras que, en Japón, la aplicación de la TFD en estómago mostró ser prometedora [35][36]. Por otro lado, ensayos no sólo en cáncer de páncreas localmente avanzado (irreseccable) [37] sino que también en la erradicación de pólipos de colon, cáncer rectal y como paliativo de tumores voluminosos en colon, arrojaron resultados prometedores [38][39][40][41]. El uso de la TFD en dichos tumores aún se considera en etapa de experimentación debido a que no hay suficiente información recolectada. De igual manera, se están realizando experiencias para el tratamiento de carcinoma hepatocelular [42].

Al estilo de la braquiterapia, en la que se implantan semillas radioactivas en el interior del paciente, tanto en próstata como en vejiga, la luz puede ser distribuida dentro de la glándula o del órgano entero mediante el uso de fibras ópticas cilíndricamente difusoras. El punto crítico en cuestión es el manejo de la dosimetría [43][44][45]. En general, la TFD es bien tolerada en los pacientes con lesión vesical, los cuales, presentan, principalmente, disuria, hematuria y fotosensibilidad en la piel. Sin embargo, también, se informaron casos, en los cuales, la capacidad de la vejiga se ha visto disminuida debido a procesos de fibrosis en la pared de la misma [46][47][48][49].

La TFD para cáncer de pulmón de células grandes fue aplicada por primera vez en 1982 por Hayata, Kato, Konaka, Ono y Takizawa para lograr necrosis tumoral y reapertura de la vía aérea [50]. En el caso de pacientes con cáncer de pulmón avanzado, la TFD, representa una buena estrategia paliativa [51], así como también, en pacientes con cáncer de pulmón central temprano, los cuales no pueden someterse a cirugía [52][53].

Por otra parte, contando desde los años 80, alrededor de 1000 pacientes recibieron TFD en lesiones cerebrales. Perria, Capuzzo, Cavagnaro informaron uno de los primeros intentos de usar TFD para tratar la cavidad del glioma postresección en humanos [54], mientras que Kaye AH, Morstyn G, Brownbill D. informaron un ensayo de fase 1-2 involucrando a 23 pacientes con glioblastoma multiforme y astrocitoma anaplástico [55]. Otras lesiones cerebrales tratadas con TFD incluyen ependinomas malignos [56], meningiomas malignos [57], melanoma y cáncer de pulmón con metástasis en cerebro [57] y adenoma pituitario recurrente. Los ensayos iniciales proporcionaron resultados positivos, y los autores concluyeron que la TFD se puede utilizar como terapia adyuvante en pacientes con tumores cerebrales.

Los *Fs* utilizados hasta la fecha son varias formulaciones de *HpD* (porfímero sódico) y ALA, así como m-THPC. Las fuentes de luz utilizadas para activar esas drogas fotoactivables incluyen lámparas y láseres. En el cuadro 1.1 se presentan los *Fs* clínicamente utilizados para distintas afecciones, qué longitud de onda desencadena el proceso fotodinámico y las características biológicas de los *Fs*.

<i>Fs</i>	Longitud de onda (nm)	Tipo de cáncer	Característica
Hematopirina derivada <i>Hpd</i> (Photofrin)	630	Pulmón, esófago, ducto biliar, vejiga, cerebro, ovarios, metástasis en piel de mama	<i>Fs</i> de primera generación. Localización intracelular más probable: membrana plasmática y mitocondrias. Administración intravenosa
5-ALA: 5-ácido aminolevulinico (Levulan)	630	Piel, vejiga, cerebro, esófago	<i>Fs</i> de segunda generación. Localización intracelular más probable: mitocondrias. Administración tópica, oral o intravenosa.
MAL: metilaminolevulinato (Metvix)	630	Piel	<i>Fs</i> de segunda generación. Localización intracelular más probable: mitocondrias y RE. Administración tópica
h-ALA: hexilaminolevulinato (Hexvix)	Luz blanca	Células basales	<i>Fs</i> de segunda generación. Localización intracelular: SD. Administración tópica
Veteporfin: benzoporfirina derivada (Visudyne)	690	Páncreas, mama	<i>Fs</i> de segunda generación. Localización intracelular más probable: mitocondrias. Administración intravenosa
Palladium bacteriopheophorbide, padeliporfina, WST-11 (Tookad)	762	Esófago, próstata	<i>Fs</i> de segunda generación. Localización intracelular: SD. Administración intravenosa
Temoporfin, m-THPC (<i>Foscan</i> ®)	652	Cabeza y cuello, pulmón, cerebro, ducto biliar, pancreas, piel y mama	<i>Fs</i> de segunda generación. Localización intracelular más probable: mitocondrias, aparato de Golgi y RE. Administración intravenosa
Talaporfina, mono-L-aspartil clorina e6, NPe6, LS11 (Laserphyrin)	660	Hígado, colon, cerebro, pulmón, metástasis en piel de mama	<i>Fs</i> de segunda generación. Localización intracelular más probable: lisosomas. Administración intravenosa
HPPH: 2-(1-hexiloxietil)-2-devinil pirofeoforbide-a (Photochlor)	665	Cabeza y cuello, esófago y pulmón	<i>Fs</i> de segunda generación. Localización intracelular más probable: mitocondrias y / o lisosomas. Administración intravenosa
Rostaporfin, SnEt2: tin ethyl etiopurpurin I, o (Purlytin)	660	Piel y mama	<i>Fs</i> de segunda generación. Localización intracelular más probable: lisosomas. Administración intravenosa
Fimaporfin, disulfonated tetraphenyl chlorin, TPCS2a (Amphinex)	633	Cáncer superficial y colon	<i>Fs</i> de segunda generación. Localización intracelular más probable: compartimentos endolisosomales. Administración intravenosa
Motexafin lutetium (Lutetex)	732	Mama	<i>Fs</i> de segunda generación. Amplia localización intracelular. Administración intravenosa

Cuadro 1.1: *Fs* investigados en ensayos clínicos [58], de izquierda a derecha: en la primer columna entre paréntesis figura el nombre comercial del *Fs* mientras que fuera del mismo es el nombre químico; en la segunda columna se muestra la longitud de onda central donde presenta un pico de absorción el *Fs* y la fuente de luz para excitar; en la tercer columna se mencionan los órganos donde se realizaron ensayos clínicos con dicho *Fs* y, finalmente, en la cuarta columna se describen características y el comportamiento celular de los *Fs*. En el cuadro, figuran las siguientes abreviaturas; RE:retículo endoplasmático, SD: sin determinar.

1.4. Otras aplicaciones de la TFD

Recientemente, se informó la aplicación de Fs como el verde de indocianina (ICG), compuesto fluorescente soluble en agua, para la obtención de imágenes de fluorescencia en cirugía hepática, mostrando un gran potencial para la exploración en tiempo real durante hepatectomías de tumores hepáticos. El ICG puede usarse para detectar lesiones microscópicas y para la exploración anatómica de la hepatectomía, ya que emite fluorescencia cuando se ilumina con luz infrarroja cercana [59].

Por otro lado, en los últimos años, la aparición de bacterias resistentes a los medicamentos, como la *Staphylococcus Aureus* resistente a la meticilina (MRSA, por sus siglas en inglés), ha traído grandes dificultades al tratamiento clínico. Sin embargo, la terapia fotodinámica antibacteriana (TFDa) es una nueva estrategia de tratamiento sin antibióticos para una variedad de bacterias resistentes a los medicamentos. En este sentido, estudios muestran el efecto bactericida de la TFD utilizando ácido 5-aminolevulínico para MRSA, cuya eficiencia mejoró con el aumento de la dosis de luz para una concentración de Fs particular [60].

La visión tradicional de que la TFD se limita a las patologías superficiales se está redefiniendo con el surgimiento de nuevos conceptos y tecnologías relacionadas con la distribución de luz, la distribución del Fs y la activación fotodinámica, como se expresa en el trabajo [61]. Con la incorporación de dosimetría personalizada, de parámetros clínicamente integrados con herramientas viables de imágenes de tejido profundo, y la disponibilidad de nanopartículas biocompatibles, junto con estrategias de entrega de luz personalizada, podrían aumentar sustancialmente la TFD como una terapia viable, que tiene un impacto significativo en tejidos profundos [62].

En 2008, Wilson y Patterson publicaron un artículo de revisión exhaustivo [63], resumiendo el estado de las aplicaciones clínicas de TFD con énfasis sobre las contribuciones de la física, biofísica y la tecnología, así como también, los desafíos pendientes en la optimización y adopción de esta modalidad de tratamiento [64] y el papel de los físicos al proporcionar un marco computacional completo para estimar la dosis [65]. Además, existe en la actualidad, la tendencia a desarrollar nuevas estrategias de tratamiento del cáncer, basadas específicamente en esquemas terapéuticos de modo dual [66].

1.5. TFD y Virus del Papiloma Humano

Argentina posee una tasa de incidencia de 218 casos (para todos los cánceres excepto melanoma) por 100.000 habitantes, es decir, que se ubica entre los

países con incidencia de cáncer media-alta, de acuerdo a las estimaciones realizadas por la IARC, en base a datos disponibles a nivel mundial para el año 2018 [67]. El 40 % de los cánceres podría evitarse con acciones preventivas. Se estima que los cinco principales riesgos para la salud están relacionados con el comportamiento y la alimentación. Los cánceres causados por infecciones víricas, como las hepatitis B (VHB) y C (VHC) o por el Virus del Papiloma Humano (VPH), son responsables del 20 % de las muertes por cáncer, especialmente en países de ingresos bajos y medios [68]. La vacuna contra el VPH (dos dosis) integra el calendario nacional de vacunaciones de nuestro país, por lo que es obligatoria y gratuita, para niñas de 11 años nacidas a partir del año 2000 y niños de 11 años nacidos a partir del año 2006 [67]. La infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH) es la causa principal de cáncer de cuello uterino en las mujeres. También es un factor de riesgo para el cáncer de pene y anal tanto en varones como mujeres. Los mismos tipos de VPH que infectan las áreas genitales pueden infectar la boca y la garganta. Existen más de 200 tipos de VPH y a cada uno de ellos se le identifica con un número. Algunos tipos de VPH pueden causar solo verrugas genitales o anales (bajo riesgo), y otros tipos pueden causar cáncer cervicouterino, de pene, anal o bucal (alto riesgo), particularmente los tipos HPV 16 y 18, son los responsables de la neoplasia intraepitelial cervical precancerosa (CIN) y el cáncer invasivo [69]. Las CIN son lesiones superficiales clasificadas según el grado de displasia y la extensión de la neoplasia a lo largo del epitelio, desde las células basales. Esta clasificación va desde CIN I (Figura 2), que implica una displasia leve confinada a 1/3 del epitelio, el CIN II representan una displasia moderada, confinada a los 2/3 basales del epitelio cervical mientras que el CIN III en un tipo de lesión, considerada también de alto grado, la displasia es severa y cubre más de los 2/3 de todo el epitelio cervical, en algunos casos incluyendo todo el grosor del revestimiento cervical. Esta lesión es considerada como un carcinoma *in situ* [70].

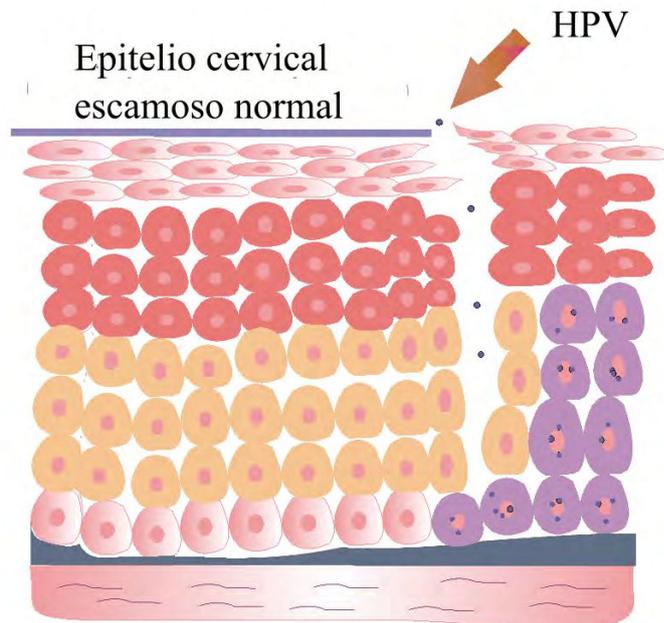


Figura 2. Esquema de una lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (CIN I). El epitelio tiene un grosor de aproximadamente diez capas celulares.

Las lesiones precancerosas son una etapa precursora del cáncer cervicouterino, las cuales pueden evolucionar dando lugar a un cáncer si no se detectan y tratan tempranamente. La transformación celular está asociada con una serie de alteraciones fenotípicas, biológicas celulares, bioquímicas y metabólicas. La detección y clasificación de células morfológicas anormales representa la base de la histopatología clásica y sigue siendo un pilar importante en la clínica.

Actualmente, se está realizando un esfuerzo significativo para el desarrollo de modalidades no invasivas para la detección del cáncer en una etapa temprana, momento en el que las intervenciones terapéuticas son altamente exitosas. Esos métodos se basan en la detección de señales ópticas y presentan resultados prometedores [71][72][73][74][75][76][77]. Los métodos terapéuticos más tradicionales para el tratamiento de CIN son invasivos y pueden dividirse convencionalmente en dos grupos básicos: (a) métodos destructivos (diatermocoagulación, criodestrucción y evaporación láser) y (b) extirpación del tejido patológico (quirúrgico, láser o escisión electroquirúrgica). Los efectos adversos más comunes de dicho tratamiento son hemorragia, traumatización de tejidos subyacentes con una formación de restos ásperos, estenosis local y estenosis del canal cervical. Los cambios en la estructura anatómica del cuello uterino conducen a la pérdida de funcionalidad; específicamente,

una reducción de las secreciones cervicales resulta en una disminución en la probabilidad de concepción, un aumento de la probabilidad de abortos espontáneos, aumento en el nivel de mortalidad perinatal y deterioro del parto normal. Por ende, el manejo de las CINs requiere desarrollo e introducción de nuevos enfoques terapéuticos y mantenimiento de la integridad funcional del órgano objetivo. En ese sentido, la TFD es menos dañina para los tejidos normales que la cirugía, la radiación o la quimioterapia, conservando la fertilidad [78] y parece ser un procedimiento alternativo prometedor para CIN [79][80] [81][82][83][84]. La literatura [85] publica una guía de tratamiento utilizando Photofrin como *Fs* en una dosis de 2 mg/kg , $T_A = 48 \text{ h}$ y luz proveniente de un láser de XeCl como fuente de bombeo de un colorante que emite en un ancho de banda γ , mediante una red de difracción que integra su cavidad se selecciona la emisión de los 630 nm con un densidad de energía de 100 J/cm^2 . Con dicho *Fs* se demostró su eficacia en más del 80% para CIN I y CIN II, y más del 90% para CIN III [86].

1.6. Fotometría y Radiometría

El término fotometría refiere a la medición de las magnitudes que caracterizan la emisión de luz visible por parte de una fuente luminosa (flujo e intensidad luminosa), y a la medición de aquellas que de alguna manera describen la sensación visual (iluminancia y luminancia), las mismas se comparan con las magnitudes radiométricas en el cuadro 1.2 [87].

Magnitud Radiométrica	Unidad	Magnitud Fotométrica	Unidad	Definición Fotométrica
Potencia Radiante	W	Potencia luminosa	lm	Cantidad de luz emitida
Intensidad radiante	W/sr^1	Intensidad luminosa	$cd = lm/sr$	Densidad espacial de luz emitida
Irradiancia	W/m^2	Iluminancia	$lx = lm/m^2$	Cantidad de luz que llega a la superficie
Radiancia	W/sr^1m^2	Luminancia	cd/m^2	Brillo aparente

Cuadro 1.2: Magnitudes fotométricas y sus análogas radiométricas. Las abreviaciones sr:estereorradián; lm:lumen; cd:candela; lx:lux

Definición de flujo luminoso

El flujo luminoso Φ es la cantidad de luz que emite una fuente, cuya unidad de medición es el lumen (lm) y representa una magnitud escalar, ya que solo indica la cantidad de luz generada por un dispositivo (caso típico, una lámpara), reflejada o transmitida por un cuerpo (un espejo, un vidrio refractor). No brinda información espacial, es decir, hacia donde se dirige o de donde proviene tal cantidad de luz. Para precisar un poco más, qué se entiende por cantidad de luz, imaginemos una fuente ideal, concentrada en un punto (puntual), que irradia una cierta potencia G . Consideremos, además, que esta potencia tiene una distribución espectral como la indicada en la figura 3. Una fuente como la indicada en el diagrama emitirá en la región visible del espectro (longitudes de onda comprendidas entre aproximadamente 380 y 700 nm), pudiendo también irradiar longitudes mayores a 700 nm (infrarrojo, ondas de radio, etc.) y menores a 380 nm (ultravioleta, rayos x, etc.). Si efectuáramos la sumatoria de estas radiaciones cubriendo la totalidad del espectro, obtendríamos la potencia emitida, medida en Watt (W).

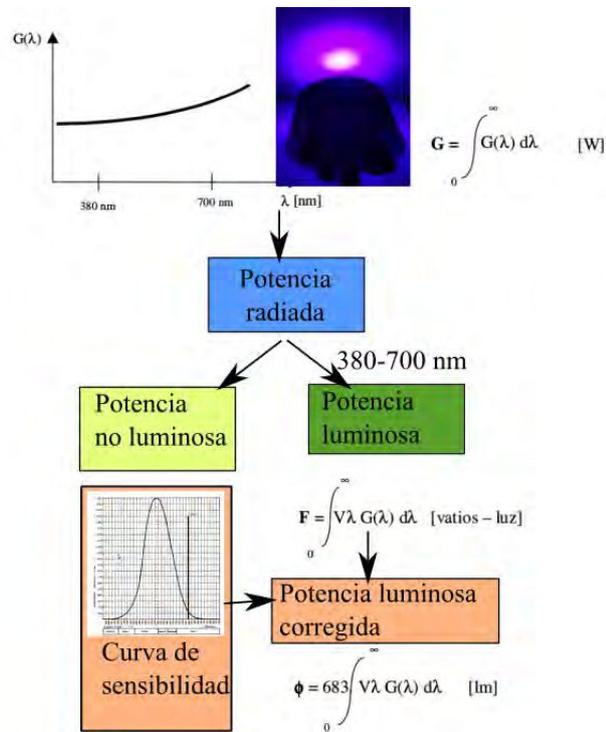


Figura 3. Definición del lumen: dada una fuente puntual con una distribución de potencia G , la cual está formada por una parte luminosa correspondiente a $380\text{-}700\text{ nm}$ y otra parte, no luminosa, que escapa a dicho rango; el rango visible se pondera con su correspondiente sensibilidad V_λ y, finalmente, se multiplica por una constante definida como 683 lm/W^1 .

Esta potencia no puede considerarse como cantidad de luz, ya que incluye radiaciones no visibles. Para cuantificar el flujo luminoso deberíamos entonces restringir nuestra integral solo al espectro visible. Más aún, sabemos que las radiaciones dentro de esta región $380\text{-}700\text{ nm}$ producen percepción visual, pero el ojo humano no tiene la misma sensibilidad para todas las longitudes de onda allí comprendidas. Esta sensibilidad, para niveles altos de iluminación (visión diurna o fotópica), fue estandarizada con la curva V_λ , diagrama con forma de campana de Gauss, con un máximo para 555 nm (color verde-amarillo), y decreciente tanto para los rojos como para la zona azul del espectro. De modo que, para obtener de todo el espectro radiado lo que consideramos luz, tendríamos no solo que restringir la sumatoria, sino que además

¹La candela es la unidad básica del Sistema Internacional que mide la intensidad luminosa. Se define como la intensidad luminosa en una dirección dada, de una fuente que emite una radiación monocromática de frecuencia $540 \times 10^{12}\text{ Hz}$, que posee una longitud de onda en el vacío de $\lambda = 555,171\text{ nm}$ y, de la cual, la intensidad radiada en esa dirección es $1/683$ vatios por estereorradián.

ponderar cada frecuencia con su correspondiente sensibilidad V_λ . Con esta idea, definimos el flujo luminoso F de la fuente como la potencia radiante evaluada con respecto a la sensibilidad estándar:

$$F = \int_0^\infty V_\lambda G(\lambda) d\lambda, (\text{vatios} - \text{luz}) \quad (1.1)$$

La unidad resultante para el flujo es el W ; para evidenciar que se trata de potencia luminosa, se emplea la denominación vatios-luz. Sin embargo y, como ya mencionamos, la unidad usual de flujo luminoso es el lumen, de origen anterior a la definición de flujo dada. Considerando para la curva V_λ la estandarización de la Comisión Internacional de Alumbrado CIE (1929), la constante que surge para adaptar unidades es $683 \text{ lm}/W$, con lo cual:

$$\Phi = 683 \int_0^\infty V_\lambda G(\lambda) d\lambda, (\text{lm}) \quad (1.2)$$

Medición de flujo luminoso

Un método simple de medir el flujo luminoso se basa en el uso de la llamada esfera integradora o fotómetro esférico de Ulbrich. La cual consiste en una cavidad cuya particularidad es que su superficie interior puede considerarse un difusor perfecto (se encuentra recubierta de una pintura blanca). La iluminancia en el interior de la esfera, producida por el flujo directo de la lámpara, puede calcularse como:

$$E_1 = \frac{\Phi}{4\pi R^2} \quad (1.3)$$

Siendo R el radio de la esfera. Luego de incidir sobre la pared, la luz se refleja, incidiendo nuevamente sobre la misma. La iluminancia producto de esta primera reflexión valdrá:

$$E_2 = \frac{\rho\Phi}{4\pi R^2} \quad (1.4)$$

En donde ρ es la reflectancia de la superficie interior de la esfera. La luz se refleja nuevamente en la pared, y así continua indefinidamente. La iluminancia total del interior será:

$$E = \frac{\Phi}{4\pi R^2} + \frac{\rho\Phi}{4\pi R^2} + \frac{\rho^2\Phi}{4\pi R^2} + \dots = \frac{\Phi}{4\pi R^2} \frac{1}{1 - \rho} \quad (1.5)$$

De la ecuación anterior se deduce que podemos conocer el flujo luminoso de la lámpara a partir de la medición de la iluminancia en la pared de la esfera. Para

ello, se realiza un orificio en el que se coloca el elemento fotosensible, para el que vale todo lo dicho en el punto sobre medición de intensidad luminosa, con la salvedad que debe poseer corrección cosenoidal. En un integrador real aparecen numerosas fuentes de error, a saber: falta de homogeneidad del recubrimiento interior, selectividad cromática del mismo, absorción por parte de los elementos que se encuentran en el interior (cables, soportes, etc). Todos deben tenerse en cuenta y compensarse cuando se calibra el instrumento [88]

Definición de la iluminancia

Es la cantidad de luz por unidad de superficie que recibe un cuerpo. Para la superficie elemental de la figura 4a, definimos la iluminancia E como:

$$E = \frac{d\Phi}{ds}, (lx) \quad (1.6)$$

Siendo ds el área elemental. La iluminancia se calcula, mide o especifica sobre una determinada superficie o plano tomado como referencia. Así, es usual hablar de la iluminancia sobre el piso, sobre una pared, en un plano horizontal a determinada altura con respecto al piso. Tal plano es, obviamente, el que recibe el flujo luminoso [89].

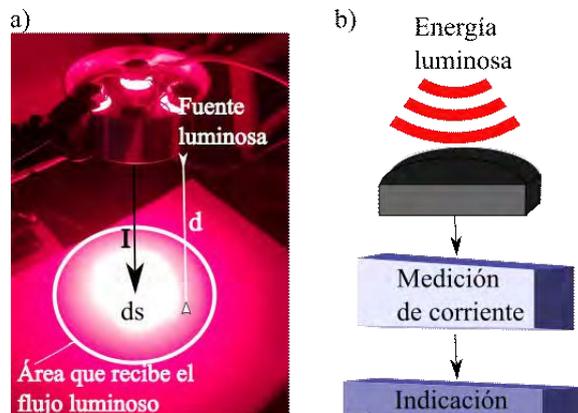


Figura 4. Esquemas de definiciones: a)iluminancia es el flujo $d\Phi$ emitido por una fuente y que llega a un ds ubicada a una cierta distancia d de la fuente ; b)principio de funcionamiento de un luxímetro.

Medición de iluminancia

Las fotocélulas de barrera constan de una unión metal-semiconductor, construida de modo tal que la luz puede incidir sobre la juntura formada. Ante la incidencia de luz, se generan portadores libres que, si el circuito

exterior lo permite, producen una corriente eléctrica. La corriente generada por este transductor resulta proporcional al flujo luminoso que incide sobre la celda por unidad de superficie, en otras palabras, la corriente de salida es proporcional a la iluminancia sobre el elemento. El instrumento básico resulta entonces un medidor de iluminancias o luxímetro, cuyo esquema elemental se muestra en la figura 4b. La medición del resto de las magnitudes fotométricas (intensidad y flujo luminoso, luminancia) se realiza luego de transformarlas en una cantidad proporcional a la iluminancia sobre el elemento fotosensible. Para calibrar o tarar al instrumento es preciso generar sobre el elemento fotosensible niveles conocidos de iluminancia, adaptando en forma conveniente la escala de corriente del amperímetro de modo que los valores se registren directamente en lux. Para tal fin se utiliza un equipo denominado banco fotométrico, que consta de un soporte largo en forma de riel, con posibilidad de instalar en uno de sus extremos una lámpara patrón de intensidad luminosa. Sobre el riel se monta la fotocelda, de modo tal que la intensidad conocida de la lámpara patrón incida sobre ella en forma normal.

El equipo se completa con un sistema que permita medir la distancia entre la lámpara y el elemento fotosensible. En estas condiciones, el nivel de iluminancia que podemos considerar como patrón, se obtiene a partir de la ley de inversa al cuadrado. El filtro de adaptación a la curva V_λ es una de las partes más delicadas de cualquier instrumento fotométrico, incluyendo los luxímetros. La transmitancia del mismo puede modificarse ante cambios bruscos de temperatura, exposición a niveles muy altos de iluminación o la humedad ambiente, alterando no solo la respuesta espectral del instrumento, sino también su calibración. Se puede incluso decir que la falta de adaptación (por un deterioro o mala calidad del filtro) es la principal fuente de error de un luxímetro, con el agregado adicional de que es una falla difícil de detectar. Otra de las características que debe poseer un luxímetro es medir correctamente la iluminancia independientemente de la ubicación de la fuente de luz que la genera. Como se sabe, si la luz incide sobre una superficie en forma oblicua, la iluminancia sobre la misma es proporcional al coseno del ángulo de incidencia. La corrección se logra adicionando una cubierta a modo de sistema óptico, calculada especialmente para lograr la respuesta buscada. En la mayoría de los casos es de material opalino, de forma aproximada a un casquete esférico, aunque la corrección también puede obtenerse con una o varias capas de vidrio transparente plano. Con estas cubiertas se logran buenas respuestas angulares para incidencias de hasta 60° o 70° .

Relación entre la Intensidad luminosa y la Iluminancia. Ley de la inversa de los cuadrados.

Entendemos por puntual a aquella fuente cuya mayor dimensión es mucho más pequeña que la distancia que la separa de la superficie que ilumina. Supongamos una fuente puntual que ilumina un área elemental ds . En estas condiciones, la iluminancia en dicha área valdrá:

$$E = \frac{d\Phi}{ds} \quad (1.7)$$

Y el flujo comprendido en el ángulo sólido que abarca a la superficie será:

$$d\Phi = Id\omega \quad (1.8)$$

Para el esquema de la figura 4a, el ángulo sólido es el cociente entre la superficie del casquete esférico cubierto $\approx ds$ y el radio al cuadrado $d\omega = \frac{ds}{d^2}$, entonces:

$$E = \frac{I}{d^2} \quad (1.9)$$

La ecuación anterior, expresa que la iluminancia sobre un plano perpendicular a la línea de incidencia de la luz, decrece con el cuadrado de la distancia que lo separa de la fuente luminosa. La ley de inversa del cuadrado es de gran importancia en la luminotecnia, tanto en lo referente a cálculos como en la definición de sistemas y métodos de medición[90].

Ley de Lambert

Cuando dos fuentes de la misma intensidad luminosa, una de las cuales tiene un área mayor que la otra, se miran sucesivamente, la menor se percibe como más brillante. Esta noción de brillo aparece muy ligada a la percepción: recortados sobre un mismo fondo, un objeto brillante será más fácil de detectar que otro calificado como opaco. Como una aproximación a esta idea de brillo, se definió la luminancia L como la intensidad luminosa emitida por unidad de superficie:

$$L = \frac{dI}{ds}, cd/m^2 \quad (1.10)$$

La ecuación anterior remite a la luminancia en un punto (infinitesimal); en la práctica, lo usual es trabajar con luminancias medias. La definición exacta de luminancia es el cociente entre intensidad y superficie aparente de la fuente S . Para una dirección de observación oblicua un ángulo a con respecto a la vertical, la luminancia sería:

$$L = \frac{Ia}{Sa} \quad (1.11)$$

Cuando un cuerpo emite o refleja luz de modo tal que su luminancia es constante independientemente del ángulo de observación, se dice que emite (o refleja) en forma uniforme o según la Ley de Lambert. Esto es, si la emisión fuera uniforme tendríamos (Figura 5):

$$L = \frac{I_0}{S_0} = \frac{I_a}{S_a} \quad (1.12)$$

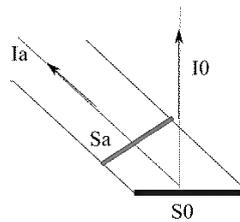


Figura 5. Ley de Lambert: cuando la luminancia L , no varía con la dirección de observación.

1.7. Propagación de la luz en el tejido

Muchos procesos diferentes pueden tener lugar cuando la luz interactúa con la materia. El proceso que realmente ocurrirá dependerá de la intensidad de la luz, la longitud de onda y con qué tipo de materia interactúa. En general, dentro del campo de la óptica y a los efectos del alcance de esta tesis, la luz interactuará con los electrones más externos de las moléculas. Al interactuar con los electrones, básicamente dos procesos pueden ocurrir: el fotón puede ser absorbido o puede ser dispersado.

Dentro de la óptica de tejidos, la absorción se cuantifica comúnmente por el coeficiente de absorción μ_a , que se define como, la probabilidad de que un fotón sea absorbido por unidad de longitud, a menudo dado en cm^{-1} o en mm^{-1} . Si la energía del fotón no coincide con la diferencia entre los niveles de energía en la molécula, el fotón puede dispersarse. En el proceso de dispersión, la dirección del fotón cambia y el fotón puede (dispersión inelástica) o no cambiar su energía (dispersión elástica). La dispersión se cuantifica de manera similar a la absorción por un coeficiente de dispersión μ_s , definido como la probabilidad de que un evento de dispersión pueda ocurrir por unidad de longitud. También la direccionalidad de la dispersión, a menudo cuantificada por el factor de anisotropía g , tiene que ser considerada.

En términos prácticos, es difícil medir el coeficiente de absorción independientemente del coeficiente de dispersión, especialmente cuando la absorción es pequeña en comparación con la dispersión, como lo es en el tejido ligeramente pigmentado. Así, los coeficientes de absorción y dispersión a veces

se derivan de mediciones de muestras con un cierto espesor, utilizando un modelo teórico que tiene en cuenta la dispersión múltiple [91].

Usando las ecuaciones de Maxwell es la vía más fundamental para describir la propagación de la luz en el contexto de la física clásica. Bajo este contexto, la luz es considerada como un campo electromagnético interactuando con el medio dieléctrico por el cual se propaga. Sólo existen pocas soluciones analíticas a los problemas electrodinámicos. En el campo de la óptica biomédica, dentro de los ejemplos más importantes, está la teoría de Mie que describe la dispersión de una onda plana infinita en una esfera pequeña.

Los tejidos biológicos son medios de difícil estudio y caracterización, ya que ante las radiaciones ópticas se comportan como medios no homogéneos y anisotrópicos, es decir, su estructura y composición no son uniformes y presentan distintas propiedades según la dirección del tejido [92] .

Los tejidos biológicos son medios absorbentes cuyo índice de refracción medio es mayor que el del aire, siendo esta característica la responsable de la reflexión parcial de la radiación en la interfaz aire-tejido (reflexión de Fresnel), mientras que el resto penetra en el tejido. La dispersión y la absorción son los responsables, primero, del ensanchamiento del patrón de radiación del láser y de la disminución posterior a medida que viaja a través del tejido, mientras que la dispersión a granel (bulk scattering) es la principal causa de la dispersión de una gran fracción de la radiación en la dirección opuesta a la propagación inicial[93]. El tamaño, la forma y la densidad de estructuras celulares, su índice de refracción con respecto a la sustancia fundamental del tejido y los estados de polarización de la luz incidente juegan un papel importante en la propagación de la luz en los tejidos [94] . Los medios biológicos son a menudo modelados como conjuntos homogéneos de partículas esféricas, ya que muchas células y microorganismos, especialmente las células de la sangre, tienen forma de esferas o elipsoides. Un sistema sin interacción de partículas esféricas es el modelo más simple de tejido. La teoría de Mie describe rigurosamente la difracción de la luz en una partícula esférica [95] [96]. En la óptica de tejidos, debido a la complejidad de los sistemas, debemos añadir también a la teoría de Mie algunas complejidades como las esferas multicapas [97], en las que cada capa presenta distintas propiedades, o esferas monocapa con homogeneidad no radial, anisotropía y/o actividad óptica. A partir de que Wilson y Adam [98] incorporaran de forma innovadora las simulaciones de Monte Carlo (MC) en las interacciones de los tejidos biológicos con los láseres, su uso aumentó, convirtiéndose en el método más utilizado y preferido por la comunidad científica [99], llegando a proporcionar resultados comparables con los resultados experimentales [100] [101] .

1.7.1. Absorción en tejido

La relación entre la concentración del compuesto que absorbe la luz en el tejido C_X (mol/dm^3), y el coeficiente de absorción correspondiente, $\mu_a^\lambda(X)$, a una determinada longitud de onda (λ), viene dada por:

$$\mu_a^\lambda(X) = \ln(10)\varepsilon_X^\lambda C_X \quad (1.13)$$

Donde ε_X^λ es el coeficiente de extinción molar y el producto $\varepsilon_X^\lambda \cdot C_X$ es definido en unidades de cm^{-1} . Los compuestos responsables de la absorción del tejido se denominan comúnmente cromóforos. La absorción de la luz en el tejido depende de la longitud de onda de la luz incidente (figura 6). En esta, se indica con un cuadro, la región del espectro visible dónde los componentes del tejido tienen la menor absorción. Esta región generalmente se denomina ventana óptica del tejido, en referencia a la posibilidad de penetrar profundamente con la luz.

- La luz azul (400-470 nm) tiene una menor penetración y, desde el punto de vista terapéutico, es útil para afecciones de la piel en la epidermis [102]

- La luz amarilla (aproximadamente 540 nm) es efectiva en afecciones de la piel que incluyen enrojecimiento, hinchazón y otros efectos relacionados con la pigmentación [103]

- La luz roja (630-700 nm) puede alcanzar la activación de fibroblastos de la dermis, aumentando la expresión del factor de crecimiento fibroblástico, como procolágeno tipo 1 y matriz de metaloproteínasa-9 (MMP-9) [104]

- La luz infrarroja cercana (700-1200 nm) alcanza la máxima penetración en la piel; en estudios *in vivo* revelan su efectividad en la cicatrización de heridas mediante la estimulación de la angiogénesis [105]

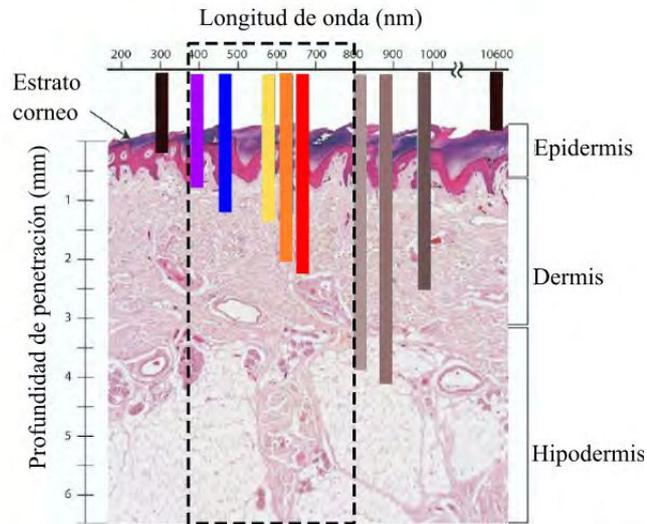


Figura 6. Penetración de la radiación en función de la longitud de onda en la piel.

La absorción en los órganos internos está bastante dominada por la alta absorción que tiene la hemoglobina y la melanina. La hemoglobina es la proteína transportadora de oxígeno en los glóbulos rojos, responsable del transporte de oxígeno desde los pulmones al tejido. Es un compuesto formado por cuatro grupos hemo con un átomo de hierro en el centro que actúa como sitio de unión para el oxígeno. La absorción depende de si la hemoglobina está oxigenada (HbO_2) o no (Hb). La absorción más alta es la llamada banda de Soret, a 414 nm y 433 nm para HbO_2 y Hb , respectivamente.

1.8. Mecanismo de drogas fotosensibilizadoras (Fs)

La base de la TFD es la producción, en el tejido iluminado, de fotoproductos tóxicos. Este procedimiento involucra dos etapas:

1. inyección o suministro del Fs
2. luego de la acumulación del Fs en el tejido a tratar, se lo ilumina con longitud de onda apropiada a las características de absorción del Fs

Los mecanismos biológicos que se desencadenan pueden variar con la naturaleza del Fs , la distribución del mismo en el tejido, su localización intracelular, entre otros parámetros. Sin embargo, la fotoquímica involucrada en la inducción del daño celular es similar para todos los Fs . Es el oxígeno singlete,

1O_2 , un estado molecular excitado del oxígeno, la principal especie citotóxica generada durante la TFD [106]. En el diagrama de Jablonski de la figura 7 se ilustra un diagrama de niveles de energía que muestra los procesos foto físicos y fotoquímicos que generan la formación de 1O_2 .

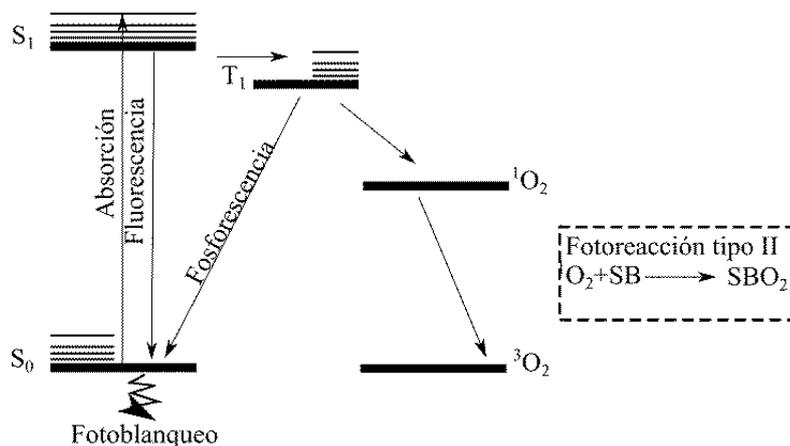


Figura 7. El diagrama de Jablonski para la reacción tipo II de fotooxidación resultante en formación de oxígeno singulete. Una molécula en estado fundamental S_0 , cuando absorbe fotones, es excitada a su primer estado excitado S_1 . El FS en S_1 puede regresar al estado fundamental mediante un proceso radiativo o no radiativo, o puede decaer mediante la combinación con un estado triplete excitado T_1 . Éste puede volver al estado fundamental o puede ser blanqueada por una colisión a una molécula de oxígeno en estado fundamental 3O_2 . Este proceso de blanqueo resulta en la formación de oxígeno singulete 1O_2 y puede contribuir al daño mediante su reacción con sustratos biológicos (SB).

El estado energético fundamental de cualquier molécula corresponde a su configuración o distribución electrónica de menor energía. Los estados electrónicamente excitados de las moléculas se forman cuando éstas absorben energía, normalmente en forma de luz. En ellos, las moléculas tienen configuraciones electrónicas diferentes y más energéticas que la del estado fundamental. Los estados excitados o activados, a diferencia del estado fundamental, presentan configuraciones electrónicas que tienen una duración limitada, por lo que tienden a regresar a la configuración de mínima energía del estado fundamental pasado un corto lapso. Una molécula presenta un estado energético de carácter singulete, cuando sus dos electrones más externos se encuentran apareados, es decir, cuando tienen números cuánticos de espín opuestos o antiparalelos. Por otro lado, una molécula presenta un estado energético de carácter triplete, cuando sus dos electrones más externos se encuentran despareados o paralelos, esto es, cuando tienen números cuánticos de espín iguales. Típicamente, el estado fundamental de la mayoría de las moléculas

suele tener carácter singulete S_0 , mientras que los estados excitados de cualquier molécula pueden tener carácter singulete S_1 o triplete T_1 . Un estado excitado singulete es de mayor energía que su correspondiente estado excitado triplete debido a la energía de apareamiento electrónico necesaria para que los dos electrones más externos tengan espines antiparalelos. Normalmente, toda molécula que absorbe un fotón de luz de longitud de onda adecuada puede alcanzar alguno de sus estados excitados. Sin embargo, las reglas de la mecánica cuántica establecen que, en ciertos casos, la probabilidad de absorción de un fotón para producir la excitación es muy baja. En estos casos, para poblar el estado excitado es necesario acudir al proceso de fotosensibilización, en el cual se transfiere la energía de excitación electrónica de una molécula a otra. El oxígeno singulete 1O_2 es un estado de mayor energía del oxígeno molecular que se encuentra incluido dentro de las especies reactivas del oxígeno (ROS) [107]. El oxígeno en estado fundamental, es decir, con su configuración electrónica de mínima energía, tiene dos electrones desapareados o de espines paralelos, por lo que se trata de un estado de multiplicidad triplete. El oxígeno singulete no se puede generar mediante absorción directa de luz por la molécula de oxígeno, por lo que la fotosensibilización constituye el método de elección para la preparación de oxígeno singulete [108]. Así una molécula de Fs absorbe un fotón de luz, generándose inmediatamente su estado excitado singulete. Éste, o decae a su estado fundamental (emitiendo fluorescencia en el proceso), o evoluciona rápidamente hasta un estado excitado triplete más estable y de tiempo de vida más largo. El sensibilizador en estado triplete T_1 puede desencadenar dos tipos de reacciones:

1. La reacción tipo I (RI) consiste en la formación de radicales e iones radicales, a través de la transferencia de protones o electrones, los cuales interactúan con oxígeno formando productos oxidados.
2. La reacción tipo II (RII), implica la transferencia de energía en forma directa, a través de la colisión con una molécula de oxígeno en estado fundamental. En dicha colisión, mediante un proceso de transferencia de energía por intercambio electrónico, se genera de nuevo el Fs en estado fundamental y oxígeno singulete. Éste es altamente reactivo y su longitud de difusión es menor a $0,1\mu m$ [106]

1.9. Dosimetría

A pesar del tremendo progreso en las últimas décadas, la dosimetría en la TFD resulta un gran desafío debido a la gran complejidad en su naturaleza. No tener bien definida la dosis precisa para predecir el efecto biológico hace

a esta terapia limitada a la hora de incorporarla en la clínica. [109] Actualmente, la mayoría de los tratamientos de TFD se realizan especificando tres parámetros, a saber: la dosis del Fs administrada (mg/kg), la dosis de luz de tratamiento J/cm^2 y el intervalo de espera entre el suministro de la droga y la aplicación de la luz. Las imprecisiones en la dosis efectiva que realmente se entrega a un tejido a tratar se reflejan en respuestas impredecibles y fallas en el control de la enfermedad. En primer lugar la concentración del Fs puede variar de un lugar a otro y de un paciente a otro debido a las heterogeneidades farmacocinéticas intra e interpacientes. En segundo lugar, la penetración de la luz en el blanco depende de las propiedades ópticas del tejido, las cuales difieren intra e interpacientes. En tercer lugar, la oxigenación del tejido no es tomada en cuenta: la cantidad de oxígeno singulete reactivo será menor que la esperada si el tejido es o se convierte en hipóxico durante el tratamiento con TFD. Adicionalmente, la cantidad de cada parámetro, es decir, la cantidad de Fs , luz y oxígeno puede cambiar e influenciar a los otros durante la TFD [110][111]. Reconocer y medir estratégicamente las variaciones de esas variables para guiar el tratamiento mediante TFD representan la esencia para conseguir una dosimetría exitosa. Para lograr este cometido, existen tres enfoques principales: dosimetría directa, implícita y explícita.

1.9.1. Directa

Mide los agentes citotóxicos en la TFD, esto es, el ROS (especies reactivas de oxígeno, incluyendo el oxígeno singulete 1O_2) ya sea través de métodos por fosforescencia, espectrofotométricos, fluorescencia o quimioluminiscencia. En caso de la fosforescencia, se puede determinar la concentración de 1O_2 a 1270 nm , aunque, debido a los cortos tiempos de vida media del 1O_2 y el bajo rendimiento cuántico para la fosforescencia, en ambientes biológicos, resulta una medida complicada[112]. El oxígeno singulete también puede ser detectado a través de métodos espectrofotométricos [113]. Por ejemplo el 9,10-diphenylanthracene (DPA) reacciona con el oxígeno singulete para formar endoperóxido estable. La detección y cuantificación del oxígeno singulete están basadas en las mediciones de absorbancia con lo cual el decrecimiento en la absorbancia a 355 nm fue correlacionado con la producción del oxígeno singulete, pero debido a la baja sensibilidad y pobre fotoestabilidad del DPA y sus derivados esta técnica es limitada [113].

Por otro lado, a través de cambios en las propiedades de la fluorescencia, tales como la intensidad de la señal de fluorescencia, la longitud de onda, el rendimiento cuántico y los tiempos de vida de la fluorescencia se pudo detectar el oxígeno singulete o moléculas de ROS [113]. Estos ensayos con fluorescencia presentan ventajas sobre los ensayos espectrofotométricos debi-

do a la alta sensibilidad y excelente especificidad en la detección de ROS y oxígeno singulete [114].

En un trabajo, se demostró que el rendimiento cuántico del oxígeno singulete en un *Fs* basado en porfirina, podía determinarse por medio de un sensor (SOSG) [115].

Entre todos los métodos mencionados, la quimioluminiscencia presenta la sensibilidad superior para la detección de 1O_2 y ROS [116]. Los compuestos quimioluminiscentes emiten luz espontáneamente cuando están en presencia de oxígeno singulete y ROS. Es más simple comparada con las mediciones por fluorescencia porque no necesitan ser excitados por luz y por lo tanto no presentan un fondo proveniente de la autofluorescencia del tejido ni interferencias por la dispersión de la luz, pero a pesar de sus ventajas, son poco selectivos y específicos [117].

1.9.2. Implícita

La idea de dosimetría implícita es explotar un único parámetro que integra el efecto de todos los factores de la TFD sin la necesidad de medirlos por separado. La fluorescencia del *Fs* es una cantidad conveniente para monitorear ya que los *Fs* presentan esta propiedad. Los *Fs* experimentan un fotoblanqueo irreversible durante la TFD que resulta en la disminución medible en la intensidad de fluorescencia. Dado que el fotoblanqueo puede ser mediado por especies reactivas de oxígeno, la pérdida de fluorescencia del *Fs* depende y es el resultado de las complejas interacciones entre los tres factores de la TFD, es decir, la luz, el *Fs* y el oxígeno. Por lo tanto, el fotoblanqueo proporciona una medida indirecta de dosis efectiva administrada en la TFD y es un enfoque demasiado simple para la evaluación de la eficacia del tratamiento[110][111]. Algunos estudios *in vitro* de TFD basados en PpIX, mostraron que el fotoblanqueo del *Fs* puede ser utilizado para calcular la dosis de oxígeno singulete y correlacionarlo con la sobrevida celular[118][119][120]. Por otro lado, estudios *in vivo* [121][122] demostraron la correlación entre el grado de daño tumoral y el fotoblanqueo del *Fs*[123][124][125]. Las mediciones de fluorescencia son, en principio, bastante sencillas. Al filtrar la luz de excitación reflejada es posible obtener señales bastante fuertes de los tejidos. Los problemas surgen cuando se trata de interpretar la señal de fluorescencia ya que los picos de fluorescencia son en su mayoría amplios y varios fluoróforos pueden superponerse. Las diferentes propiedades ópticas en la excitación y las longitudes de onda de detección también influyen en la señal. Dado que, para una región de excitación UV, la profundidad de penetración es de unos pocos cientos de micrómetros, mientras que en el visible puede ir un par de milímetros más; como consecuencia de esto, es que la intensi-

dad de una señal de fluorescencia no puede interpretarse directamente como una concentración de fluoróforo correspondiente. Otra consecuencia es que la configuración de la medición, tanto en la excitación como en la detección, influye fuertemente no solo en el nivel de señal sino también en la forma del espectro (figura 8).

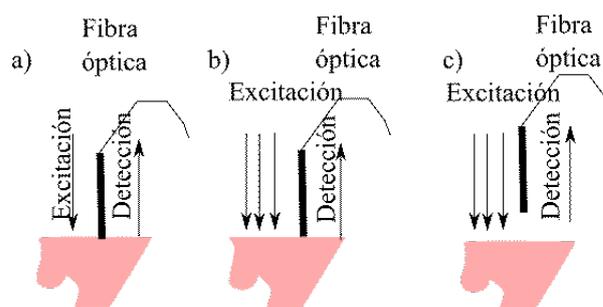


Figura 8. Diferentes sistemas de monitoreos puntuales: a) la excitación y la detección es a través de la misma fibra óptica; b) la excitación es externa y la detección es por fibra óptica apoyada en la superficie de detección; c) la excitación es externa y la detección es por fibra óptica no apoyada en la superficie de detección.

Por lo tanto, las mediciones mediante espectroscopía de fluorescencia pueden proporcionar información sobre una amplia gama de procesos moleculares [126].

1.9.3. Explícita

La dosimetría explícita mide cada una de los tres elementos de la TFD (la luz, el F_s y oxígeno) y los incorpora en un modelo dinámico para predecir la producción de ROS y los resultados del tratamiento. El primer paso vital en la dosimetría explícita es la determinación de la distribución de la fluencia de luz en el tejido. La tasa de fluencia de la luz de tratamiento puede ser medido directamente colocando un detector isotrópico en la superficie del tejido [127][128][129] o intersticialmente [130][131]. La distribución de la fluencia de la luz *in vivo* puede ser determinada de manera precisa a través de mediciones intersticiales; sin embargo, debido a la invasividad de esta técnica, se limita a mediciones en la tasa de fluencia en determinados puntos/profundidad, o a lo largo de un catéter, y no en un volumen tridimensional completo. Mediante la utilización de simulación Monte Carlo es posible el modelado de la distribución de luz en el tejido, lo cual constituye una herramienta práctica no invasiva [132] [133][134]. Modelos de cálculos como la teoría de aproximación de la difusión [135] y expresiones analíticas simples [136][137][138] permiten un modo rápido para el cálculo de la distribución de la luz.

Tanto para aproximaciones empíricas como computacionales el conocimiento *a priori* de las propiedades ópticas del tejido es esencial para predecir la fluencia de luz total dentro de un volumen prescrito clínicamente en la TFD. En diferentes estudios en los que miden las propiedades ópticas del tejido *in vivo* durante la TFD mostraron variaciones inter e intra-sujetos [139][140][141][142][143]. Algunas veces, en la clínica, los tratamientos de TFD son prescritos en términos de la luz entregada por una fuente láser y no de la fluencia total de luz que recibe el tejido, lo cual es una combinación entre la luz incidente y la luz dispersada.

Con el desarrollo de sistemas de monitoreo en tiempo real, los cuales incluyen sistemas multicanales capaces de registrar la tasa de fluencia de luz en múltiples sitios, permiten al investigador clínico medir de manera precisa y entregar una dosis de luz homogénea al tejido durante la TFD [144][145][146][147].

El segundo elemento a medir en la dosimetría explícita es la concentración del F_s y su distribución espacial en el tejido. La mayoría de los F_s son fluorescentes y por lo tanto la concentración *in vivo* puede ser medida a través de la detección de la fluorescencia emitida. Los protocolos clínicos de la TFD sólo especifican la dosis del F_s en términos de la cantidad en mg de F_s suministrada por peso del paciente en kg [148]. Sin embargo, muchos estudios demostraron que la concentración real del F_s es heterogénea y varía entre pacientes [149][150][151]. Finalmente, en la dosimetría explícita debe medirse la concentración y distribución de oxígeno en el tejido. La distribución de oxígeno tisular puede variar temporalmente y espacialmente durante la TFD como consecuencia del proceso fotoquímico, y puede variar en el flujo sanguíneo debido a la respuesta vascular inducida por la TFD [152]. Existen varias técnicas para medir los niveles de oxígeno en los tejidos, por ejemplo, las técnicas histográficas miden la tensión de oxígeno intersticial e intravascular (pO_2) directamente con electrodos tipo Clark [153], o dispositivo de detección óptica (optodos) basados en luminiscencia o fosforescencia [154], entre otras. Además se puede obtener en forma indirecta la concentración de oxígeno determinando su saturación en la hemoglobina. La concentración de oxihemoglobina (Hbo) y la deoxihemoglobina (Hb) se pueden medir usando espectroscopía por reflectancia difusa o de absorción. Otras técnicas utilizadas para medir la oxigenación tisular, involucran la resonancia magnética para obtener imágenes internas de la oxigenación tisular [155][156].

1.10. Mecanismo de destrucción del tumor

Algunos autores sostienen la opinión que la apoptosis juega un papel significativo en la inactivación celular inducida por la TFD. Ciertamente, es

la necrosis el mecanismo más importante, por lo menos para grandes dosis de TFD. Los *Fs* aceptados clínicamente son lipofílicos y por ende se ligan a las membranas celulares. Por lo tanto, proteínas y antígenos presentes en las membranas celulares representan blancos sensibles en la TFD [157][158][159][160]. El daño en las proteínas probablemente sean la razón de porqué las células son más sensibles en la fase celular S que en las fases G1 y G2. El daño en las mitocondrias causado por la acumulación del sensibilizador en dichas organelas fue ampliamente demostrado [158] y podría estar implicado en el inicio de la apoptosis a baja exposición de luz [161][162], mientras que para alta exposición el mecanismo sería la necrosis [163].

La fisiología en el tejido tumoral es diferente a la presente en un tejido normal. Esa diferencia permite la localización selectiva del *Fs* en un tejido respecto del otro cuando se lo administra en forma sistémica (Figura 9). Los tumores contienen muchos macrófagos los cuales acumulan el *Fs* en forma agregada y probablemente los monomerizan [164]. La vasculatura tumoral presenta poros, lo cual facilita al *Fs* en forma agregada o ligada a macromoléculas, difundir más fácilmente dentro del tumor respecto del tejido normal [165][166]. El compartimento extracelular tumoral presenta valores de pH bajos y muchos *Fs* se protonan y se vuelven lipofílicos [167]. El sistema linfático de muchos tumores es pobre, lo cual favorece la retención de moléculas fotosensibles [166][168].

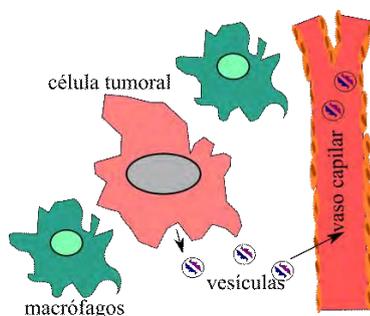


Figura 9. Mecanismo de localización selectiva tumoral del *Fs*.

Las propiedades del tejido tumoral que contribuyen a la distribución selectiva del *Fs* son: número elevado de proteínas receptoras de baja densidad, valores de pH bajo y la presencia de macrófagos. La estructura del estroma tumoral se caracteriza por un espacio intersticial grande, una vasculatura porosa, un drenaje linfático comprometido, abundante colágeno (que une porfirinas [169]) y grandes cantidades de lípidos (que tienen una alta afinidad a colorantes lipofílicos [170]) favorece la distribución preferencial del sensibilizador. Se observó que en tejido neoplásico [171] el uso de vehículos (vesículas fosfolipídicas o emulsiones de aceites) utilizados en la formulación de *Fs* del

tipo porfirinas mejoraban su afinidad cuando se aumentaba la hidrofobicidad de los vehículos. Este hecho fue apoyado por trabajos donde se observó que liposomas asociados a *Fs* presentan una mayor eficiencia y selectividad en blancos tumorales comparado con el mismo *Fs* administrado en una solución acuosa [172]. En general, el uso de vesículas liposomales que están en estado fluido a la temperatura del cuerpo de 37°C parecen orientar el *Fs* hacia lipoproteínas de baja densidad. Estos resultan en una liberación preferencial hacia células neoplásicas [173]. Muchos tipos de células tumorales expresan una gran cantidad de receptores de membrana para proteína de baja densidad, que promueve la internalización del *Fs* unido a proteínas de baja densidad por vía endocitótica [174]. Los porfirinoides endocitosados se localizan en gran medida en dominios membranosos, incluidos el plasma y las membranas de las mitocondrias, el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático rugoso [174]. Este patrón de distribución tiene implicaciones obvias para los mecanismos por los cuales la TFD induce daño tumoral: por lo tanto, los *Fs* transportados por la albúmina causan un daño extenso del sistema vascular que promueve la isquemia tumoral y la hipotensión, mientras que los *Fs* incorporados por proteínas de baja densidad inducen un daño temprano importante en las células malignas a través de los procesos necróticos y apoptóticos [175].

Tanto las microesferas, como los anticuerpos monoclonales dirigidos hacia antígenos localizados en la superficie de células neoplásicas, fueron utilizados como agentes transportadores de fotosensibilizadores hacia el tumor [176].

Se demostró que los macrófagos asociados a tumores en modelo animal absorben grandes cantidades de HpD [177] y Photofrin [178]. Por lo tanto, los macrófagos asociados a tumores juegan un papel en la captación selectiva de *Fs* en forma agregada.

El líquido intersticial es el líquido que rodea las células y se encuentra localizado entre sus membranas plasmáticas y las paredes vasculares. El valor de pH del fluido intersticial es menor y el contenido del ácido láctico es mayor en los tumores que en la mayoría de los tejidos normales [179]. Sin embargo, el pH intracelular es idéntico o ligeramente mayor en tumores que en tejido normal [180]. El pH ácido en tumores ofrece varias posibilidades terapéuticas [181]. El equilibrio entre las diferentes especies iónicas de porfirinas es complejo [182], pero en general la lipofilia y la captación celular aumentan con la disminución del pH [183].

La distribución de *Fs* inhomogéneos dentro del tumor podría ser una de las limitaciones. Korbelik y Krosel [184] también, demostraron que la acumulación de fotosensibilizador y la muerte de las células tumorales disminuyen con la distancia de las células tumorales al suministro vascular.

Otro parámetro que puede limitar la muerte directa de células tumorales es la

disponibilidad de oxígeno dentro del tejido durante el tratamiento TFD. Dos mecanismos pueden producir tales limitaciones: el fotoconsumo de oxígeno durante el proceso fotodinámico y los efectos de la TFD en la microvasculatura tisular.

La tasa de fluencia se puede ajustar hacia valores más bajos para disminuir el consumo de oxígeno pero suficientes para facilitar el mantenimiento de niveles de pO_2 tisular durante el tratamiento. Un parámetro importante que se relaciona con la tasa de consumo de oxígeno en los tejidos es el fotoblanqueo del sensibilizador porque la reducción de los niveles de sensibilizador también reduce la tasa de consumo de oxígeno fotoquímico [185]. Otro enfoque hacia el mantenimiento del oxígeno tisular es la iluminación fraccionada [186], lo que permite la reoxigenación durante los periodos [187] en oscuridad. Generalmente, los regímenes de tratamiento que utilizan baja tasa de fluencia o luz intermitente, muestran una eficacia superior en retrasar el crecimiento tumoral [188]. El daño vascular, que ocurre después de completar el tratamiento de TFD, contribuye al control tumoral a largo plazo. El colapso microvascular se puede observar fácilmente después de la TFD [189] y puede conducir a una grave y persistente hipoxia/anoxia tumoral [190]. Desafortunadamente, la disminución de pO_2 del tumor a una distancia de los vasos sanguíneos sigue siendo un obstáculo para el uso de Fs clásicos debido a la necesidad de presencia de oxígeno molecular para iniciar la muerte celular. En esta perspectiva, el trabajo de [191] recientemente desarrolló moléculas basadas en Ir (III) capaces de oxidar biomoléculas mediante procesos de tipo I en condiciones libre de oxígeno en cultivos de células tumorales. Los mecanismos subyacentes con los efectos vasculares de la TFD difieren mucho con diferentes Fs . La TFD también puede conducir a la constricción de los vasos a través de la inhibición de la producción o liberación de óxido nítrico por el endotelio. [192] En experimentos preclínicos, la respuesta microvascular a la TFD puede ser inhibida parcial o completamente mediante la administración de agentes que afectan la generación de eicosanoides, como indometacina [193], otros inhibidores de tromboxano [194], y aspirina [195]; y esta inhibición puede disminuir notablemente la respuesta tumoral. Por otro lado, la administración de agentes inhibidores de la óxido nítrico sintasa o eliminando el óxido nítrico parece mejorar la cura tumoral, aparentemente al mejorar la disrupción inducida por la TFD en la perfusión vascular [196]. Durante la última década, la nanotecnología permitió el rápido desarrollo de sistemas para la entrega precisa de medicamentos a los tejidos objetivo y mejorar la efectividad de la terapia anticancerígena [197][198][199]. El uso de nanopartículas poliméricas permite la entrega dirigida de más moléculas fotosensibilizadoras a la región tumoral y evita la degradación del Fs antes de alcanzar el tejido tumoral objetivo [200]. Además, el uso de polímeros

permite la unión simultánea de otros ligandos a las moléculas de *Fs*, por ejemplo, sustancias de contraste o marcadores fluorescentes que permiten la exploración de imágenes clínicas [201] [202][203].

1.11. Efectos inmunológicos de la TFD

Las propiedades curativas de la TFD surgen de la muerte de células cancerosas mediante el efecto citotóxico iniciadas por el estrés oxidativo. Estos efectos secundarios no se limitan en absoluto a la muerte por isquemia causada por la oclusión de la vasculatura tumoral. Otros eventos que se enfocan cada vez más, son los siguientes: 1) actividad antitumoral de células inflamatorias y 2) reacción inmune en el tumor por el *Fs*. Todos pueden ser provocados por daño fototóxicos que no es necesariamente letal y que tiene un impacto en el efecto inflamatorio. Los cambios inducidos fotodinámicamente en la membrana plasmática y en las membranas de organelas celulares, que representan la mayoría del daño provocado por muchos *Fs* para TFD, pueden desencadenar eventos con consecuencias de largo alcance. Un proceso iniciado a nivel de membrana puede estar implicado en las rutas de transducción de señales. Estos incluyen una expresión mejorada de las proteínas de stress y genes de respuesta temprana [204], activación de genes reguladores del proceso de muerte celular por apoptosis [205] y, posiblemente, el aumento de la regulación de algunos genes de citoquinas. Debido a su papel en la adhesión celular y en la presentación de antígenos, algunas de las proteínas de stress inducidas por TFD participan en el desarrollo de la respuesta inmunoinflamatoria [206]. Lesiones fotooxidativas de lípidos de membrana provocan una rápida activación de las fosfolipasas membranosas [205] que conduce a la degradación acelerada de fosfolípidos con una liberación masiva de fragmentos de lípidos y metabolitos de ácido araquidónico [207]. Estos productos son poderosos agentes mediadores de la inflamación. Una fuerte reacción inflamatoria es un evento central en el mecanismo de destrucción tumoral mediada por TFD. Las diferencias en la naturaleza e intensidad de la reacción inflamatoria entre los tejidos normales y cancerosos pueden contribuir a la selectividad del daño tisular inducido por TFD [208]. Un sello distintivo importante del proceso inflamatorio es la liberación de una amplia variedad de potentes mediadores, incluidas sustancias vasoactivas, componentes de los complementos y cascadas de coagulación, proteínas de fase aguda, proteinasas, peroxidasas, radicales, quimioatrayentes leucocitarios, citoquinas, factores de crecimiento y otros inmunorreguladores [209]. La administración local de virus oncolíticos a tumores puede promover inmunidad contra el cáncer [210]. La inmunoterapia contra el cáncer al educar

o estimular el propio sistema inmunitario de los pacientes para atacar las células cancerosas demostró respuestas terapéuticas prometedoras en la clínica. Sin embargo, existen desafíos claves como la tasa de respuesta clínica limitada y los efectos adversos relacionados con la autoinmunidad.

Recientemente, se descubrió que una diversa gama de métodos de tratamiento local asistido por biomateriales que incluyen radioterapia localizada, quimioterapia o la fototerapia, estimulando el sistema inmunitario, a menudo induciendo la muerte celular inmunogénica [211].

1.12. La fluorescencia de los Fs : Diagnóstico Fotodinámico

El desarrollo del diagnóstico de fluorescencia está relacionado, estrechamente, con la evolución de la TFD, principalmente debido a que la mayoría de los Fs son fluorescentes. Por lo tanto, una lesión puede ser diagnosticada y tratada a la vez en la misma ocasión con la misma droga. Si se usa solo para diagnóstico, la dosis del medicamento dado es a menudo varias magnitudes más bajas que la dosis terapéutica correspondiente a minimizar la fotosensibilización no deseada.

El diagnóstico fotodinámico (DFD) consiste en la utilización de cromóforos exógenos para la obtención de una respuesta lumínica característica (fluorescencia) por parte de un tejido cuando éste es iluminado por un haz de luz de una determinada longitud de onda [212], como la protoporfirina IX acumulada en el interior de las células neoplásicas, al ser incidida por un haz de luz de determinada longitud de onda (380-470 nm). Este estado de activación es un estado inestable e inmediatamente el electrón regresa a su nivel energético habitual, liberando un paquete de energía en forma de luz roja fluorescente de una longitud de onda de 600-700 nm , que es el efecto que al final nos pone en evidencia la lesión neoplásica. A través del DFD es posible diagnosticar un mayor número de lesiones lo que conlleva una disminución de la tasa de tumores que pasan inadvertidos, como se expone en los trabajos [213] [214] en el ámbito de la urología.

En particular, medir la fluorescencia de los agentes fotosensibilizantes utilizados en TFD mejoró la detección y demarcación de tumores [215]. Sin embargo, la interpretación de la intensidad de las mediciones de fluorescencia son problemáticas ya que la fluorescencia de los tejidos se ve significativamente afectada por la absorción y dispersión tanto en las longitudes de onda de excitación como de emisión.

La variación de las propiedades ópticas del tejido con la longitud de onda

da lugar a la distorsión de espectros de fluorescencia de excitación y emisión y, como resultado, es difícil de identificar los fluoróforos responsables de la fluorescencia y sus contribuciones relativas a ella. Además, los cambios en la intensidad de fluorescencia debido a las variaciones en las concentraciones de fluoróforo no pueden ser distinguidos fácilmente de los que surgen de variaciones en absorción y dispersión [216]. Vale la pena señalar, sin embargo, que para que la dispersión y la absorción puedan producir información significativa se deben aplicar técnicas de corrección, por ejemplo, cambios en la absorción puede reflejar cambios en la concentración de cromóforos o su estado de oxigenación, y cambios en la dispersión es indicativa de cambios en la estructura del tejido [217]. Comprender las interacciones de la radiación no ionizante con organismos vivos es el foco de mucha investigación en las últimas décadas. La naturaleza compleja de estas interacciones justifica el desarrollo de estudios teóricos y experimentales para obtener una idea de predecir y monitorear el éxito de protocolos de terapia fotodinámica. Hay un ímpetu importante hacia las recomendaciones basadas en evidencia para el diagnóstico, tratamiento y manejo del paciente. Es importante para mejorar los protocolos de dosimetría. La fluorescencia en la TFD clínica puede usarse para detectar y diagnosticar afecciones premalignas y malignas, mientras que el fotoblanqueo puede controlar los cambios en la fluorescencia durante el tratamiento. La combinación de los datos clínicos empíricos de fotoblanqueo de fluorescencia con modelado computacional permite investigar los protocolos de dosimetría TFD clínica con el fin de optimizar regímenes de tratamiento [218].

1.13. Termografía infrarroja para detección de afecciones y seguimiento de la TFD

Así como la fluorescencia descrita en el apartado de dosimetría, la medicina utiliza la termografía con fines diagnósticos, a partir, de la información procedente de imágenes infrarrojas del cuerpo humano. Un gran número de trabajos previos, se han enfocado en los fundamentos del uso de las imágenes térmicas para detectar cambios [221][222][223]. Esta técnica determina las áreas del cuerpo que presentan un flujo sanguíneo irregular, por aumento o por defecto, lo cual se traduce en cambios de temperatura. Se utilizó, por ejemplo, en el herpes zoster y en el seguimiento de hemangiomas [219][220][227][228]. En un interesante trabajo previo [224], se detectaron diferencias en la temperatura de la piel entre pacientes con carcinoma basocelular y queratosis seborreica, además sugieren un parámetro NCV (numerical co-

lor value) como método complementario para el diagnóstico fotodinámico. El valor numérico del color (NCV) se define como la relación de componentes de color rojo a verde (R/G) en cada píxel y se realiza la cuantificación del valor de color. La proporción de color rojo de la imagen obtenida se relaciona con etapas histológicas [225]. También estudios de tumores en ratones BALB/n originados de líneas celulares humanas de cáncer de mama MDA-MB-231 o MCF7 mostró a la termografía como una técnica complementaria útil en el monitoreo de la dinámica de crecimiento tumoral [226]. En la TFD a menudo se cuestiona el componente térmico que puede resultar de la deposición de altas dosis de luz en el tejido. Los resultados del trabajo [229] muestran que la mayor parte de la energía depositada se consume en la activación del F_s y, por lo tanto, en el efecto fotodinámico.

Capítulo 2

Materiales y métodos

2.1. Sistemas biológicos

2.1.1. *in vitro*: cultivos celulares

El término cultivo celular se refiere al crecimiento de células *in vitro*. En los cultivos celulares, las células no están organizadas en verdaderos tejidos. Cuando las células requieren la adhesión a un sustrato para crecer y dividirse, el crecimiento se realiza en una única capa celular (monocapa). Esta monocapa crecerá hasta alcanzar cerca del 100 % de confluencia (máxima capacidad de cubrimiento de superficie); pasado esta etapa, las células pueden comenzar a desprenderse y morir. No obstante, algunas variantes de células tumorales son capaces de apilarse y dar lugar a multicapas. Hay dos tipos básicos de cultivos celulares: cultivo primario y cultivos de líneas celulares. Un cultivo primario denota el primer cultivo de células, tejido u órgano, obtenidas directamente desde un organismo. Todos los cultivos celulares comienzan como un cultivo primario. La transferencia de células de una cápsula a otra, se denomina pasaje o subcultivo. Una vez que el cultivo primario es subcultivado, se obtienen los cultivos de líneas celulares[296]. En este trabajo se utilizaron:

- Pasaje entre 50-60 de la línea celular HeLa (células de cáncer de cérvix humano)
- Células tumorales TMC subcultivadas a partir del cultivo primario de células tumorales de ratones BALB/c de endocría portadores de un fibrosarcoma inducido experimentalmente.

Los procedimientos de mantenimiento de las células y preparación de los cultivos se realizaron en condiciones de esterilidad empleando una campana de flujo laminar (Figura 10a) y condiciones de trabajo y de bioseguridad adecuadas. En este caso, se cultivaron monocapas de células HeLa y TMC en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB), antibióticos (GibcoTM Antibiotic-Antimycotic (100X)) y bicarbonato de sodio utilizando cápsulas de Petri plásticas de 3,5 cm de diámetro (Geiner bio-one). Para tal fin se realizaron siembras convenientes con medio conteniendo 50000-100000 células por mililitro, y se incubó en estufa de cultivo a 37 °C en atmósfera de dióxido de carbono y 97 % de humedad (Isotemp Fisher Scientific, Figura 10b). Un esquema del procedimiento experimental para los sistemas *in vitro* 2D, se muestra en la figura 11a.



Figura 10. Equipamiento en el laboratorio: a) flujo laminar; b) estufa de cultivo celular a 37°C .

2.1.2. *in vitro*: esferoides de células HeLa

Los esferoides celulares se obtuvieron incorporando una suspensión de 100000-400000 células/*ml* en una cápsula de Petri bacteriológica de 10 *cm* de diámetro e incubando en estufa de cultivo por 7-10 días. Se empleó medio de cultivo RPMI suplementado con antibiótico en 10 % de suero fetal bovino (SFB), que se renovó cada 3 días. Posteriormente, los esferoides fueron seleccionados individualmente con micropipetas y sembrados en cápsulas adherente con medio de cultivo fresco. Los cúmulos elegidos, se incubaron toda la noche en cápsulas de Petri adherentes de 3,5 *cm* de diámetro [231][232]. En cada cápsula de Petri se colocó entre 5-10 esferoides. Un esquema del procedimiento experimental para los sistemas *in vitro* 3D se muestra en la figura 11b.

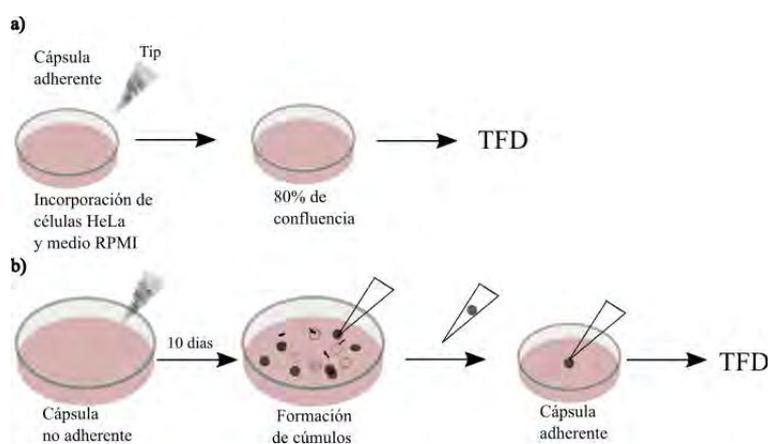


Figura 11. Procedimiento experimental: a) siembra de células HeLa hasta aproximadamente el 80 % de cubrimiento de la superficie de la cápsula de Petri adherente; b) obtención de esferoides para las aplicaciones de TFD.

2.1.3. *in vivo*: fibrosarcomas en murinos BALB/c

Se utilizaron murinos BALB/c alimentados con pellets esterilizados libres de alfalfa. En una primera etapa, se indujeron tumores en el flanco de los ratones con metilcolantreno [233][234]. En una segunda etapa, a partir de aquellos, se obtuvieron células TMC las cuales fueron subcultivadas a través de la inoculación subcutánea en el flanco derecho de ratones sanos. Luego de, aproximadamente, dos semanas se obtuvieron tumores de tamaños entre 0,4 y 0,8 *cm* de diámetro. Para realizar los experimentos se seleccionaron tumores similares al tacto y con características geométricas no superiores a 10 *mm* de longitud x 10 *mm* de ancho x 5 *mm* de alto (Figura 12a). Eventualmente, los tumores se extirparon de los ratones y se fijaron inmediatamente en 4 % solución neutralizada de formalina tamponada. Los tumores fijados se cortaron y se colocaron en casetes y fueron procesados de acuerdo al protocolo estándar. Brevemente, las muestras se deshidrataron por inmersión en soluciones de etanol de concentración creciente (70, 80, 95 y 100 % etanol), xileno, se embebieron en parafina y cortaron en secciones de 5 μm . Las secciones secas se desparafinaron usando xileno, etanol al 96 % y 70 % etanol, se rehidrataron y tiñeron con hematoxilina y eosina.



Figura 12. Modelos tumorales en murinos: a) ratones BALB/c de pelo blanco con inoculación de células de fibrosarcoma de origen animal; b) ratones BALB/n inmunodeprimidos con inoculación de células HeLa, las cuales corresponden a una línea celular humana.

2.1.4. *in vivo*: modelo de cáncer de cérvix en murinos BALB/n

Se compraron 6 hembras BALB/n inmunodeprimidas (se necesitan cepas murinas inmunodeprimidas para generar un tumor proveniente de una línea celular humana) de 3 meses de edad con pesos entre 22,15 y 24,6 *g* en el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP. Un total de 5 millones de células HeLa fueron inoculados subcutáneamente en 200 μl de solución fisiológica en el flanco derecho de cada murino (Figura 13); transcurridos 10 días se obtuvieron tumores como los mostrados en las figura 12b. Periódicamente, se midió el volumen de los tumores hasta alcanzar un

tamaño óptimo para el procedimiento experimental, no superiores a 1 cm^3 [235].

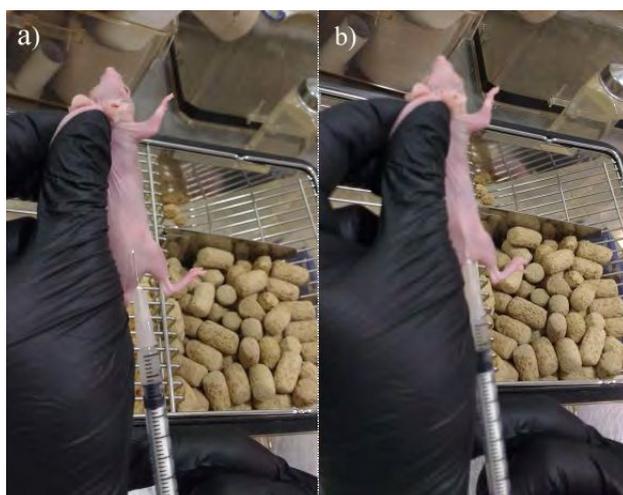


Figura 13. Generación tumoral en BALB/n: a) sitio de inyección de células HeLa; b) fotografía del momento de la inyección subdérmica.

2.2. Drogas fotoactivables

El m-THPC ((*Foscan*[®]), Biolitec Pharma Ltd. United Drug House, Magna Drive Dublin 24, Ireland) fue el *Fs* utilizado en los experimentos de TFD. Éste, es una porfirina reducida que pertenece a la familia de las clorinas (Figura 14a) y presenta un pico de absorción más fuerte en la zona espectral UV-violeta que en la zona correspondiente al rojo (Figura 14b).

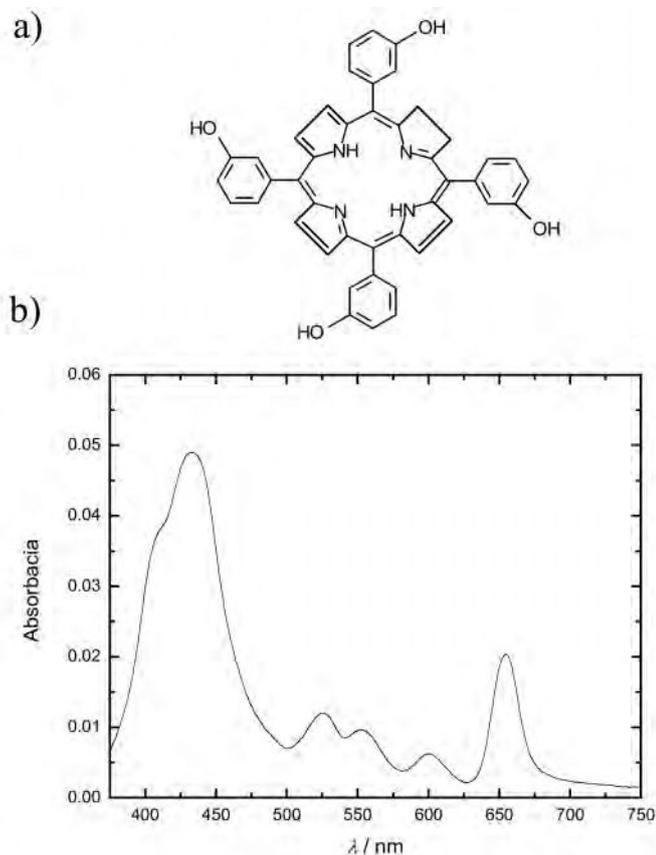


Figura 14. Características del Foscan[®]): a) estructura química; b) espectro de absorción desde 380 nm a 750 nm.

Después de la siembra, los cultivos se incubaron con el *Fs* en medio de mantenimiento RPMI suplementado con 10 % de SFB, antibióticos y bicarbonato de sodio, por lo que las células se mantienen en una suspensión de células en un estado metabólico relativamente bajo. Las concentraciones de *Fs* utilizadas en los experimentos fue de $0,05 \leq C_F \leq 2 \mu\text{g}/\text{ml}$ y se obtuvieron por dilución de una solución madre de $100 \mu\text{g}/\text{ml}$. Por otra parte, los ratones BALB/c al igual que los BALB/n fueron inyectados en la porción medial de la cola, con una dosis de m-THPC de $0,75 \text{ mg}/\text{kg} - 1,5 \text{ mg}/\text{kg}$, de acuerdo a las recomendaciones del protocolo (Figura 15); y colocados en una caja oscura, para evitar efectos no deseados de la TFD, particularmente en los ojos del ratón (Figura 16).

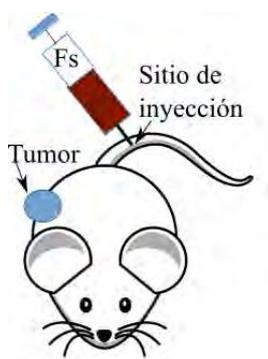


Figura 15. Esquema del sitio de inyección de la droga fotoactivable en murinos.



Figura 16. Caja oscura luego de la inyección del *Fs* y resguardado hasta el momento de la iluminación.

En algunas experiencias, los ratones BALB/*c* se rasuraron en la zona tumoral para evitar la interferencia del pelo en las mediciones.

2.3. Fuentes de iluminación

Para llevar a cabo los experimentos de TFD se desarrollaron, en el laboratorio, lámparas LED especialmente diseñadas para tal fin (cuadro 2.1). Los sistemas LED utilizados en las distintas experiencias de TFD fueron: una lámpara LED con dos lupas; LEDs individuales y lámparas de 4 LEDs con la posibilidad de concentrar la luz en un punto de interés. Para ello, se

Tipo	$\lambda_n \pm \Delta\lambda$ (nm)	Potencia (W)	Experiencias	Sistema óptico	Nombre
Láser	654 \pm 1,41	0,62	<i>in vitro</i> en HeLa	fibra óptica acoplada a microlente	l-654-0,62
Láser	654 \pm 1,19	1,1	<i>in vitro</i> en HeLa	fibra optica acoplada a microlente	l-654-1,1
LED	637 \pm 9	1,06	<i>in vitro</i> 2D HeLa y TMC <i>in vivo</i> en TMC	2 lentes convergentes de 5 Dp y 9,75 Dp	L-637-1,06
LED	395 \pm 7,5	1	<i>in vitro</i> 2D y 3D	lente convergente 8°	L-395-1
LED	460 \pm 7,5	1	<i>in vitro</i> 2D	lente convergente 8°	L-460-1
LED	635 \pm 9	1	<i>in vitro</i> 2D	lente convergente 8°	L-635-1
LED	660 \pm 7	1	<i>in vitro</i> 2D y 3D	lente convergente 8°	L-660-1
LED	395 \pm 7,5 cada LED	4	<i>in vivo</i> HeLa	lente convergente 8° cada LED	L-395-4
LED	635 \pm 7,5 cada LED	4	<i>in vivo</i> HeLa	lente convergente 8° cada LED	L-635-4
LED	395 \pm 7,5 cada LED	12	<i>in vivo</i> HeLa	lente convergente 8° cada LED	L-395-12
LED	635 \pm 9 cada LED	12	—	lente convergente 8° cada LED	L-635-12
LED	420 \pm 9 cada LED	12	<i>in vivo</i> HeLa	lente convergente Des° cada LED	L-420-12
LED	660 \pm 7 cada LED	12	—	lente convergente Des° cada LED	L-395-12

Cuadro 2.1: Sistemas de iluminación desarrollados en las experiencias. En el cuadro, figuran las siguientes abreviaturas; L:LED, l: láser, Dp: Dioptrías, Des:desconocido.

desarrollaron dos modelos (sistema I y sistema II) para modificar los grados de libertad del sistema lente-LED-disipador. El sistema I, se muestra en las figuras 17, 18 y 19a. Cada LED, ya sea de 1 W o 3 W está acoplado a un disipador (Figura 17a) y a una lente (Figura 17b), y montados en una plataforma de tornillos ajustables (Figura 17c). La fuente de alimentación (Figura 17d) permite modificar la intensidad de iluminación; y conectar, ya sea la lámpara de 12 W o la de 4 W. En éste último caso, el cable es flexible sin malla de siete hilos de 0,3 mm de diámetro.

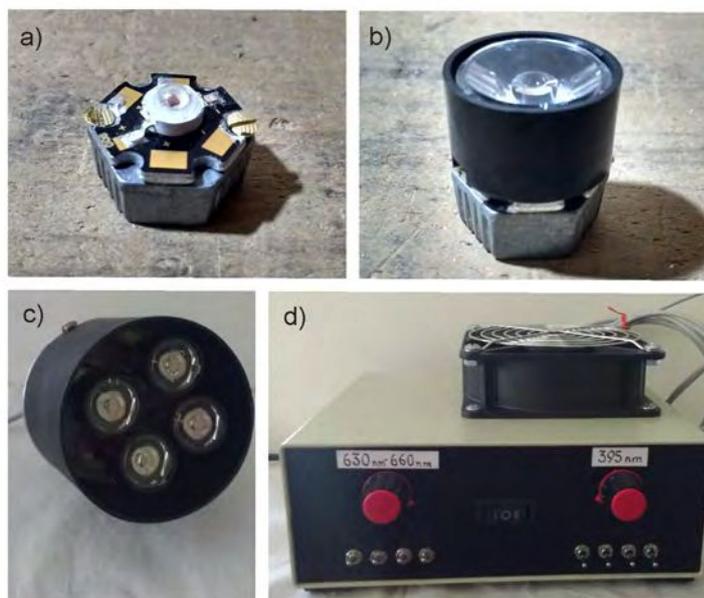


Figura 17. Construcción de las fuentes LEDs con potencia máxima total de 12 W/4 W lograda con cuatro LEDs de 3 W/ 1 W cada uno, para λ_c de 635 y 395 nm : a) sistema LED-disipador, es un LED de alta potencia de 3W/ 1 W acoplado a un disipador individual; b) sistema lente-LED-disipador, es una lente de 8 ° acoplada al sistema LED-disipador, esto constituye un módulo independiente; c) fotografía de la lámpara LED de 12 W con los cuatro sistemas lente-LED-disipador y d) fuente de alimentación de la lámpara LED de 12 W/4 W, con la posibilidad de encender uno, dos, tres o los cuatro LEDs simultáneamente; también se puede regular la intensidad total de la corriente. Tiene una entrada para un conector de cinco pines (correspondiente a la fuente de 12 W) y otra para un conector de siete pines (para la fuente de 4 W).

En este sistema, la lente, el LED y el disipador forman un módulo independiente. La figuras 18a y 18c corresponde al modo de haces paralelos, mientras que las figuras 18b y 18d corresponden al modo convergente.

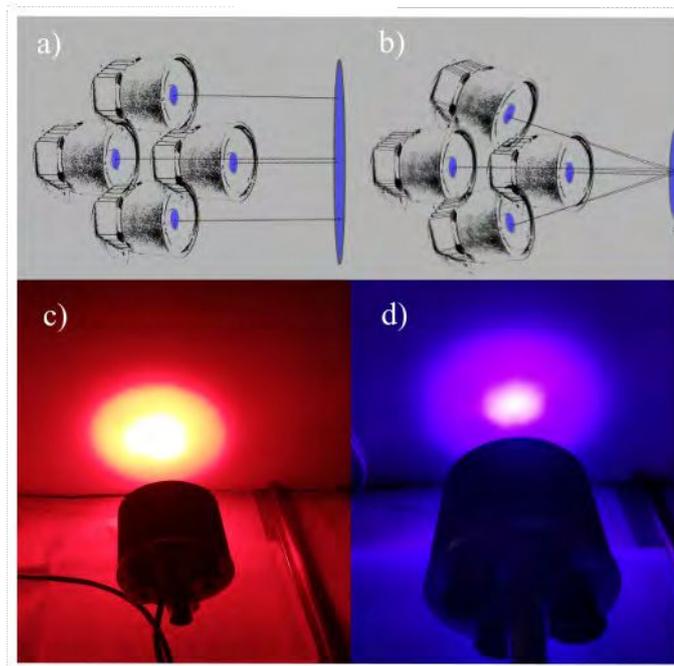


Figura 18. Diseño de lámparas LED capaces de concentrar la luz: a) y b) esquema de enfoque de la lámpara LED formada por cuatro módulos independientes móviles, de los cuales, cada uno, está formado por una lente-LED-disipador; c) y d) fotografías del sistema de enfoque de la lámpara de cuatro LEDs.

El sistema II consiste en cuatro LEDs y sus respectivos disipadores que se calzan en las lentes mediante la presión ejercida por sendos resortes (Figura 19c). Para regular el posicionamiento de los LEDs-disipadores se manipulan los tornillos que atraviesan una plataforma en forma de cruz. Las cuatro lentes se encuentran montadas en carcasas metálicas, las cuales, tienen movimiento a lo largo de sus ejes. Estos ejes forman un rombo imaginario circunscrito simétricamente en un círculo que contiene a las lentes (Figura 19d).

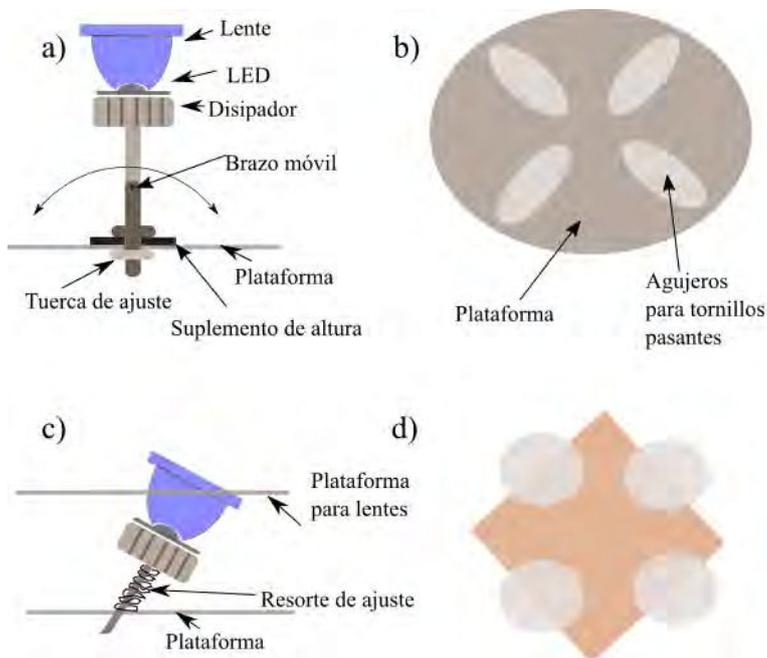


Figura 19. Esquema de lámparas: a) sistema I de ajuste mediante el balanceo de un brazo móvil; b) plataforma sobre la que se apoya el conjunto lente-LED-disipador y es atravesada por un tornillo; c) sistema II de resorte; d) rombo imaginario formado por las cuatro lentes.

La ventaja respecto al sistema de concentración descrito anteriormente, es que el movimiento de las lentes puede hacerse en forma conjunta y está regido por un preciso sistema mecánico que facilita el rápido enfoque y convergencia de los cuatro LEDs (Figura 20).



Figura 20. Diseño de L-660-12: a) fotografía del sistema II de la figura 19c; b) cuatro lentes móviles montadas en una plataforma; c) el sistema LED-disipador se apoya en tornillos que atraviesan otra plataforma.

2.3.1. Sistemas de iluminación para tratamiento de los sistemas *in vitro*

En el capítulo 3, en experiencias *in vitro* e *in vivo* se utilizó la lámpara L-637-1,06 (Figura 21a) que fue adquirida y caracterizada a través de mediciones fotométricas y radiométricas ya que se desconocían sus parámetros técnicos (ver apartado siguiente, correspondiente a caracterización fotométrica de lámparas). Por un lado, se la comparó con el láser de uso clínico (Figura 21b) colocando ambas fuentes a una distancia tal que entreguen la misma dosis de luz en el área deseada (J/cm^2) por un tiempo de iluminación máximo de 12 *min*.

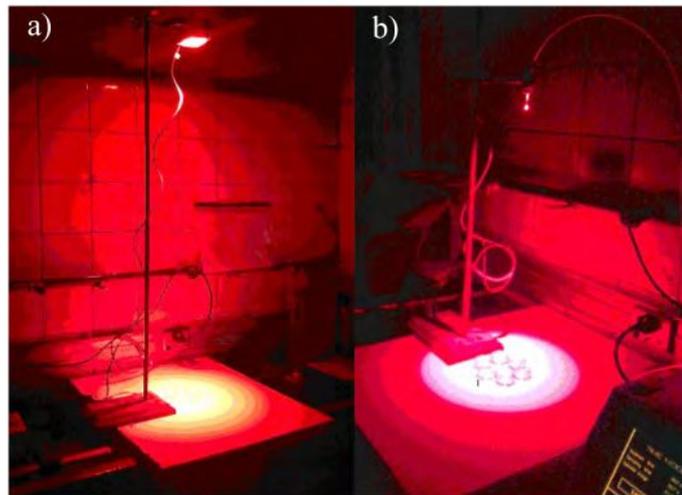


Figura 21. Fuentes de iluminación: a) L-637-1,06 ubicada a 1 *m* de distancia de las cápsulas de Petri; b) l-652-1,1 ubicado a una distancia de 0,5 *m* de las cápsulas de Petri.

Por otra parte, en modelos celulares 2D y 3D, luego de 24 *h* de incubación con el *Fs*, utilizando los sistemas de iluminación propios (L-395-1, L-460-1, L-635-1 y L-660-1); las células fueron expuestas en una plataforma a 15 *cm* de distancia, a diferentes densidades de energía, de acuerdo con un T_I de 30, 20, 15, 8, 4, 2, 1 y 0,5 *min* (Figura 22a). Las fuentes de iluminación presentaron homogeneidad en la salida del haz, a lo largo del diámetro de la cápsula de Petri (Figura 22b).

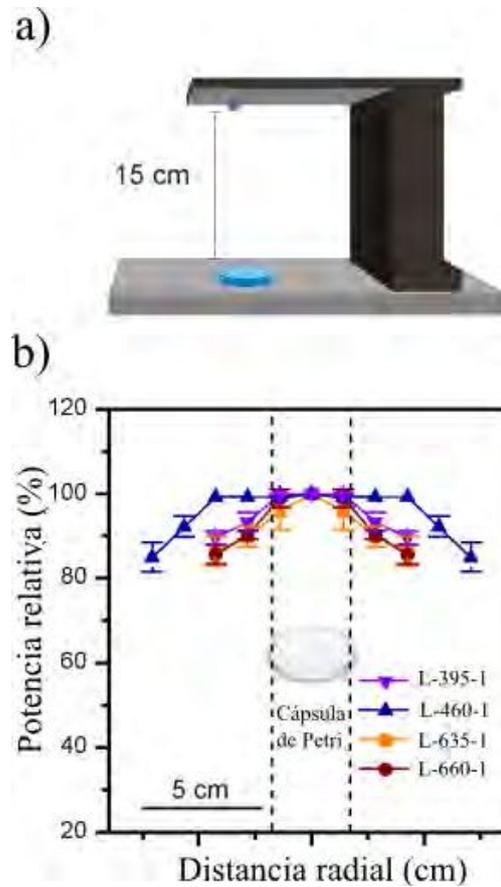


Figura 22. Iluminación en cápsulas de Petri con L-395-1, L-460-1, L-635-1 y L-660-1: a)esquema experimental; b)homogeneidad del haz de salida de los LEDs utilizados, expresada como potencia relativa como función de la distancia radial (*cm*).

2.3.2. Sistemas de iluminación *in vivo*

A la fuente L-637-1,06 se le acoplaron dos lupas de PMMA con radios de curvatura de 107,79 *mm* y 511,91 *mm* con el objetivo de modular el haz de luz para iluminar áreas más pequeñas y se colocaron a una distancia, desde el tumor en murino BALB/*c*, de 79 y 5,5 *cm*, respectivamente (Figura 23). Los radios de curvatura se determinaron con un esferómetro.

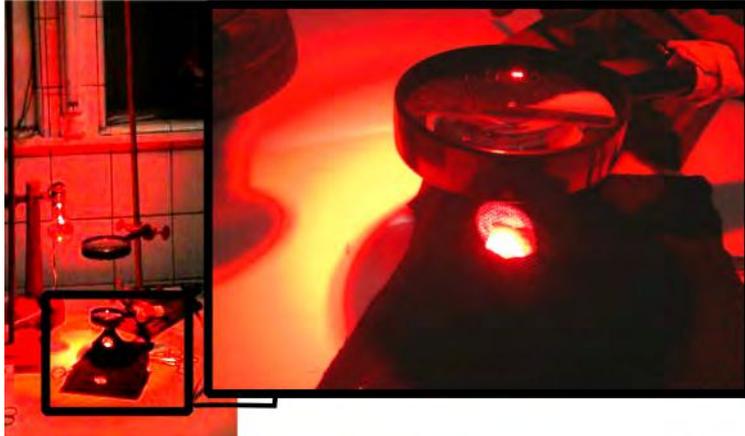


Figura 23. Fotografía del esquema de iluminación en murinos BALB/c colocando dos lentes convergentes para modular el haz de luz a la región tumoral.

En otra experiencia, con ratones BALB/n, el sistema de iluminación L-420-12, se colocó a 20 *cm* de distancia al tumor del ratón y se iluminó por un máximo de 35 *min*

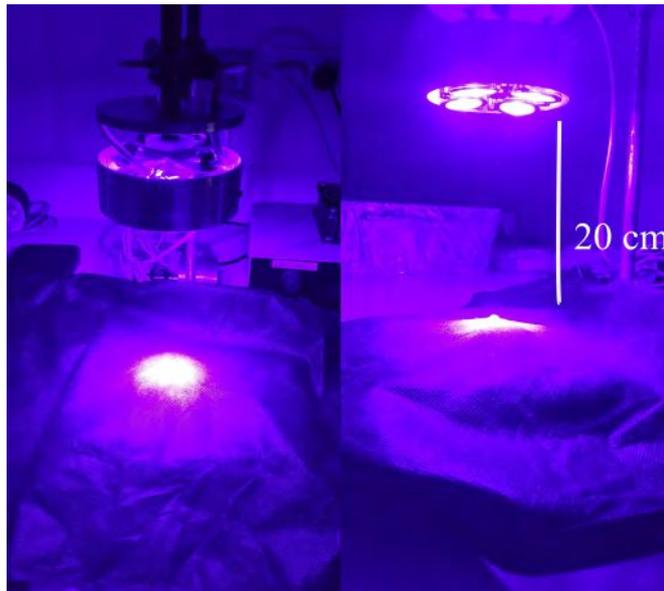


Figura 24. Fotografía del esquema de iluminación en murinos BALB/n.

2.3.3. Caracterización fotométrica de lámparas

Para las fuentes L-637-1,06 (sin las lupas), l-652-0,62 y l-652-1,1 se utilizó la esfera integradora de la figura 25a. En éste caso se colocó la fuente lumínica en el centro de la esfera y se registró la iluminancia, E , de la cual, a partir de la expresión 1.5, se obtuvo el flujo luminoso, ϕ . Con éste último y, utilizando

la expresión 1.2, es posible hacer la conversión entre unidad fotométrica y radiométrica. También, mediante un goniómetro fue posible caracterizar el haz de la salida de las fuentes luminosas en distintas direcciones (Figura 25b).

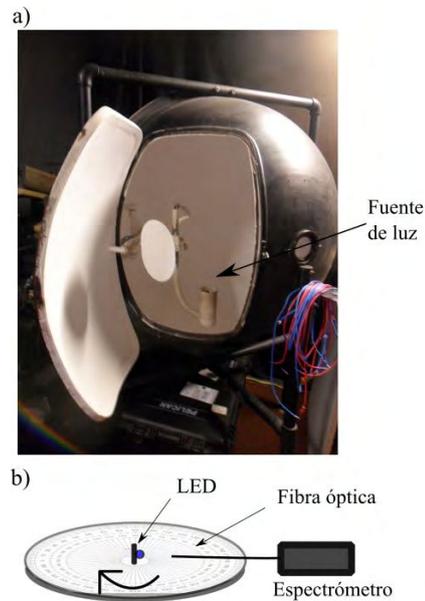


Figura 25. Instrumentos para la caracterización fotométrica: a) esfera integradora, en el centro del casquete esférico se posiciona la fuente de luz y se registra la iluminancia; b) esquema de goniómetro, la fuente de luz se coloca en el centro y se registra, para distintos ángulos, la intensidad de emisión mediante una fibra óptica alineada a la fuente de luz.

Otro método, para la determinación de E , fue utilizando un espectrómetro AvaSpec-ULS3648-USB2-UA-25 (Figura 26a) con rango de medición UV/VIS/NIR (200- 1100 nm) y software Avasoft-Full incluido (Figura 26b).



Figura 26. Espectrómetro AvaSpec-ULS3648-USB2-UA-25: a) entrada SMA 905, detector CCD de 3648 píxeles, rendija de 25 μm , recubrimiento para UV DUV3648, filtro para reducción de efecto de segundo orden OSC-UA, conexión USB2, incluido; b) el cable de la fibra óptica FC-UVIR200-2, 200 μm , longitud 2

m , rango UV/VIS/NIR (250- 2500 nm), conectores SMA 905. Se utilizó una lente difusora adaptada a la ley cosenos: difusor CC-VIS/NIR. Software Avasoft-Full.

Para llevar a cabo las experiencias se ubicó, en un extremo de un banco óptico, el espectrómetro y, en el otro, la fuente luminosa (Figura 27).

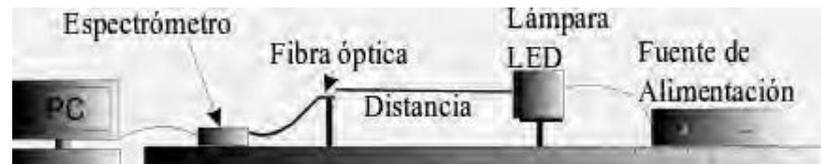


Figura 27. Esquema de arreglo experimental. En un extremo del banco óptico se posiciona la fuente LED y separado una distancia conocida la punta de la fibra óptica, la cual se encuentra conectada al espectrómetro. Éste último registra la iluminancia y permite también expresar las unidades análogas radiométricas.

2.4. Visualización por microscopía óptica y de fluorescencia

La observación de la evolución de los cultivos en el tiempo, se realizó a través de los microscopios ópticos (Figura 28a y 28d) y de fluorescencia (Figura 28b y 28c).

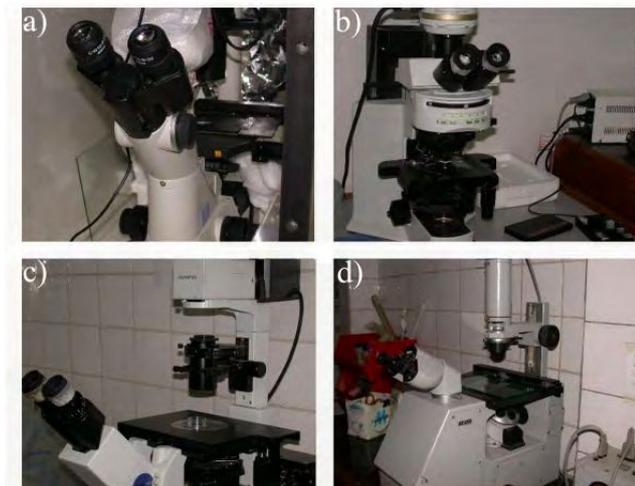


Figura 28. Microscopios utilizados: a)Nikon TS100 invertido de luz blanca; b)Olympus BX51 de fluorescencia no invertido; c)Olympus IX71 de fluorescencia invertido; d)Microscopio óptico Zeiss.

Para los experimentos con cúmulos, se eligieron los más parecidos (Figura 29) para la aplicación de la TFD; ya sea, para ensayar diferentes C_F o longitudes de onda de emisión de las fuentes de iluminación.

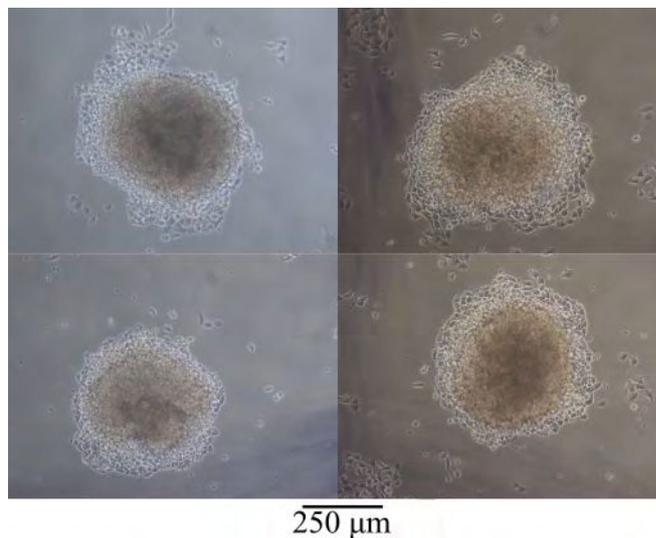


Figura 29. Imágenes de contraste de fase de típicos cúmulos de células HeLa obtenidos mediante el microscopio de la figura 28a en un campo de 20X.

2.5. Determinación del daño celular en experimentos en cultivos

2.5.1. Ensayo MTT

La fototoxicidad se evaluó empleando Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio de Life Technologies (MTT), compuesto perteneciente a la familia de sales de tetrazolio, soluble en agua y con color amarillo. Brevemente, después de 6 h y 24 h de iluminar las capsulas de Petri se reemplazó el medio de cultivo por uno nuevo que contenía solución de MTT 0,5 (*mg/ml* en medio de crecimiento RPMI). Las células se incubaron en presencia de la solución MTT durante 3 h a 37 °C. Posteriormente, el medio de cultivo se eliminó por completo, y los productos formados se solubilizaron agregando 1 ml de DMSO a cada cápsula. Esta solución se vertió en una placa de cultivo de 96 pocillos y la absorbancia se midió a 570 nm mediante un lector de placa (Genios Pro). Los resultados se expresaron como absorbancia relativa referida a un cultivo sin iluminación. Las mediciones se repitieron tres veces, y el valor medio y su error estándar se informaron para cada

condición. Este procedimiento se realizó en las secciones 2 y 4 del capítulo de resultados.

2.5.2. Ensayo TUNEL

La muerte de células por vía apoptóticas inducida 1*h* y 3*h* después de la aplicación de la iluminación de la TFD fue confirmada por el ensayo TUNEL (de las siglas en inglés, deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick-end-labeling) de acuerdo con el manual de instrucciones del fabricante.

En resumen, las células HeLa sembradas en cubreobjetos se fijaron durante 20 *min* en paraformaldehído a 4°C, se permeabilizaron durante 2 *min* con Triton X-100 (Sigma-Aldrich) y se incubaron durante 1 *h* con la mezcla de reacción TUNEL a 37°C. Después de lavar con PBS, se analizaron las preparaciones.

2.5.3. Naranja de Acridina e Ioduro de Propidio (NA/IP)

En algunos casos, después de la TFD en los esferoides de células HeLa, se tiñeron con NA (50 μ l de 0,01 % NA en PBS) e IP (30 μ l de 50 μ g/ml) y se analizaron con el microscopio de la figura 28b con filtro azul (excitación: 480/420 *nm*, emisión: 510 *nm*), teniendo en cuenta que la coloración verde es indicativo de viabilidad celular, mientras que el rojo muestra las muertes (Figura 30). Además, se utilizó IP combinado con Hoechst para distinguir apoptosis y necrosis mediante el empleo del microscopio de fluorescencia de la figura 28b y con filtros WIBA (Excitación:460/495 *nm*; Emisión: 510 *nm*) y DAPI (Excitación: 330/385 *nm*; Emisión: 420 *nm*), siguiendo el protocolo descrito en el apéndice 5.2.

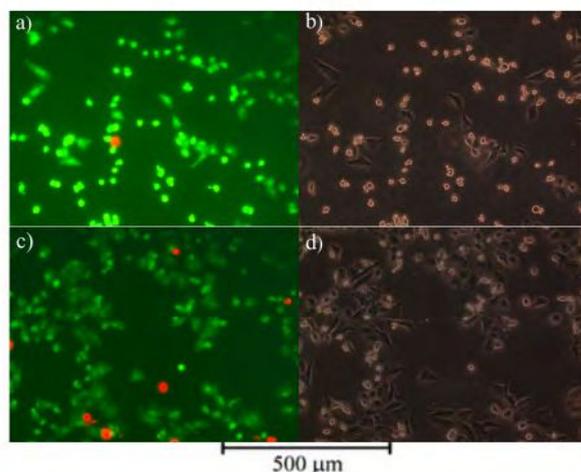


Figura 30. Tinción con NA/IP en monocapa de células HeLa. Se puede apreciar la distribución de células vivas/muertas en células tratadas con TFD L-395-1 y $C_F = 1 \mu g/ml$ en: a) y b) $T_I = 2 \text{ min}$; c) y d) $T_I = 4 \text{ min}$. Las imágenes se obtuvieron con el microscopio de la figura 28b en un campo de 20X, siendo a) y c) las imágenes de fluorescencia de las imágenes b) y d) con luz blanca, respectivamente.

2.6. Observaciones por Microscopía Láser Confocal de Barrido para determinar la distribución del daño espacial

Algunos esferoides de células, se analizan con un microscopio espectral láser confocal Leica TCS SP5 equipado con siete líneas de láser, AOTF (filtro sintonizador acústico-óptico), AOBS (divisor de haz óptico-acústico) y sistema de escaneo en tándem SP5. Para tal fin se procedió con la obtención de los cúmulos de células HeLa, según el esquema de la figura 10b. Una vez alcanzado un tamaño apropiado, se los seleccionó, individualmente, para luego colocarlos en cápsulas de Petri durante 24 h. Pasado ese tiempo, se procedió con la TFD, y una vez iluminados, se realizó una tinción con NA/IP para intentar analizar las distintas capas en el modelo *in vitro* 3D.

2.7. Dinámica de cultivos de células HeLa 2D y 3D

Los esferoides de células HeLa, se incubaron en medio de mantenimiento que contenía el Fs entre 3-24 h antes de la TFD. El seguimiento del patrón de crecimiento de la colonia comenzó después de 24 h de la adhesión del esferoide a la placa de Petri, justo antes de la iluminación. Se estudió la dinámica de la colonia 2D (células pegadas que crecen alrededor de una región central 3D), como la región 3D. Para este propósito, se grabaron imágenes secuenciales de patrones de colonias, utilizando una cámara digital Nikon DS-Fi1-U2 acoplada a un microscopio invertido de contraste de fase (la figura 28a), con un objetivo ADL 10X de campo plano CFI en una resolución de $0,88 \text{ mm}/\text{pxel}$. Los frentes de las colonias se rastrearon manualmente desde las imágenes de la pantalla de la computadora utilizando una tableta gráfica Wacom con una incertidumbre de error de rastreo en el orden del píxel. El seguimiento del crecimiento de las colonias se extendió durante 7 días, aproximadamente

2.8. Análisis de imágenes

Para la reconstrucción de imágenes de esferoides (Figura 31), luego de la visualización con microscopía confocal, se utilizó el programa ImageJ incluido con Java 1.8.0 disponible gratuitamente y en el dominio público.

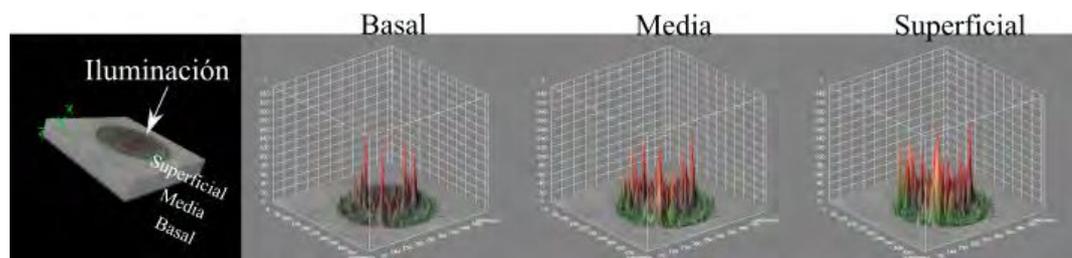


Figura 31. Ejemplo de imágenes logradas con el software ImageJ a partir de las slice que el microscopio confocal obtuvo de cúmulos de células HeLa tratados con TFD con $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ de m-THPC y $T_I = 8 \text{ min}$, los cuales fueron coloreadas con NA/IP. A la izquierda es una reconstrucción de 10 slice, mientras que los gráficos de la derecha muestran la proporción de la intensidad del color rojo (muerte) y verde (vivos) en una capa superficial (más cerca de la luz incidente), media y basal (más alejada de la luz incidente) del cúmulo.

Para el conteo en el ensayo TUNEL se utilizó el programa Image-Pro Plus 7. Éste es un software que permite clasificar y analizar imágenes 2D mediante una plataforma que ofrece herramientas intuitivas que facilitan capturar, procesar, medir, analizar y compartir sus imágenes y datos de interés. Los núcleos TUNEL-positivos se contaron en 8 campos microscópicos seleccionados al azar por muestra y el resultado se expresó como un porcentaje del total de núcleos contados. Se contaron al menos 1.500 núcleos en cada muestra. En las experiencias de dinámica de cultivos, diariamente, se registró una fotografía. En dicha imagen, se distingue una zona central (3D) y una zona periférica (2D) (Figura 32a); mediante un software desarrollado en el laboratorio, para colonias que se extienden radialmente, el programa determina el centro de masa (c.m.), la distancia instantánea desde el c.m. hasta un punto en el frente ($i = 1, 2, \dots, N$) y su arco correspondiente, y así, calcula el radio promedio. Se hicieron determinaciones tanto en la zona 2D como en la 3D a partir de la silueta de cada zona (Figura 32b).

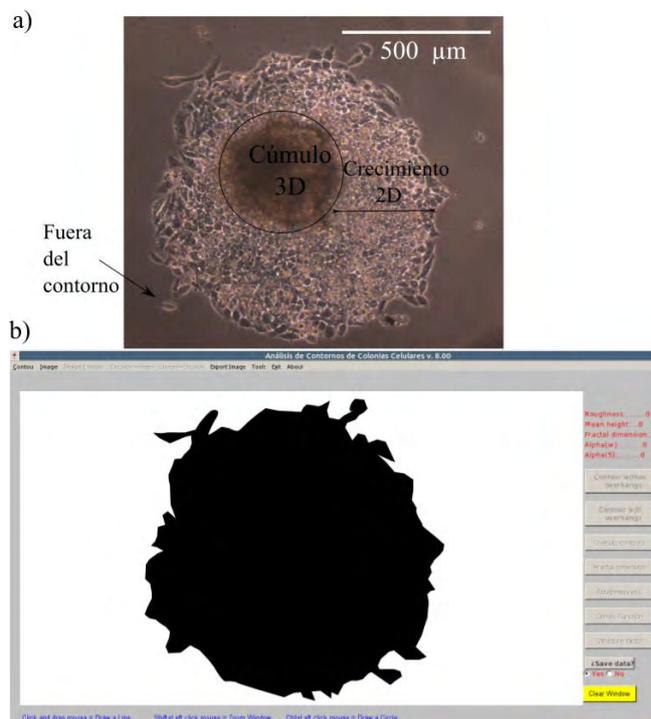


Figura 32. Seguimiento del crecimiento de colonias celulares en las regiones 2D y 3D: a) fotografía de un cúmulo visualizado a las 48 *h* luego de la iluminación de 16 *min* con L-395-1 ; b) digitalización del cúmulo visualizado en a).

2.9. Seguidimientos en murinos de la TFD

2.9.1. A través de mediciones por fluorescencia

Los espectros de fluorescencia en los ratones se obtuvieron, mediante una técnica de detección puntual, excitando a 395 *nm* usando un fluorómetro provisto de un fibra óptica modelo FD1 de doble paso de 0,20 *mm* de diámetro (Figura 33a), lo que permite realizar simultáneamente la excitación local y la medición de la respuesta de la zona evaluada en un rango de 500-800 *nm* (Apéndice 5.1).

Se determinó la señal de fluorescencia relacionada con la concentración del *Fs*, en diferentes regiones del tumor, a diferentes tiempos *in vivo* (Figura 34a) y *ex vivo* (Figura 33b).

Dichas medidas también incluyen la contribución de la piel, pero en promedio reflejan la evolución de m-THCP en el tumor. La emisión anteriormente expuesta con m-THPC se obtuvo en un máximo de 652 *nm* antes de la sustracción de la línea base debido a la autofluorescencia de cada muestra. El esquema experimental en la experiencia de tratamiento y seguimiento mediante fluorescencia, se muestra en la figura 33c.

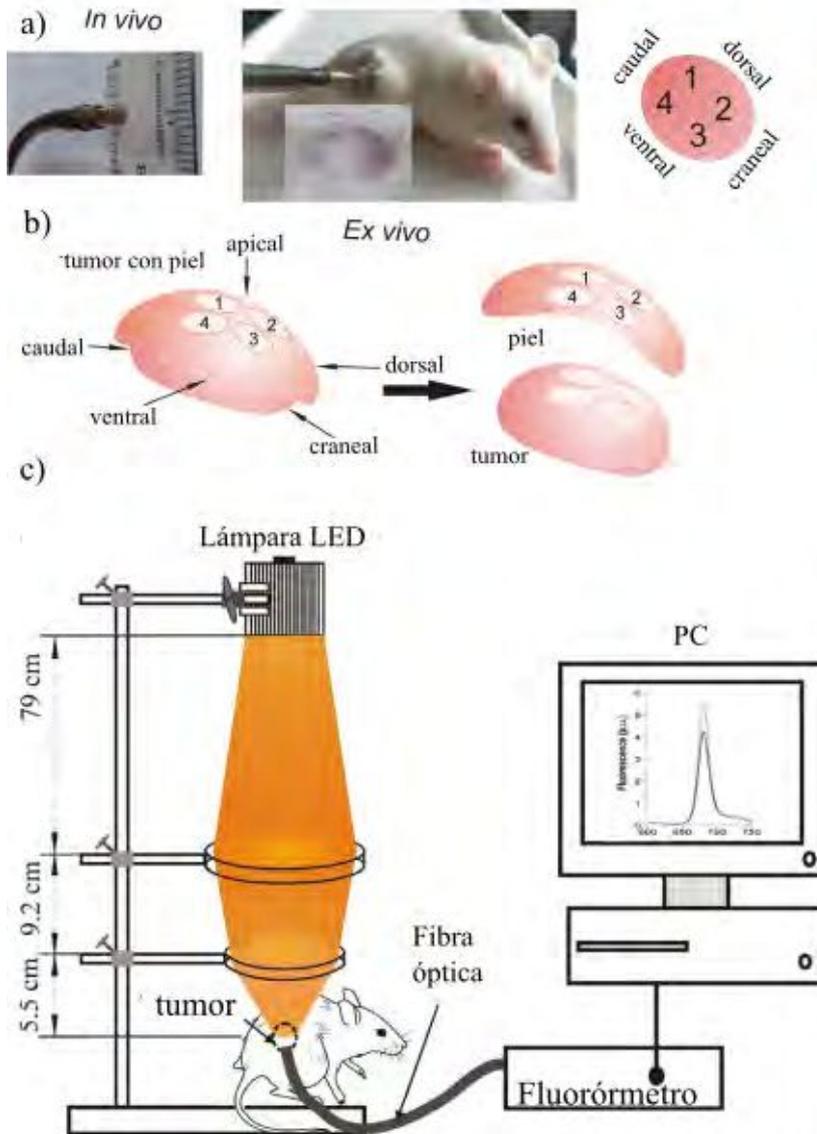


Figura 33. Esquema experimental de fluorescencia puntual *in vivo* en el tumor del ratón: a) imagen de la fibra óptica utilizada en las mediciones y su localización en el tumor. También se muestra una imagen tumoral típica. Esquema de los diferentes sitios tumorales donde la fluorescencia fue medida, esto es, zona apical (1, 2, 3 y 4) y zona lateral (craneal, dorsal, ventral y caudal); b) esquema del procedimiento seguido para realizar las mediciones de fluorescencia *ex vivo* en el tumor con piel, en la piel sola y en el tumor sin piel; c) esquema del arreglo experimental para las mediciones de fluorescencia y el tratamiento de TFD con L-637-1,06.

2.9.2. A través de la termografía infrarroja

La cámara para el registro de termografía infrarroja utilizada fue, en el caso de los BALB/c la de la figura 34a, mientras que, en BALB/n la de la figura 34b.

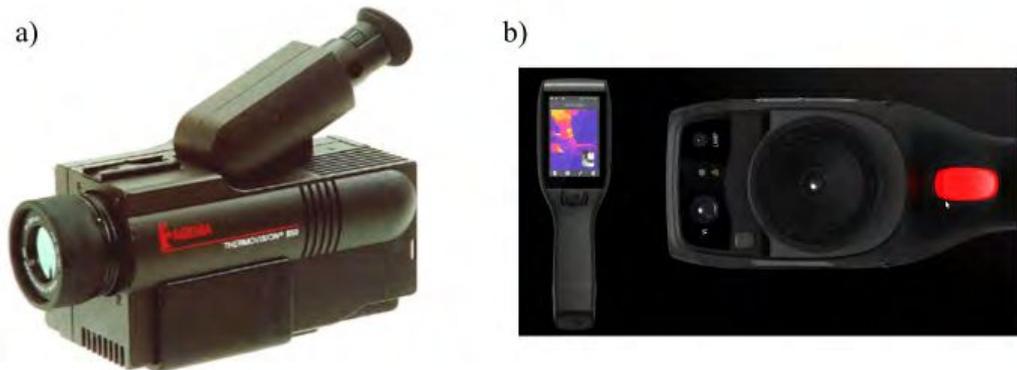


Figura 34. Cámaras infrarrojas: a)AGEMA 550 presenta un rango de -20°C a 1200°C , con una exactitud de $\pm 2^{\circ}\text{C}$, sensibilidad de $0,1^{\circ}\text{C}$, el tamaño del detector es de 320×240 píxeles y lente de Germanio; b)SDS INFRARED E8N N/S E8210040 presenta una sensibilidad de $8 \mu\text{m}$ a $14 \mu\text{m}$.

2.10. Evaluación de la masa tumoral de la TFD

Para evaluar la eficacia de la TFD, se realizó el seguimiento del tamaño de la masa tumoral, determinando diariamente el volumen ($d_1 \times d_2 \times a$), mediante la medición con un calibre (Figura 35).

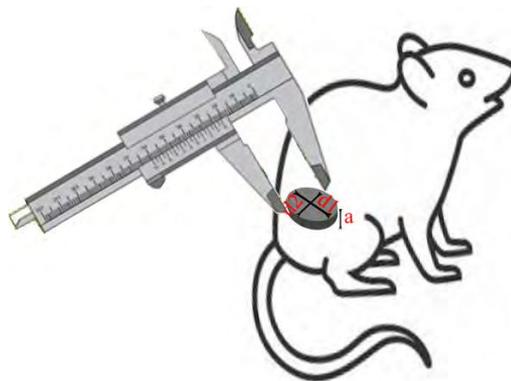


Figura 35. Seguimiento del tamaño tumoral.

Aproximadamente, 15 días luego de aplicada la TFD, el ratón se sacrificó y el tejido tumoral se fijó para ser evaluado mediante técnicas histológicas.

2.11. Transmisión de la luz en cúmulos de células HeLa y en piel de ratones BALB/c

Para medir la transmisión de la luz, se utilizaron los arreglos *ex vivo* e *in vitro* de la figura 36. En el primer caso, un vez sacrificado el ratón BALB/c, se midió la intensidad de la luz que pasa a través de la piel que cubre el tumor empleando un espectrómetro de fibra óptica y fuentes L-395-1 y L-660-1. Las muestras se colocaron en un portamuestras con ventanas planas de cuarzo (Figura 36a).

El segundo caso consiste en dos vidrios separados por un espesor conocido y en el medio de los mismos se colocó un cúmulo; con L-395-1 y L-660-1 colocadas a la misma distancia d se iluminó el sistema y la luz fue recolectada por una fibra óptica acoplada a un espectrómetro (Figura 36b).

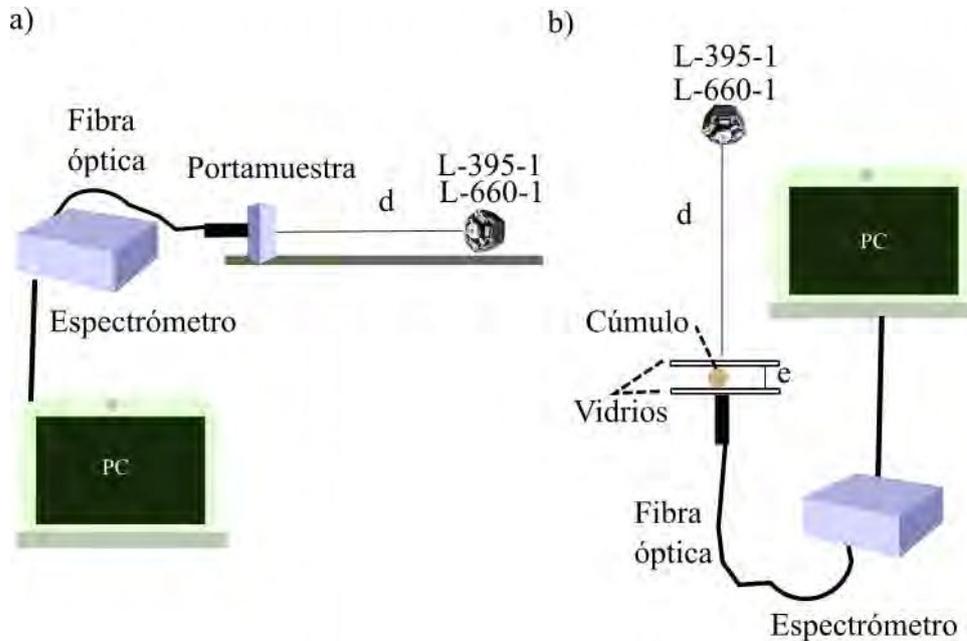


Figura 36. Esquema experimental de transmisión de luz: a) una porción de piel extraída del ratón sacrificado se coloca en portamuestras y, de un lado de la misma se ilumina y, del otro, se coloca la fibra óptica para registrar la señal; b) el cúmulo se coloca entre dos vidrios de espesor conocido e de una lado se coloca la fuente de luz y del otro lado, en forma alineada, la fibra óptica que registrará la señal.

Capítulo 3

Resultados

3.1. Caracterización de lámparas LEDs

3.1.1. Mediciones Fotométricas

Para caracterizar L-637-1,06, se obtuvo el flujo luminoso total partir del promedio de las lecturas obtenidas en la esfera integradora (Figura 25a) y, mediante la curva de sensibilidad espectral de la CIE, se calculó la potencia desconocida de la fuente siguiendo la ecuación 1.2. Los valores se los comparó con mediciones realizadas con el láser de uso médico (cuadro 3.1).

Fuente	$\lambda_n \pm \Delta\lambda$ (nm)	F (lm)
L-637-1,06	637 ± 9	130,42
l-652-0,62	$652 \pm 2,82$	53,6
l-652-1,1	$652 \pm 2,38$	83,11

Cuadro 3.1: Potencia calculada para las fuentes láser y no láser. La constante de la esfera integradora utilizada fue de $2,72 \text{ lm/lectura}$.

Por otra parte, tanto la longitud de onda nominal con el ancho espectral para las emisiones de las fuentes láser y no láser fueron realizadas. El ancho a media altura abreviada FWHM (del inglés, Full Width at Half Maximum) representó un buen parámetro para examinar el solapamiento entre la fuente de emisión y el espectro de absorción del *Fs* (Figura 37).

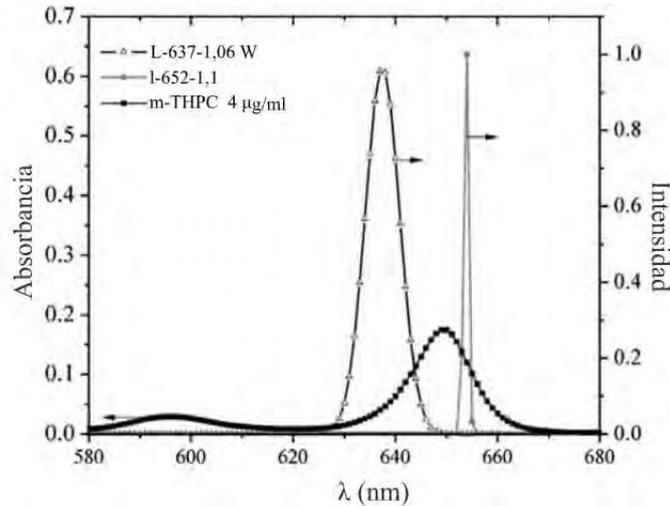


Figura 37. Solapamiento entre los espectros de emisión de las fuentes láser y LED y el espectro de absorción del *Fs* m-THPC.

Se corroboró la ley de inversa al cuadrado, para ello en los experimentos se ubicó la L-637-1,06 a diferentes distancias del cultivo celular para lograr

diferentes iluminancias (E) evaluadas por un luxímetro. Por ejemplo, a 1 m la lámpara LED entregó 709 lx , mientras que el l-652-0,62 y l-652-1,1 se ubicado a $0,5\text{ m}$ del detector y registró 557 y 860 lx , respectivamente. A su vez, las fluencias y la cantidad de luz por cm^2 (Ext) que alcanzaron los cultivos celulares se representan en la figura 38.

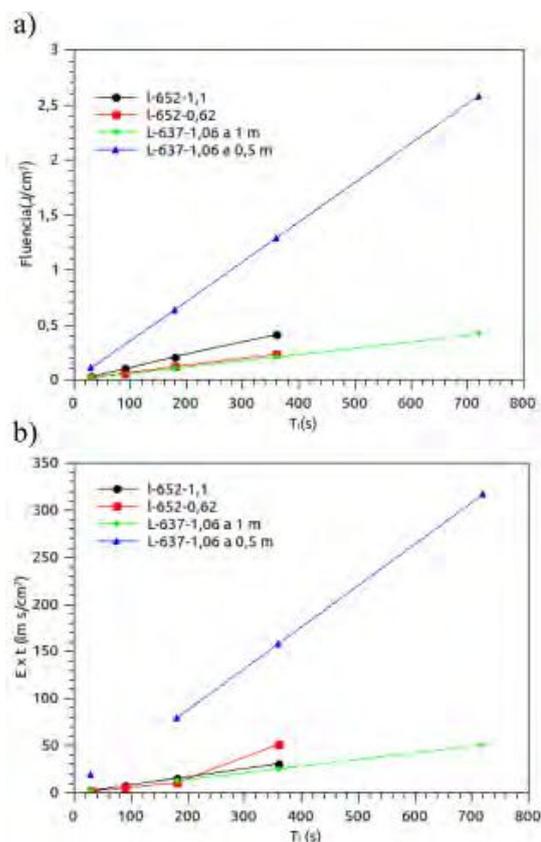


Figura 38. Cantidad de luz que llega a los cultivos por unidad de tiempo en: a) fluencia (J/cm^2) como función del tiempo; b) Ext (Iluminancia por tiempo, $\text{lm s}/\text{m}^2$) para l-652-0,62 y l-652-1,1; y para L-637-1,06 ubicada a 1 m y $0,5\text{ m}$ de distancia, respectivamente.

Las iluminancias obtenidas de la lámpara fueron significativamente mayores que las obtenidas de la fuente láser en la misma distancia. Pero este es solo un aspecto de la TFD, el otro, es el solapamiento entre el rango de longitud de onda donde el Fs absorbe la luz y la longitud de onda de emisión de la fuente. En el cuadro 3.2, se exponen los resultados de mediciones realizadas según el esquema de la figura 27 para L-635-4 orientadas de forma paralelas con y sin las lentes.

Distancia <i>cm</i>	Descripción	Iluminancia <i>lx</i>	Tasa de fluencia <i>mW/cm²</i>
30	1LED sin lente	1559,4	80,4
30	1LED con lente	67719	35,59
20	1LED sin lente	3507	179
20	1LED con lente	$1,75 \times 10^5$	91,87
15	1LED sin lente	6490	343
15	1LED con lente	$3,07 \times 10^5$	160

Cuadro 3.2: Efecto de la lente en el diseño de las fuentes para distintas distancias

En el siguiente cuadro 3.3 se presentan los resultados para L-395-12 y L-635-12 y comparadas para una misma distancia fuente-detector. En este caso la configuración para el rojo fueron los 4 LEDs inclinados, mientras que para la violeta fueron los 4 LEDs paralelos.

Descripción	Iluminancia (lx)	Tasa de fluencia <i>mW/cm²*</i>
L-635-12 sin lentes	20496	11,07
L-635-12 modo convergente	$1,035 \times 10^6$	550,7
L-395-12 sin lentes	3420,8	10,91
L-395-12 modo paralelo	6457,7	120

Cuadro 3.3: Comparación LEDs rojo vs. violeta. *La tasa de fluencia también se la llama irradiancia. Los modos paralelos y convergentes son con lentes colocadas.

3.1.2. Simulación en Zemax

Zemax OpticStudio 18.4.1. es un programa de diseño óptico de uso común para Microsoft Windows [236] que se utiliza para el diseño y análisis de sistemas de imagen e iluminación [237][238][239][240]. Los diseños terminados se pueden exportar a resultados listos para la fabricación, como dibujos ISO

y formatos de archivo CAD comunes.

Mediante una plataforma, que consiste en una planilla, es posible ingresar la información óptica del sistema y evaluar las diferentes magnitudes de interés. En las filas se ingresan los elementos (lentes, espejos, superficie detectora, etc) que conforman el sistema óptico; mientras que, en las columnas, se completa la información referida a la posición (x,y,z), la inclinación, el material, la potencia (W), número de rayos simulados, etc, de los elementos ópticos (Figura 39).

Object Type	Comment	Ref Object	Inside Of	X Position	Y Position	Z Position	Tilt About X	Tilt About Y	Tilt About Z
LED BODY	LED BODY	0	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
Standard Lens	DIE	1	1	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
Source Volume	LED EMITTER	1	1	0.000000	0.000000	0.000000	45.000000	0.000000	0.000000
Cylinder Vol...	ELECTRODE	1	0	0.000000	0.700000	-1.500000	0.000000	0.000000	0.000000
Torus Volume	ELECTRODE BEND	4	0	0.000000	-0.200000	3.000000	-90.000000	0.000000	-90.000000
Cylinder Vol...	CONTACT WIRE	4	1	0.000000	-0.200000	3.200000	50.000000	0.000000	0.000000
Cylinder Vol...	SECOND ELECTRODE	1	0	0.000000	-0.700000	-1.500000	0.000000	0.000000	180.000000
Torus Volume	ELECTRODE BEND	7	0	0.000000	-0.200000	3.000000	-90.000000	0.000000	-90.000000
Cylinder Vol...	CONTACT WIRE	7	1	0.000000	-0.200000	3.200000	50.000000	0.000000	0.000000
Mail Object		0	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
STL Object (...)	LENTEGRADOS STL	0	0	-1.000000	0.000000	10.000000	70.000000	130.000000	270.000000
Standard Lens	LED BODY	0	0	12.000000	12.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
Standard Lens	DIE	1	1	12.000000	12.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
Source Volume	LED EMITTER	1	1	12.000000	12.000000	0.000000	-45.000000	-45.000000	0.000000
Detector Surf		1	0	6.000000	6.000000	20.000000	0.000000	0.000000	0.000000
Cylinder Vol...	ELECTRODE	1	0	12.000000	12.700000	-1.500000	0.000000	0.000000	0.000000
Torus Volume	ELECTRODE BEND	4	0	12.000000	11.800000	3.000000	-90.000000	0.000000	-90.000000
Cylinder Vol...	CONTACT WIRE	4	1	12.000000	11.800000	3.200000	50.000000	0.000000	0.000000
Cylinder Vol...	SECOND ELECTRODE	1	0	12.000000	11.300000	-1.500000	0.000000	0.000000	180.000000
Torus Volume	ELECTRODE BEND	7	0	12.000000	11.800000	3.000000	-90.000000	0.000000	-90.000000
Cylinder Vol...	CONTACT WIRE	7	1	12.000000	11.800000	3.200000	50.000000	0.000000	0.000000
Mail Object		0	0	12.000000	12.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
STL Object (...)	LENTEGRADOS STL	0	0	7.000000	12.000000	10.000000	10.000000	50.000000	280.000000
Mail Object		0	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
Standard Lens	LED BODY	0	0	0.000000	12.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
Standard Lens	DIE	1	1	0.000000	12.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
Source Volume	LED EMITTER	1	1	0.000000	12.000000	0.000000	45.000000	-45.000000	0.000000
Cylinder Vol...	ELECTRODE	1	0	0.000000	12.700000	-1.500000	0.000000	0.000000	0.000000
Torus Volume	ELECTRODE BEND	4	0	0.000000	11.800000	3.000000	-90.000000	0.000000	-90.000000
Cylinder Vol...	CONTACT WIRE	4	1	0.000000	11.800000	3.200000	50.000000	0.000000	0.000000

Figura 39. Plataforma del Zemax: planilla para ingresar datos y definir el sistema óptico.

Partiendo de la idea, de que un LED individual típico se basa en un chip semiconductor sobre una superficie reflectante y, cuando la electricidad atraviesa el sistema, se produce luz cuya curva de emisión tiene la forma de un patrón de radiación isotrópico o Lambertiano [241]; se simularon las fuentes LED desarrolladas y se compararon con las mediciones del cuadro 3.3. Para tal fin, las variables que se consideraron fueron: números de rayos simulados (n), distancia entre la fuente y la superficie detectora (z), dimensión y número de píxeles de la superficie detectora, longitudes de onda de la fuente, potencia, condición Lambertiana; en este caso, debido a la difusión de la luz en el material del LED, parte puede ser dispersada. Esto se tiene en cuenta con la fracción indicada de la figura 40. Allí, se setean, la fracción de dispersión (por ejemplo 1) y el número de rayos (por ejemplo 12). La nomenclatura usada en esta tesis fue: fracción de dispersión / número de rayos (en el ejemplo 1/12).

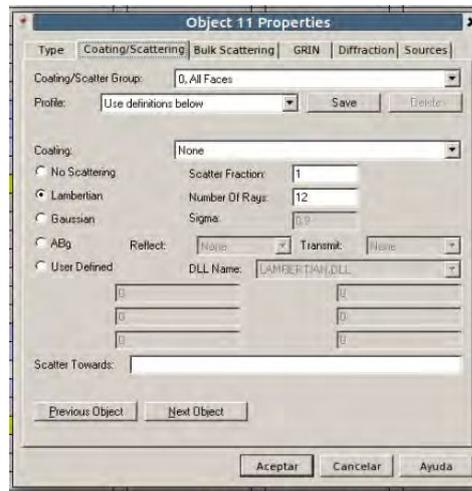


Figura 40. Condición Lambertiana.

El perfil de longitudes de onda para las fuentes de iluminación es una curva que con una λ_c máxima que luego decrece hacia los costados siguiendo una campana de Gauss. El programa (Figura 41) permite el ingreso de longitudes de onda discretas, por lo que se eligió una (λ_c) con ponderación 1 y dos longitudes de onda laterales simétricas con ponderación (en la planilla "weight") 0,9; esto es un perfil 0,9 : 1 : 0,9.

Wavelength Data					
Use	Wavelength (μm)	Weight	Use	Wavelength (μm)	Weight
<input checked="" type="checkbox"/> 1	0.39500000	0.9	<input type="checkbox"/> 13	0.55000000	1
<input checked="" type="checkbox"/> 2	0.40000000	1	<input type="checkbox"/> 14	0.55000000	1
<input checked="" type="checkbox"/> 3	0.40500000	0.9	<input type="checkbox"/> 15	0.55000000	1
<input type="checkbox"/> 4	0.55000000	1	<input type="checkbox"/> 16	0.55000000	1
<input type="checkbox"/> 5	0.55000000	1	<input type="checkbox"/> 17	0.55000000	1
<input type="checkbox"/> 6	0.55000000	1	<input type="checkbox"/> 18	0.55000000	1
<input type="checkbox"/> 7	0.55000000	1	<input type="checkbox"/> 19	0.55000000	1
<input type="checkbox"/> 8	0.55000000	1	<input type="checkbox"/> 20	0.55000000	1
<input type="checkbox"/> 9	0.55000000	1	<input type="checkbox"/> 21	0.55000000	1
<input type="checkbox"/> 10	0.55000000	1	<input type="checkbox"/> 22	0.55000000	1
<input type="checkbox"/> 11	0.55000000	1	<input type="checkbox"/> 23	0.55000000	1
<input type="checkbox"/> 12	0.55000000	1	<input type="checkbox"/> 24	0.55000000	1

Select -> F, d, C (Visible) Primary: 1

Buttons: OK, Cancel, Sort, Help, Save, Load

Figura 41. Planilla longitud de onda.

Se pueden evaluar, en la superficie detectora, magnitudes radiométricas como la irradiancia (W/cm^2), potencia radiante (W), intensidad radiante (W/sr) (Figura 42). Aquí comparamos la irradiancia obtenida de las simulaciones con la que proviene de los experimentos para las lámparas L-635-12 y L-395-12.

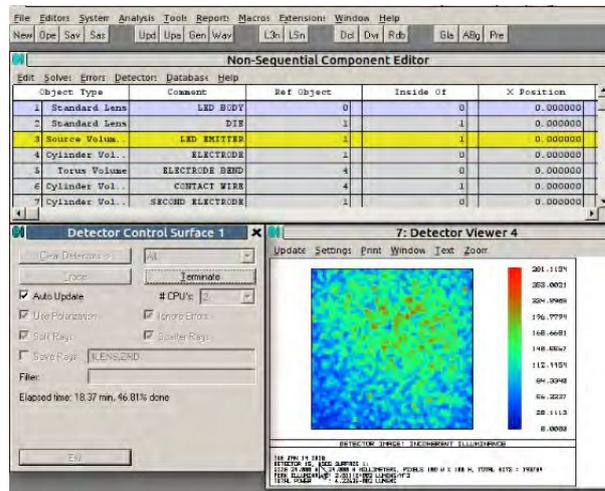


Figura 42. Visor de la superficie detectora. A través del seteo del trazado de rayos, se visualiza en la superficie detectora las magnitudes de interés. Cuando el número de rayos simulados es muy elevado (a partir de 50000), los tiempos computacionales se vuelven muy extensos.

El primer paso para realizar la simulación es construir la fuente emisora basada en un LED y la lente correspondiente. Se diseñó una lente de 8° mediante la utilización del programa Blender 2.76. En este, a través del trazado del perfil de las dimensiones de la lente y mediante una herramienta llamada spin, se creó un modelo en sólido de revolución, que luego se exportó en un archivo tipo CAD al Zemax OpticStudio 18.4.1. El proceso se puede ver en la figura 43.

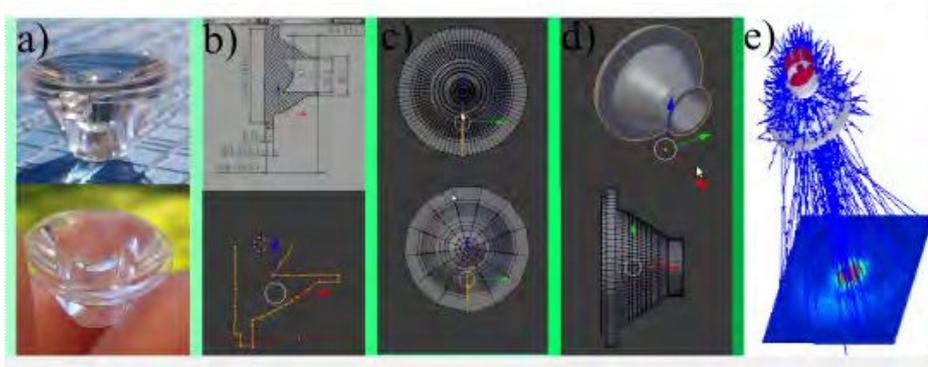


Figura 43. Diseño de lentes convergentes de 8° : a) fotografía de la lente de 8° ; b) trazado del perfil utilizando el programa Blender 2.76; c) utilización de la herramienta spin para obtener el sólido de revolución del perfil trazado en b); d) lente simulada en el Blender 2.76 diseño que se exportó al Zemax; e) sistema lente-LED en Zemax, análisis de las imágenes en una superficie detectora ubicada a 20 cm.

Una vez diseñadas las lentes de 8° se le especifica el material, en este caso PMMA, para conocer el comportamiento del mismo con la longitud de onda (Figura 44).

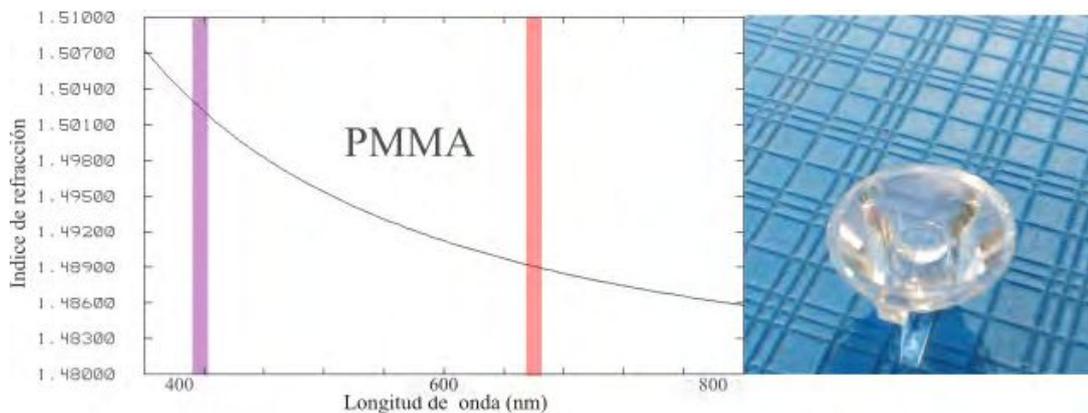


Figura 44. Índice de refracción como función de la longitud de onda para la lente de 8° de las fuentes desarrolladas.

En la figura 45, se muestra una imagen real (Figura 45a) del área de iluminación que la fuente real genera para una determinada distancia, en este caso 20 cm , y se la compara con la simulada para las mismas condiciones y con la lente diseñada previamente (Figura 45b). También puede verse la simulación de la lámpara con lentes (Figura 45c) y las intensidades radiantes simulada (Figura 45d). De manera análoga, se simuló para el caso de L-395-12 sin lentes (Figura 45 e-f). En este caso, se logró reproducir el patrón de iluminación experimental en forma cualitativa.

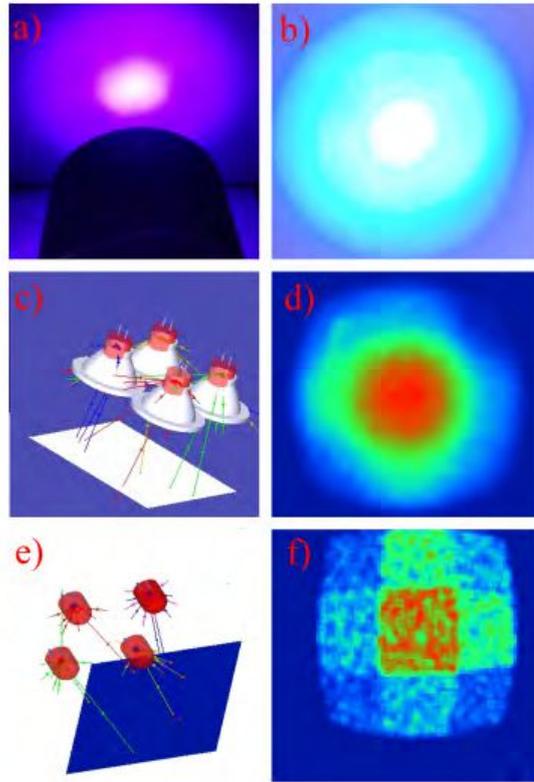


Figura 45. Comparación lámpara real con las lente-LEDs simulados: a) fotografía de L-395-12; b) fotografía del área iluminada por L-395-12 a 20 *cm* de distancia entre la fuente y el detector; c) cuatro LEDs con lentes de 8 ° ubicada a 20 *cm*; d) intensidad radiante en la superficie detectora de 100 X 100 píxeles en 24 *cm* X 24 *cm* generada por c); e) cuatro LEDs sin lentes ubicada a 20 *cm*; f) intensidad radiante en la superficie detectora de 100 X 100 píxeles en 24 *cm* X 24 *cm* generada por e).

Se ensayaron múltiples variaciones de las variables, para aproximar el resultado de la simulación con las determinaciones físicas. Por ejemplo, en la figura 46, se representa la intensidad radiante para distintas condiciones ensayadas y, puede apreciarse que, la figura 46c, se parece más a la imagen real de la luz emitida por la fuente LED sobre un superficie, esto es, para $n = 50000$ y condición Lambertina 1/10.

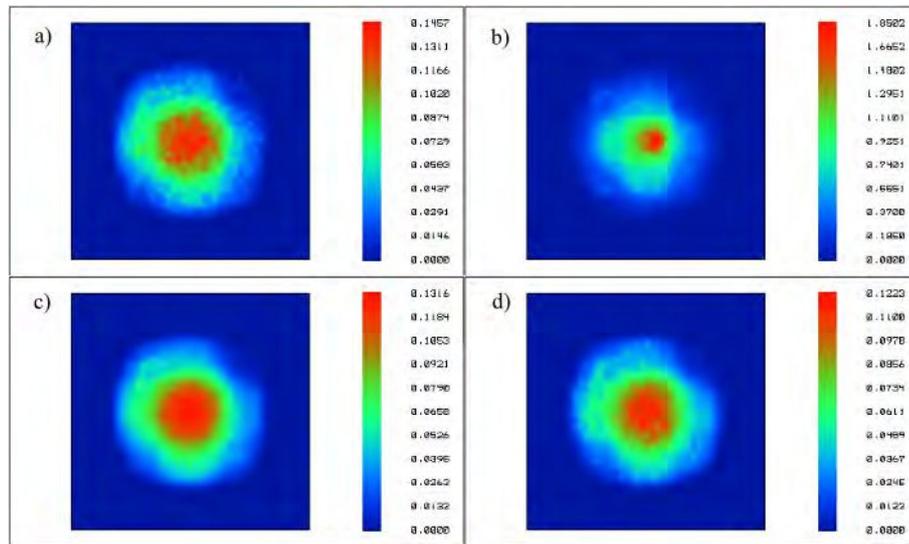


Figura 46. Intensidad radiante para distintas condiciones: a) L-395-12 con ponderación 0,9 :1 : 0,9 , $n = 10000$, $z = 20$ cm, área detector 12 cm X 12 cm, 100x100 píxeles, condición Lambertina 1/10; b) L-395-12 con ponderación 0,9: 1: 0,9 , $n = 50000$, condición Lambertina 0,55/1, $z = 20$ cm, detector de 12 cm X 12 cm, 100 X 100 píxeles; c) $n = 50000$, L-635-12 con ponderación 0,9 :1 : 0,9 , condición Lambertina 1/10, detector de 12 cm X 12 cm, 100 X 100 píxeles, $z = 20$ cm; d) $n = 20000$, L-395-12 modo convergente, condición Lambertina 1/10, detector de 12 cm X 12 cm, $z = 20$ cm, 100 X 100 píxeles.

En la figura 47, se representa la irradiancia para distintos números de rayos simulados para L-395-12 y L-635-12 en la condición Lambertiana de 1/10 en una arreglo experimental a 20 cm de distancia entre la fuente y la superficie de detección.

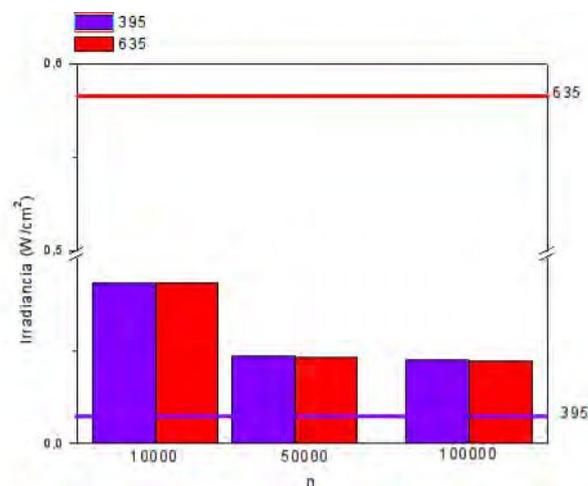


Figura 47. Irradiancia para distintos n : se compararon dos fuentes simuladas (barras verticales) con la medición física real (líneas horizontales).

En la condición Lambertiana 1/10 no había aproximación entre los valores de irradiancia medidos y simulados, pero al cambiarla a 1/12 para L-395-12 se ve un solapamiento de medidas (Figura 48).

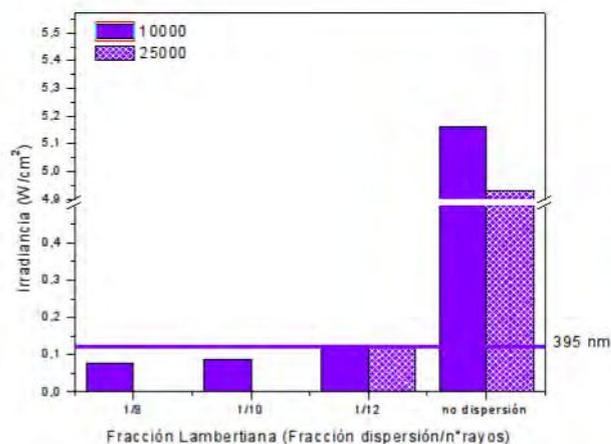


Figura 48. Irradiancia para distintas fracciones Lambertianas: se comparó L-395-12 (barras verticales) con la medición física real (línea horizontal).

Una vez obtenida una concordancia apropiada entre la simulación y los datos experimentales (se muestra el caso de la lámpara L-395-12), también se obtuvieron valores de irradiancia a distintas distancias para verificar la ley de inversa al cuadrado para L-395-12 y se comparó con los datos de irradiancia del cuadro 3.2 para la fuente L-635-4 con un sólo LED encendido con y sin la lente (Figura 49). En esta imagen se observa una linealidad con la distancia. Los valores de irradiancia mayores, para el caso de un sólo LED, se debe a que, al tener un área de detección menor, la irradiancia es mayor.

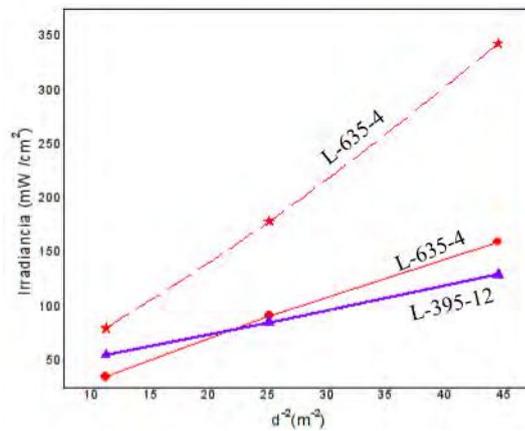


Figura 49. Comparación entre valores simulados (L-395-12) y medidos (L-635-4 , corresponde a un LED con lente-punto rojo- y sin lente-estrella roja-) de irradiancia en función de $1/d^2$.

Sondas endoscópicas para iluminación

Siguiendo la metodología anterior, se realizó el diseño de una acople en material BK7, para empalmar una fibra óptica a un LED de alta potencia (Figura 50), que si bien no se usará en el resto de la tesis, es un ejemplo útil para el diseño de la aparatología necesaria para la aplicación de la TFD.

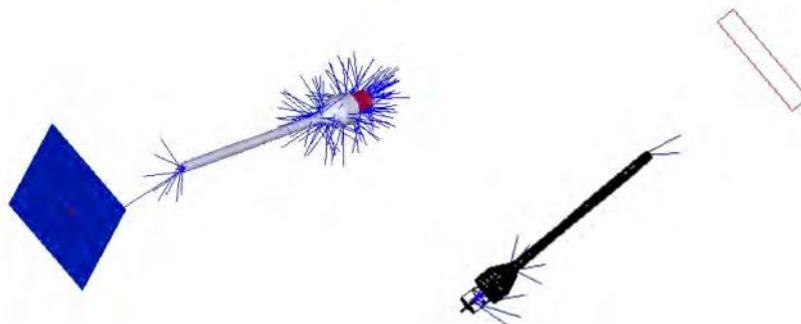


Figura 50. Simulaciones del modificador de haz de salida fabricado para el acople entre la fibra óptica y LED y de esta manera alcanzar cavidades naturales de cuerpo.

En los cuadros 3.4 y 3.5 se compararon dos longitudes de onda para distintos números de rayos simulados.

Rayos	Magnitud	Unidades	$\lambda_C = 395nm$	$\lambda_C = 635nm$
25000	Irradiancia	W/cm^2	0,00011	0,000089
25000	Potencia total	mW	0,036	0,018
25000	Intensidad radiante	W/sr^1	0,54	0,274
50000	Irradiancia	W/cm^2	0,000113	0,000149
50000	Potencia total	mW	0,0537	0,072
50000	Intensidad radiante	mW/sr	0,798	1,09

Cuadro 3.4: Tabla comparativa para la condición Lambertiana 1/12 para L-395-12 y L-635-12; distancia fuente detector $z = 34,7 cm$; tamaño de detector $40 mm \times 40 mm$; 100×100 píxeles.

Magnitud	Unidades	395	635
Irradiancia	W/cm^2	0,00031	0,000184
Potencia total	mW	0,017	0,00854
Intensidad radiante	mW/sr	0,502	0,265

Cuadro 3.5: Tabla comparativa para la condición Lambertiana 1/12; para L-395-12 y L-635-12; distancia fuente detector z de $4,7 cm$; tamaño de detector $40 mm \times 40 mm$; $n = 50000$.

En este caso, se compararon dos longitudes de onda y se observó la irradiancia en un detector ubicado a $20 cm$ de distancia (Figura 51).

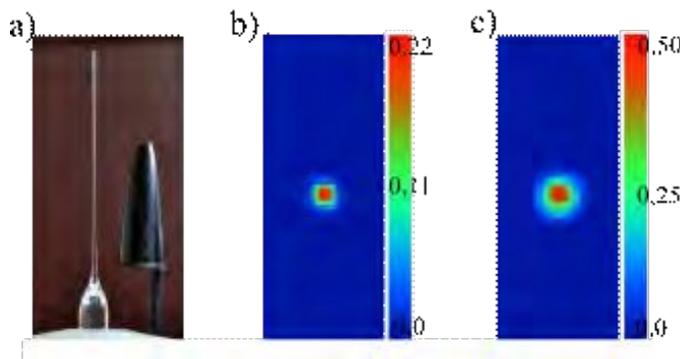


Figura 51. Simulaciones del modulador de haz de salida fabricado para el acople entre la fibra óptica y LED y de esta manera alcanzar cavidades naturales del cuerpo.

En una primera parte, se modificaron los parámetros de: condición Lambertiana de la lente, número de rayos simulados, ponderación de las componentes del perfil de longitud de onda, área de detección y número de píxeles; para que en las condiciones de medición (distancia fuente-detector) se obtengan valores comparables a los resultados del cuadro 3.3 de la subsección anterior 3.1.1. De aquí, se obtuvo la condición de lente Lambertiana como modo primordial de dispersión de rayos para una lente.

El programa resultó alentador en el diseño de fuentes de iluminación y se pudo corroborar algunas de las mediciones físicas ensayas con las simuladas.

3.2. Comparación entre las fuentes láser y LED *in vitro*

Comenzamos probando que el *Fs* no se dirige al núcleo, por lo que es de esperar que no modifique la carga nuclear de las células en la que se incorpora. Podrá ser metabolizado y sin intervención de los otros componentes de la TFD no presentará toxicidad para concentraciones manejables en aplicaciones clínicas.

3.2.1. Localización intracelular del *Fs*

Se incubaron cultivos de células HeLa en un ambiente oscuro durante 90 *min* con 20 $\mu\text{g/ml}$ de m-THPC en medio de mantenimiento. Posteriormente el cultivo se fijó, empleando una solución de una parte de acético glacial y una parte de etanol. Para identificar mejor la localización de los núcleos se utilizó una tinción con Hoechst y se observó la fluorescencia del m-THPC alrededor del núcleo (Figura 52) al igual que lo expuesto por otros autores. [242][243].

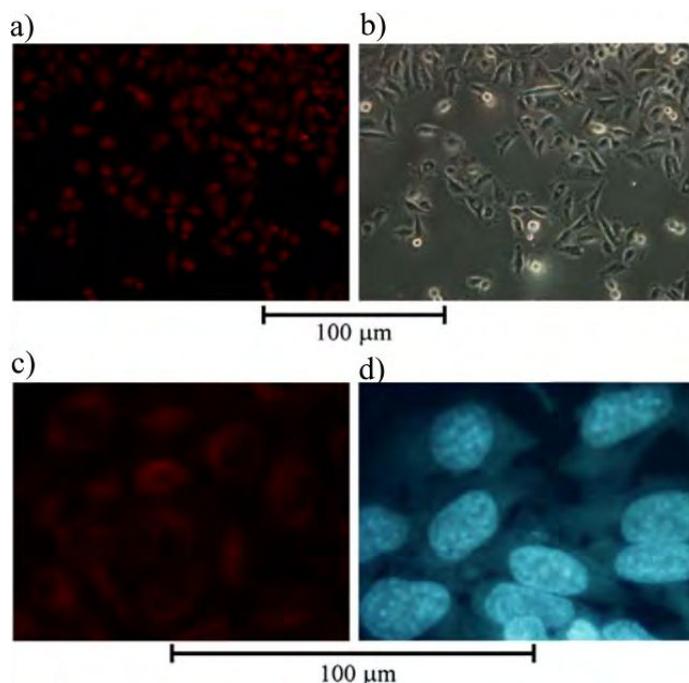


Figura 52. Imágenes de células HeLa conteniendo m-THPC a)microscopía de fluorescencia; b)microscopía de contraste de fase; c)magnificación mayor de (a); d)fluorescencia de núcleos teñidos con Hoescht. El *Fs* está localizado alrededor de núcleos. Esos sitios corresponden al retículo endoplasmático y el aparato de Golgi.

3.2.2. Rango de toxicidad del m-THPC en células de cultivo con y sin iluminación

Se cultivaron 50000 células/ cm^3 variando la concentración del Fs en el rango de $10 \mu g/ml \leq C_F \leq 80 \mu g/ml$ manteniendo constante el tiempo de absorción ($T_A = 3 h 15 min$). Cuando las células fueron iluminadas con L-637-1,06 y tasa de fluencia de $8,65 \times 10^{-4} W/cm^2$, las lesiones celulares aparecieron durante el tratamiento y el área de adherencia sobre el sustrato disminuyó previo a la muerte. Para $C_F > 40 \mu g/ml$ y $T_A > 24 h$ la droga presentó una toxicidad natural inclusive en ausencia de iluminación (no mostrado aquí).

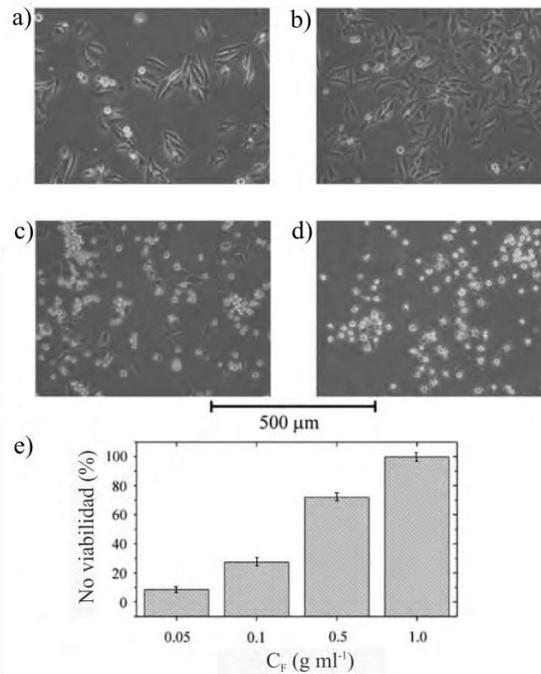


Figura 53. Microimágenes de cultivos de células HeLa luego de la TFD empleando la lámpara L-637-1,06 a 1 m de distancia: a) $C_F = 0 \mu g/ml$; b) $C_F = 0,05 \mu g/ml$; c) $C_F = 0,5 \mu g/ml$; d) $C_F = 1 \mu g/ml$. Las células que aún están vivas presentan áreas adheridas a la base, mayores que en el caso de las células muertas; e) ensayo de viabilidad MTT fue realizado para cada condición de tratamiento. Los datos control corresponden a cultivos sin m-THPC e iluminación. También se incluye el error estándar. Las imágenes de visualizaron 18 h postiluminación.

Además, se sembraron 2×10^6 células HeLa y se incubaron durante 24 h en medio de mantenimiento conteniendo 1, 0,5 y $0,05 \mu g/ml$ de m-THCP y, subsecuentemente, se iluminaron con L-637-1,06 durante $T_I = 20 min$ con una tasa de fluencia de $1,63 \times 10^{-3} W/cm^2$ (Figura 53). Se tomaron imágenes

microscópicas de los cultivos 18 *h* después de la iluminación y se realizó la prueba de viabilidad MTT para cada condición de tratamiento para cuantificar el efecto fotodinámico (Figura 53e). Se observó que para una mayor C_F la proporción de células muertas se incrementó mientras que para el cultivo de células de C_F más bajo continuó creciendo de manera similar al del control.

3.2.3. Efecto del tiempo absorción del F_s

Las células HeLa fueron incubadas con $0,1 \mu\text{g}/\text{ml}$ de m-THPC en la oscuridad para dos tiempos de absorción ($T_A = 24 \text{ h}$ y $T_A = 48 \text{ h}$). Ambos cultivos se iluminaron con L-637-1,06 para $T_I = 20 \text{ min}$ a 1 m de distancia entre la fuente de luz y las cápsulas de Petri empleando la disposición experimental de la figura 13b)(Figura 54). Para la misma concentración de F_s y el mismo tiempo de iluminación, cuanto mayor es T_A , menor es la proporción de células vivas.

Además se realizaron experimentos incubando las células HeLa con $0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ de m-THPC para $T_A = 24 \text{ h}$ y $T_A = 48 \text{ h}$ se iluminaron con una lámpara LED durante 20 min y se las visualizó después de 6 h del tratamiento de TFD. También se observaron las mismas tendencias descritas anteriormente para $C_F = 0,1 \mu\text{g}/\text{ml}$.

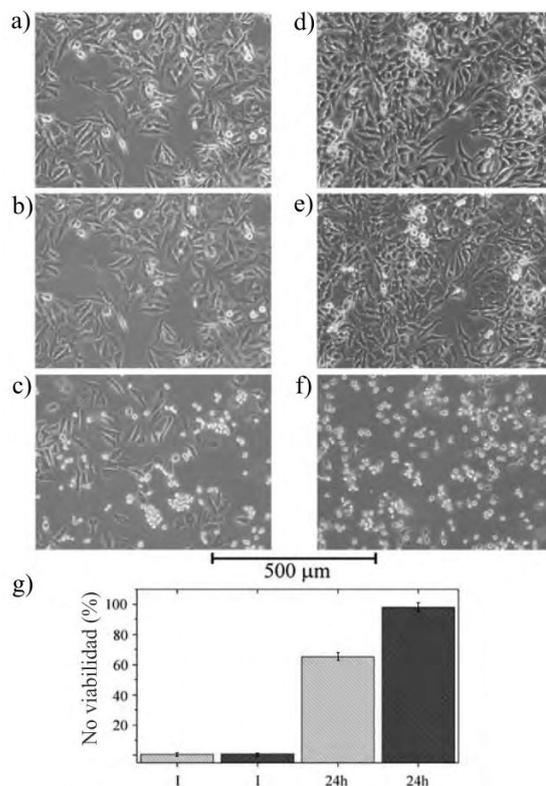


Figura 54. Imágenes de cultivos de células HeLa luego de la TFD para $T_A = 24 h$ (a, b y c) $T_A = 48 h$ (d, e y f); (a y d) antes de la iluminación, (b y e) inmediatamente después de la iluminación, y (c y f) 24 h después de la iluminación. La lámpara LED fue ubicada a 1 m de los cultivos celulares; g) ensayo de viabilidad celular MTT fue realizado para cada condición mencionada previamente: para $T_A = 24 h$ (gris claro) y $T_A = 48 h$ (gris oscuro). El ensayo de viabilidad se realizó inmediatamente después del T_I y 24 h luego del tratamiento. Se incluye el error estándar.

3.2.4. Variación en el tiempo de iluminación en células

Los cultivos celulares se incubaron durante 24 h con $0,25 \mu g/ml$ de m-THPC, y se realizó el tratamiento con TFD. Se emplearon diferentes T_I evaluando 12 h postratamiento el efecto mediante microimágenes y con ensayo MTT. Cuanto mayor es el T_I , menor es la proporción de células adheridas a la superficie de las cápsulas de Petri. Mediante la observación de monocapas se realizó el respectivo recuento celular y con las tinciones se visualizó principalmente muerte por necrosis. Con el objetivo de comparar la eficiencia del tratamiento en las cápsulas se realizaron experimentos en los que se modificaron el T_I utilizando L-637-1,06, la fluencia de luz y evaluando la viabilidad celular mediante el ensayo MTT (Figura 55).

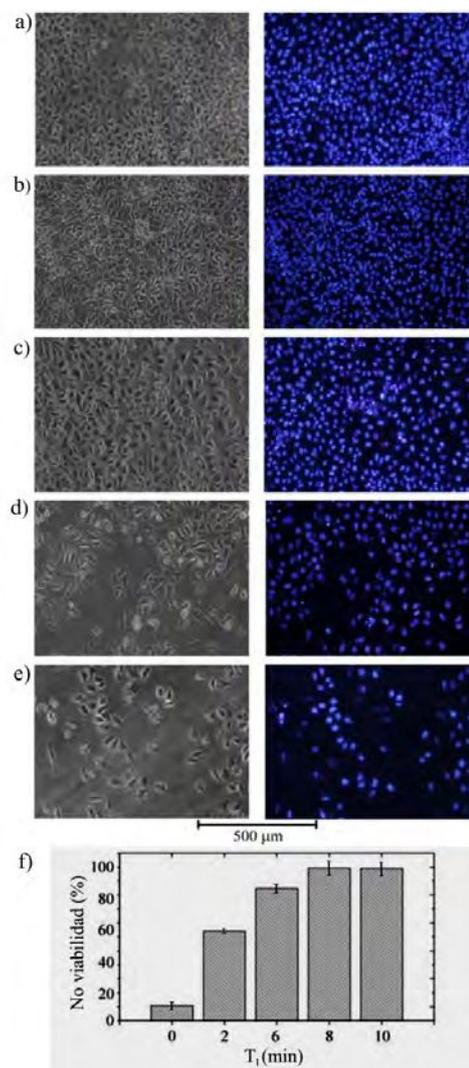


Figura 55. Imágenes por contraste de fase (izquierda) y teñidas con IP y Hoechst (derecha) de cultivos celulares HeLa luego de la TFD con L-637-1,06 a 1 m en: a) $T_I = 0 \text{ min}$; b) $T_I = 2 \text{ min}$; c) $T_I = 6 \text{ min}$; d) $T_I = 8 \text{ min}$; e) $T_I = 12 \text{ min}$; f) ensayo MTT fue realizado para cada condición mencionado arriba. Se incluye el error estándar.

La iluminancia mostró una ley recíproca con el cuadrado de la distancia al detector. A 0,5 m, el área del círculo de la lámpara fue 3 veces mayor respecto que el círculo a 0,5 m para el láser, pero este hecho se compensó aumentando el T_I . Aunque la longitud de onda nominal de la fuente LED era más pequeña ($\lambda = 637 \text{ nm}$) que la del pico de absorción del *Fs* ($\lambda = 652 \text{ nm}$) la emisión de excitación presenta una FWHM suficiente para lograr un solapamiento eficiente para la generación de especies reactivas de oxígeno (Figura 56).

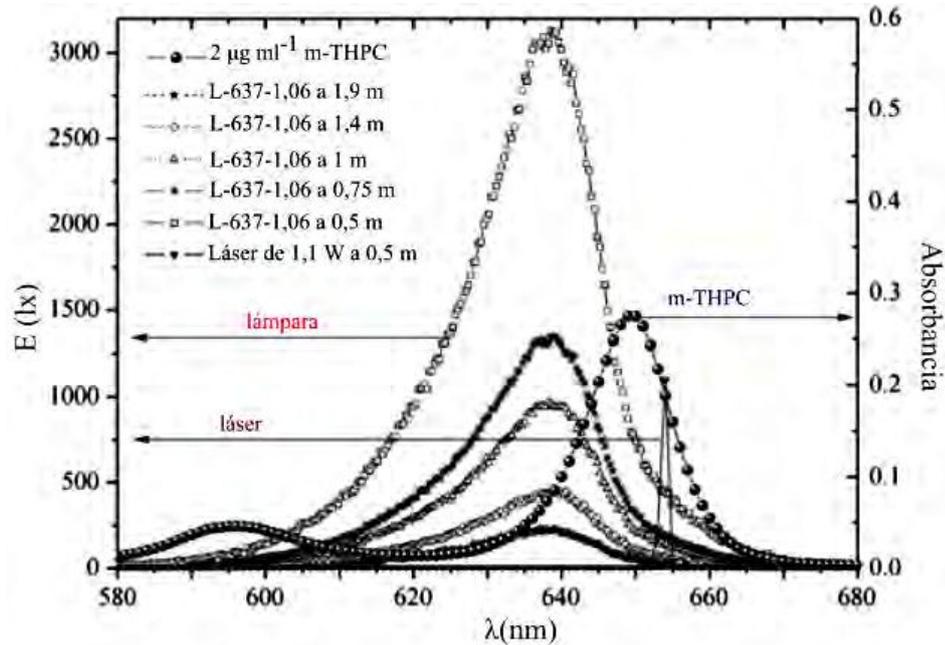


Figura 56. Mediciones de flujo luminoso para las fuentes LED y láser. Las diferentes distancias entre la lámpara LED y el detector se indican en la figura. También se incluye el espectro de absorción del *Fs* en el rango de 580 nm a 680 nm.

Ambas fuentes de iluminación a 0,5 m exhibieron una eficiencia de tratamiento similar. La viabilidad celular después de $T_I = 0,5 \text{ min}$ fue casi nula. Por otra parte, la L-637-1,06 a 1 m mostró el mismo resultado para $T_I = 4 \text{ min}$ (Figura 57).

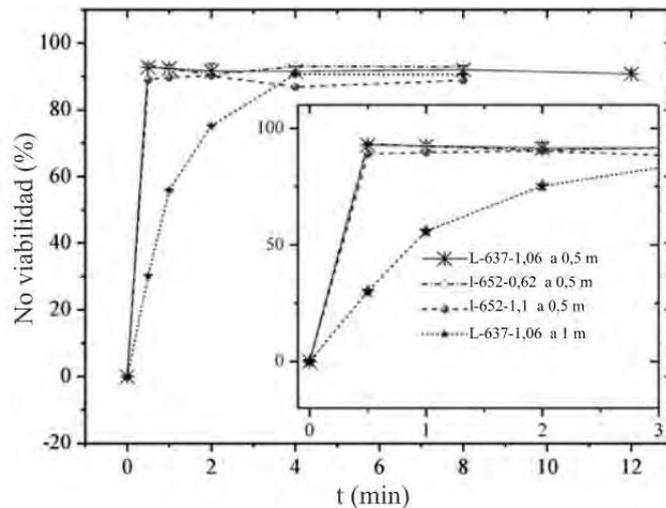


Figura 57. Resultados para el ensayo de MTT con $C_F = 0,25 \mu g/ml$ y variando T_I . Los cultivos de células HeLa fueron iluminados con una lámpara LED de 1,06 W a 0,5 m y 1 m de distancia y para la fuente láser (1,1 W o 0,62 W) a 0,5 m de distancia. Para cada T_I al menos 3 experimentos fueron promediados y se incluye el error estándar.

Además, se obtuvieron espectros para dos concentraciones ($2 \mu g/ml$ y $4 \mu g/ml$) de m-THPC diluidas en metanol en una cubeta y a través de las cuales se registró la intensidad de la fuente LED transmitida, siguiendo la Ley de Lambert-Beer. Esta intensidad fue menor para una concentración mayor de droga fotoactivable. En este apartado, se remarca la importancia de la posibilidad de usar LEDs para la TFD. Ya que su emisión es absorbida por el Fs , emite fluencias adecuadas para generar la reacción tóxica en las células, los T_I son breves y son fácilmente manipulables.

3.3. TFD en modelo murino. Seguimiento de tratamiento y mejora del protocolo de aplicación

En este apartado, se presentan estudios relacionados con el seguimiento del tratamiento y la utilización de herramientas que mejoran la aplicación de protocolos de la TFD. Para ello, se trabajó con animales de experimentación, cumpliendo los criterios éticos y las normas de seguridad aprobadas por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL). Dicha organización, regula que los procedimientos no causen dolor o sufrimiento innecesario y que tengan una adecuada justificación científica.

Mediante el fluorómetro de la figura 33a, se midió el registro local de la cantidad de droga en ratones a lo largo del tratamiento de tumores de fibrosarcoma durante la TFD [244]. Esto es, antes de inyectar por vía sistémica el Fs ; antes y después de la iluminación y algunos días más tarde. A través de esta herramienta fue posible identificar el momento más adecuado para aplicar la dosis de iluminación, así como también el consumo de la misma posterior a la iluminación. Se iluminaron ratones con una dosis de $20 J/cm^2$ de acuerdo a las recomendaciones establecidas por el protocolo de la droga Foscan[®] (apéndice 5.3), utilizando un arreglo experimental formado por la L-637-1,06 y las lupas alineadas para converger la luz solamente al área tumoral. Dicha zona de interés, fue delimitada mediante telas negras y, en algunos casos, las mediciones de fluorescencia *in situ* permitieron detectar

zonas donde había droga y que escapaban a la percepción del ojo humano (Figura 58).

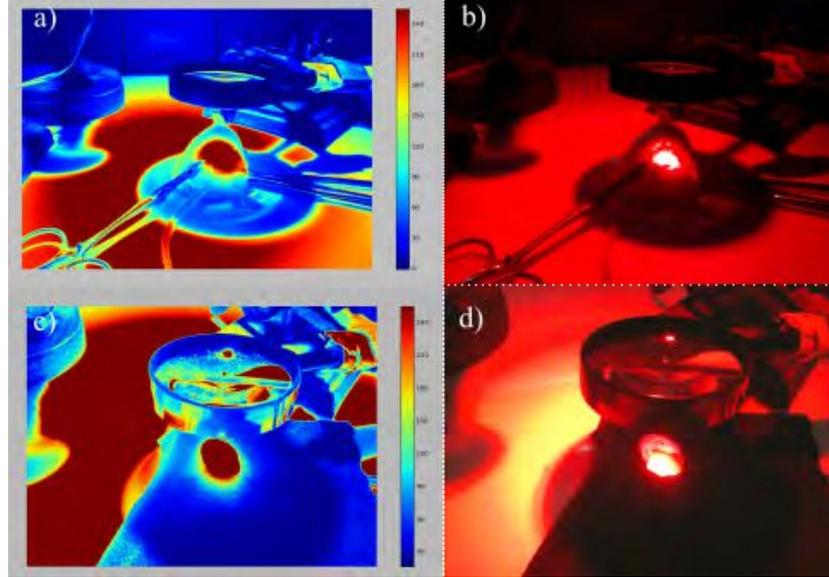


Figura 58. Tratamiento mediante TFD en ratones BALB/c: a) y c)son imágenes procesadas en Python con un código (Ver apéndice 5.4) escrito para filtrar las zonas más expuestas; b) y d) fotografías reales de (a y c). También se visualiza el uso de telas negras para asegurar la dosis de luz sólo al area tumoral. En este caso el ratón recibió una dosis de anestesia (80 mg/kg de ketamina) y una dosis única de iluminación ($T_I = 8 \text{ min}$).

La tasa de fluencia fue de 54 mW/cm^2 y la cantidad de luz entregada por la lámpara LED fue 34 lm/cm^2 a 68 lm/cm^2 a una distancia de $0,79 \text{ m}$ durante $5 \text{ min} \leq T_I \leq 10 \text{ min}$ [245]. El tiempo de iluminación fue controlado por un timer conectado directamente al sistema de iluminación.

La iluminación de la zona tumoral donde se acumula preferentemente el F_s produce la disminución de la señal de fluorescencia a lo largo del tratamiento con la TFD. Para la evaluación de la señal de fluorescencia se emplearon tres índices adaptados de la literatura [246][247] a los experimentos descritos en esta sección. Estos índices se definen como sigue:

$$I1 = 100 \frac{f_a1I - f_d1I}{f_{antes1I}} \quad (3.1)$$

$$I2 = 100 \frac{f_a2I - f_d2I}{f_{ade2I}} \quad (3.2)$$

$$I3 = 100 \frac{f_a2I - f_{ds2I}}{f_{adela1I}} \quad (3.3)$$

En la ecuación anterior, f_a se refiere a la fluorescencia antes y f_d después, $1I$ a la primera iluminación y $2I$ a la segunda. La comparación entre $I3$ e $I2$ es una indicación de la magnitud del “ efecto rebote ”, ya que incluye como cociente la señal de fluorescencia inmediatamente después de la primera iluminación ($1I$) y la fluorescencia $24 h$ después de la primera iluminación ($2I$) ya que el primero relaciona la disminución de la señal de fluorescencia con la señal inicial, antes del tratamiento y el segundo solo considera parámetros relacionados con la segunda iluminación. Entonces, la diferencia está relacionada con la acumulación de nuevo Fs en la región tratada.

3.3.1. Mediciones de fluorescencia a lo largo del tiempo, determinación de la máxima concentración de Fs

Para lograr un óptimo resultado del tratamiento de la TFD, resulta conveniente realizar la iluminación de la zona afectada cuando la cantidad de Fs acumulado es máxima. La concentración del Fs varía con el tiempo desde la inyección. Después, de una dosis de m-THPC de $0,75 mg/kg$, seguimos la evolución de la concentración de m-THPC midiendo la señal de fluorescencia. Se siguió la evolución de la intensidad de fluorescencia a $652 nm$, tomada de diferentes sitios en el modelo animal; los resultados de fluorescencia se obtuvieron promediando sobre diferentes sitios del tumor cubierto de piel y sobre diferentes partes del tumor. La concentración máxima del Fs en el tejido tumoral se observó durante un intervalo de tiempo entre $24 h (\approx 38UA)$ y $96 h (\approx 28UA)$ después de la administración del mismo (Figura 59). Las mediciones promedio de fluorescencia comenzaron a disminuir después de, aproximadamente, $100 h$, y luego de $256 h$ la señal disminuyó a aproximadamente $10 UA$. Entonces, la concentración del Fs se vuelve baja para realizar la iluminación terapéutica.

Como se indicó en materiales y métodos, la inyección de la droga se realizó en forma intravenosa, como era de esperar, que la fluorescencia máxima medida se obtuvo en la región distal de la cola. También habría que aclarar que los ratones se mantienen después de la inyección del Fs en una caja oscura con las condiciones de aireación y alimentación adecuadas para mantener confortablemente a los ratones.

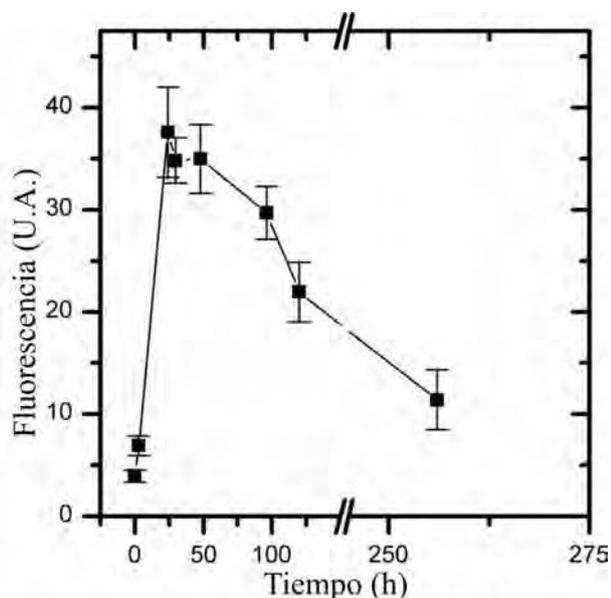


Figura 59. Intensidad de fluorescencia promedio del tumor medido en el valor máximo del espectro del m-THPC a 652 nm . Se realizaron mediciones a diferentes tiempos después de la inyección de F_5 con una dosis de $0,75\text{ mg/kg}$ como se indican en la figura. Los datos se obtuvieron tras promediar diferentes sitios tumorales y un $n = 4$. Se incluye el error estándar.

En otra serie de experimentos, se determinó la intensidad de fluorescencia promedio a lo largo del tiempo, midiendo en la axila, en las partes apical, craneal, ventral, dorsal y caudal del tumor cubierto de piel. El promedio se realizó considerando siete mediciones por sitio, y se incluye el error estándar. A partir de las mediciones de fluorescencia en los sitios del tumor, se observó una intensidad mínima en el rango de $24\text{-}48\text{ h}$, dependiendo del sitio tumoral. Los valores máximos de 46 , 58 , 30 , 45 y 45 UA se obtuvieron de los sitios craneal, caudal, apical, dorsal y ventral, respectivamente. Diferencias entre valores de intensidad de fluorescencia medidos en un tiempo constante y en diferentes sitios del tumor reflejan su heterogeneidad (Figura 60).

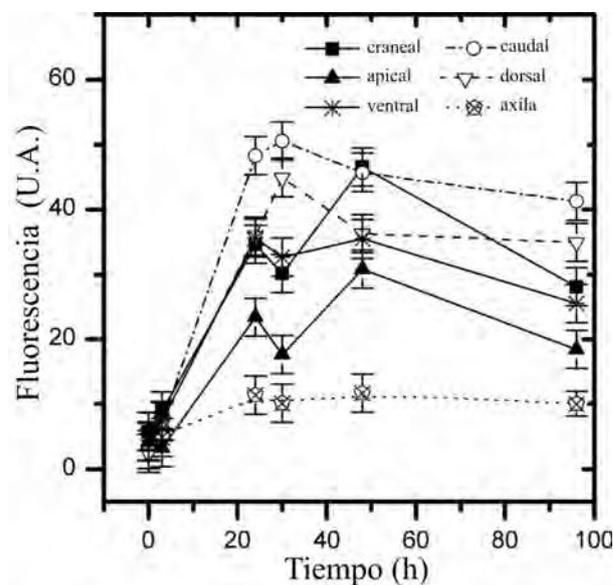


Figura 60. Intensidad de fluorescencia típicas en diferentes sitios tumorales a lo largo del tiempo. Los animales fueron inyectados con $0,75 \text{ mg/kg}$ de m-THPC. Se calculó el error para $n = 7$ en cada sitio tumoral.

Después de 24 - 96 h de la inyección de F_s , la señal de fluorescencia de cualquier sitio del tumor resultó mayor que el obtenido de la axila. Por lo tanto, se observó la acumulación preferencial de la droga en el tejido neoplásico. La fluorescencia de la axila es producida principalmente por la piel, mientras que las mediciones en el tumor incluyen el aporte de la piel.

3.3.2. Mediciones de fluorescencia en diferentes sitios del tumor antes y después de la iluminación. TFD con iluminación única

Se determinó la fluorescencia en las regiones apicales y laterales de los tumores antes, inmediatamente después de la iluminación, y a las 48 h. El promedio de las determinaciones y sus errores estándares se muestran en la figura 61. En la región apical del tumor, las mediciones se realizaron en cuatro sitios (1, 2, 3 y 4); y en la región lateral como craneal, caudal, dorsal y sitios ventrales (Figura 34a).

En la mayoría de los casos, los registros de fluorescencia aumentaron después de la inyección de m-THPC a una dosis de $0,75 \text{ mg/kg}$, y antes de la iluminación era significativamente más grande que inmediatamente después de la iluminación. Esto indica que la reacción del F_s ocurre a la dosis de luz aplicada.

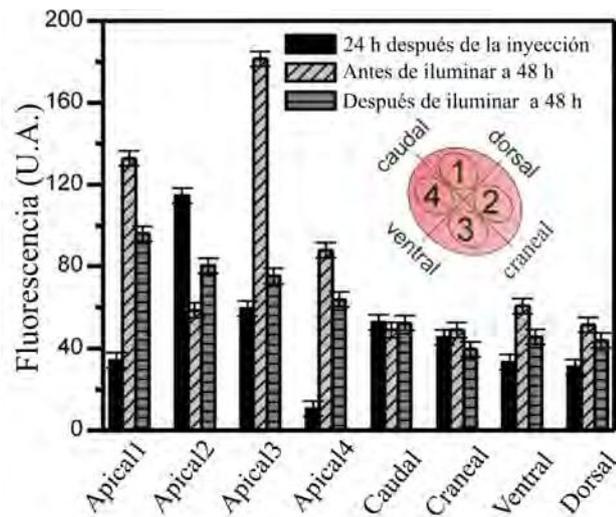


Figura 61. Mediciones de intensidad de fluorescencia promedio típicas en los sitios: apical, caudal, craneal, ventral y dorsal; 24 *h* después de la inyección y 48 *h* antes y después de la iluminación, como se indica en la figura. En el comienzo de los experimentos cuando se inyectó el *Fs*, el área tumoral fue próxima a 4 *mm* X 4 *mm* en todos los casos. Los ratones fueron inyectados con 0,75 *mg/kg* de *m*-THPC y luego de 48 *h*, las áreas afectadas, fueron iluminados durante 13 *min*.

Los mayores cambios en fluorescencia, antes e inmediatamente después de la iluminación, se midieron en los sitios apicales, particularmente un cambio cercano a 100 *UA* se observó para el sitio apical 3. Para los sitios apicales 1 y 4 se observó una disminución relativa inmediatamente después de la iluminación. En cambio, para el sitio apical 2 no hay disminución después de la iluminación.

La disminución de la fluorescencia después de la primera iluminación, en los sitios laterales del tumor, fue significativamente más pequeña que en las regiones apicales. Esto es en parte consistente con la geometría del tumor que restringe la cantidad de luz que llega a las regiones laterales. Vale la pena señalar que la heterogeneidad de los tumores afecta la respuesta cuando es iluminado, y cada sitio exhibe un particular comportamiento [248]. Las mediciones de fluorescencia están influenciadas en gran medida por la presencia de sangre en el tejido examinado debido a la baja transmisión de la luz a la longitud de onda de excitación a 395 *nm*. Los tumores experimentales contienen una fracción significativa de microrregiones que son crónica o transitoriamente hipóxicas. Hay una creciente evidencia que muestra que la hipoxia (y la posterior reoxigenación) puede tener un profundo impacto en la progresión maligna y en la recuperación del tejido luego de aplicada la terapia [249] [250]. Cualquiera que sea el caso, queda en evidencia la importancia de

la geometría del tejido y el ángulo de incidencia de la luz para determinar la dosimetría óptima para una TFD efectiva, en consonancia con lo indicado en la bibliografía [251]. En este trabajo, debe considerarse la distribución de la luz dentro del tumor, para evitar sacar conclusiones y predicciones erróneas, respecto al posible éxito del tratamiento. Además, es importante colocar la fuente de luz perpendicular al tumor, para minimizar errores que alteran la fluencia de fotones dentro del tumor, pues si el ángulo de incidencia es menor de 15° en el tratamiento con TFD, no es necesario ajustar el ángulo de incidencia [251].

Una correlación plausible entre fluorescencia y la concentración de m-THPC debe depender de las propiedades ópticas del tejido. En nuestro caso, siempre que las propiedades ópticas permanezcan constantes en el tiempo de exposición de la luz en cada sitio de medición, la fluorescencia sería indicativa de la C_F , incluso cuando el tumor es altamente heterogéneo.

Para nuestras mediciones de fluorescencia, a pesar de la alta reactividad de oxígeno singulete, la estructura del tejido se mantuvo sin cambios de acuerdo con datos histológicos, por lo que la comparación entre mediciones, fue factible antes y después de la iluminación. En todos los casos, es importante controlar la ubicación de la fibra óptica en cada sitio a lo largo toda la observación en las diferentes etapas del experimento.

3.3.3. Aumento de la fluorescencia luego de la iluminación, “efecto rebote”. Doble aplicación de la TFD

Como se discutió en la sección anterior, para ratones inyectados con $0,75 \text{ mg/kg}$, en la mayor parte de la región apical, la intensidad de la fluorescencia, inmediatamente después de la iluminación mostró una disminución significativa debido a la reacción del F_s con la luz proveniente de la fuente F-637-1,06. Pero, curiosamente, 24 h después de la primera iluminación, la intensidad de la señal de fluorescencia medida en los mismos sitios mostró que permanecía constante, o aumentaba en relación con la señal obtenida inmediatamente después de la iluminación (Figura 62).

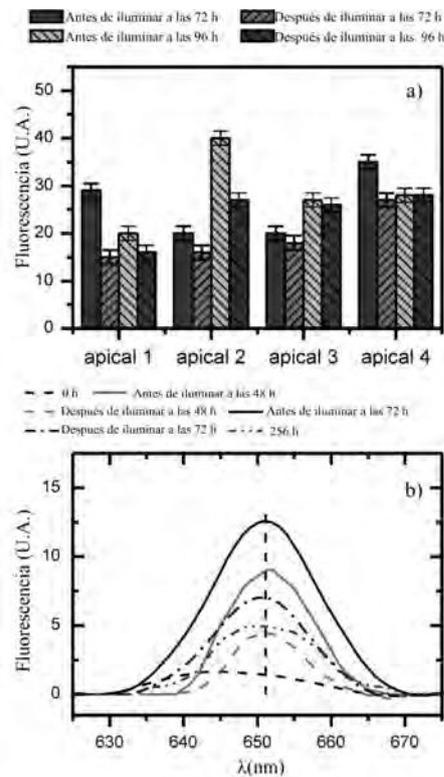


Figura 62. Mediciones de la señal de fluorescencia en la región apical del tumor. Los ratones fueron inyectados con una dosis de $0,75 \text{ mg/kg}$: a) la primera fue realizada a las 72 h y la segunda 96 h luego de la inyección de la droga, b) la primera iluminación fue realizada a las 48 h y la segunda 72 h luego de la inyección de la droga.

El aumento de la señal de fluorescencia, que llamamos “ efecto rebote ”, es indicador de más cantidad de Fs que llega a ciertos sitios durante el intervalo de tiempo entre la primera y la segunda iluminación, que puede ser usada para generar más destrucción de tejido neoplásico.

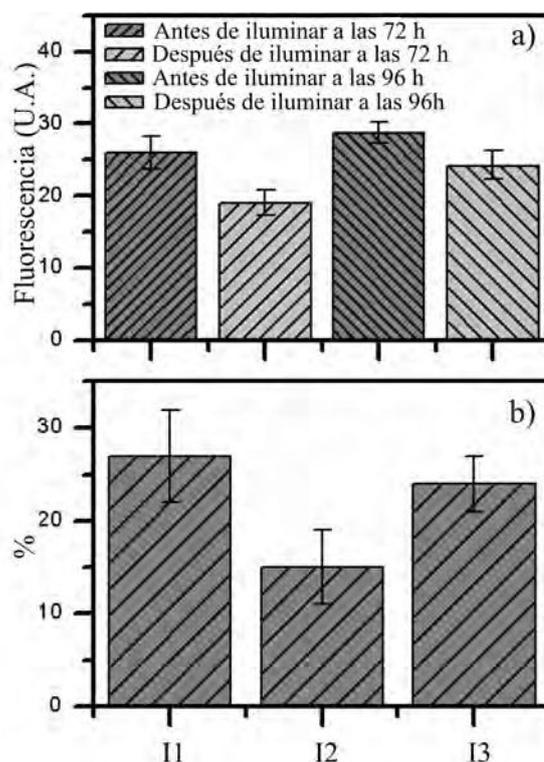


Figura 63. a) mediciones de fluorescencia antes y después de la primera y de la segunda iluminación; b) promedio de índices $I1$, $I2$ e $I3$ calculados para cuatro sitios de la región apical del tumor. Se inyectó una dosis de $0,75 \text{ mg/kg}$ de Fs . La primera iluminación fue realizada a las 72 h y la segunda 96 h luego de la inyección de la droga.

La progresión de la reacción fotodinámica se deduce de la disminución de la señal de fluorescencia inmediatamente después de la segunda iluminación. Una observación similar fue indicada en la literatura [252] a través de la reposición de Photofrin como Fs después de 5 h de iluminación para un fibrosarcoma inducido por radiación en ratones C3H, aunque no se realizó una segunda iluminación [252].

Además, los índices $I1$, $I2$ e $I3$ son útiles para cuantificar mejor la cantidad de reacción causada por una simple o una doble iluminación. Los índices comparan la fluorescencia antes y después de la iluminación, en relación con la fluorescencia antes de la primera iluminación ($I1$), la fluorescencia antes de la segunda iluminación ($I2$), y después de la primera iluminación ($I3$). El último índice es indicativo de la cantidad de fotorreacción proveniente de zonas no iluminadas y que, en parte, desaparece probablemente debido al metabolismo, en el rango de tiempo comprendido entre la primera y segunda iluminación.

Para la región apical del tumor, los datos promedio de diferentes sitios muestran que en la mayoría de los casos $I1$ es más grande que $I2$ e $I3$, contrario al sitio apical 2 donde se puede inferir que $I3 > I2 > I1$. Estos datos indicarían que el “ efecto rebote ” puede ser útil para aumentar la cantidad de reacción por lo menos en ciertos sitios del tumor.

En otra serie de experimentos, los ratones se inyectaron con una dosis de $1,4 \text{ mg/kg}$ de m-THPC mostrando un aumento del valor promedio de la señal de fluorescencia en la región apical, 24 h después de la inyección, en comparación con los ratones inyectados con $0,75 \text{ mg/kg}$ de m-THPC (Figura 64).

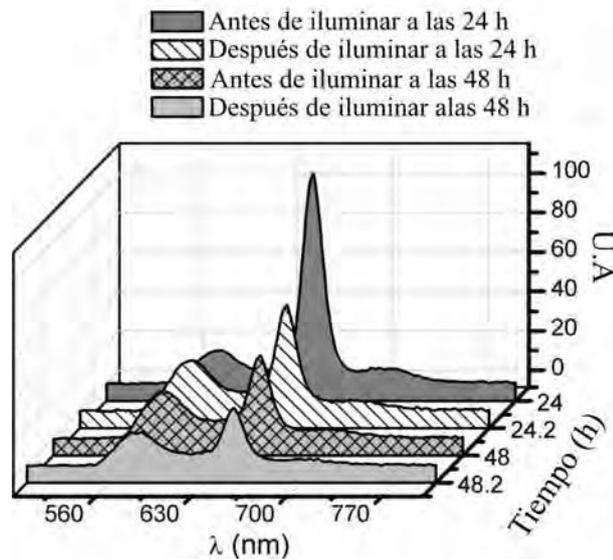


Figura 64. Espectro de fluorescencia promedio registrado en el rango de $600\text{-}700 \text{ nm}$ de la zona apical del tumor de un ratón inyectado con una dosis de $1,4 \text{ mg/kg}$. La primera iluminación fue realizada a las 24 h y la segunda a las 48 h luego de la incorporación de la droga.

En estos experimentos se observó una clara disminución (desde un valor de 50 a 10 UA) de la señal de fluorescencia después de la primera iluminación, 24 h después de la inyección del Fs .

De acuerdo a los datos presentados (Figura 64), esto es, la constancia en la señal de fluorescencia entre la primera y segunda iluminación, se puede plantear la hipótesis de que el metabolismo del Fs favorecería una disminución más significativa en la fluorescencia, que no fue observado en nuestros experimentos. Por lo tanto, una doble iluminación mejoraría el resultado de la TFD. La relación entre la fluorescencia medida a 652 nm , antes y después de la segunda iluminación, fue significativamente mayor para el experimento con los ratones inyectados con $0,75 \text{ mg/kg}$ que para los ratones inyectados con $1,4 \text{ mg/kg}$, es decir, $2,33$ para la concentración más baja y $1,65$ para la mayor

concentración. Esto puede explicarse por el requisito de más iluminación y también más oxígeno en el caso de una mayor concentración de F_s . Por lo tanto, una mayor concentración de F_s no implica necesariamente un efecto fotodinámico más extenso[253]. Entonces, la TFD debe involucrar cantidad adecuada de luz con una longitud de onda específica y oxígeno para asegurar la reacción. En este sentido, se indicó que las mediciones de fluorescencia están limitadas para predecir el resultado de la TFD, como así, la mayor fluorescencia obtenida a las 72 h después de la inyección en comparación con el obtenido a las 48 h después de la inyección no tiene correlación con el mejor de los resultados obtenidos al iluminar la zona tumoral del ratón a las 48 h después de la inyección [254].

3.3.4. Descripción histológica de un fibrosarcoma

La histología tumoral es útil para interpretar los datos de fluorescencia presentados. En esta subsección se da una breve descripción histológica del tumor. Un tumor típico, obtenido después de dos semanas de inocular células tumorales de un fibrosarcoma (células TMC) en el flanco derecho de un ratón; se extirpó y cuidadosamente se recortó. Se lo colocó en casetes de inclusión de parafina, manteniendo su orientación real en el flanco del ratón. Este tipo de tumor consiste en un tejido conectivo (blando) maligno originado en fibroblastos. El tumor aparece como una masa compacta de fibroblastos anaplásicos, El tumor suele ser alimentado por la vasculatura de la dermis donde se observan vasos más grandes en la proximidad de la piel, mientras que la sección central del tumor muestra vasos más pequeños distribuidos homogéneamente alrededor del tejido tumoral (Figura 65). Concomitantemente, un mayor número de arteriolas y vénulas se observaron en la región del tumor fijado a la piel. Además, una porción de la piel sobre el el tumor exhibió vénulas con tamaño aumentado.



Figura 65. Extracción de tejido neoplásico murino: luego de la inoculación celular, en este caso células TMC, se esperan aproximadamente dos semanas y se procede a la localización y extirpación de la masa celular ubicado en el flanco derecho del ratón.

Por otro lado, en la mayoría de las partes del tumor, se observó una distribución de vasos bastante homogénea (Figura 66), al menos a escala del *mm*, lo cual corresponde al tamaño de la fibra óptica utilizada en las mediciones fluorescentes.

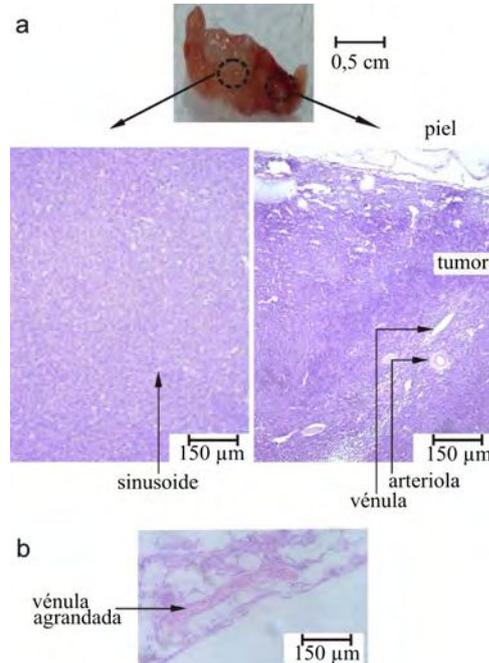


Figura 66. Histología de un tumor de fibrosarcoma: a) imagen de un corte típico del tumor; b) fotografía de un corte histológico del tumor teñido con hematoxilina-eosina. En la región próxima a la piel, el tumor presenta vasos agrandados. En la región central los vasos son más pequeños y se muestran un poco más homogéneamente distribuidos.

3.3.5. Mediciones de transmisión de la luz y de fluorescencia *ex vivo*

La intensidad de la luz que pasa a través de la piel del ratón que cubre el tumor se midió empleando un espectrómetro de fibra óptica y fuentes L-395-1 y L-660-1. Las muestras se colocaron en un portamuestras con ventanas planas de cuarzo, siguiendo el esquema de la figura 37a. Para 660 *nm*, la intensidad medida fue 6-10 veces mayor que para 395 *nm*. Los valores más pequeños fueron obtenidos en regiones que presentaban una concentración relativamente alta de vasos sanguíneos. La transmitancia de la piel de ratón BALB/*c* informada fue cercana a 50 % a 660 *nm* y aproximadamente 5 % a 395 *nm* [255]. Por otro lado, la intensidad media de luz de 395 *nm* y 660 *nm* que pasa a través de una porción de tumor de diferente grosor (*h*) que

van de $750 \mu\text{m}$ a $2000 \mu\text{m}$ se representa en la figura 67. La intensidad de la señal decae monótonamente con h para ambas longitudes de onda.

Para 660 nm y $h = 750 \mu\text{m}$, la intensidad se acerca a 4700 UA y para $h = 2000 \mu\text{m}$, está cerca de 1650 UA . Para 395 nm la intensidad alcanza un valor cercano a 920 UA para $h = 750 \mu\text{m}$ y disminuye a 100 UA para $h = 2000 \mu\text{m}$. Estos datos indicarían que la fluorescencia detectada *in vivo* reflejaría la presencia de m-THPC en la piel y el tumor.

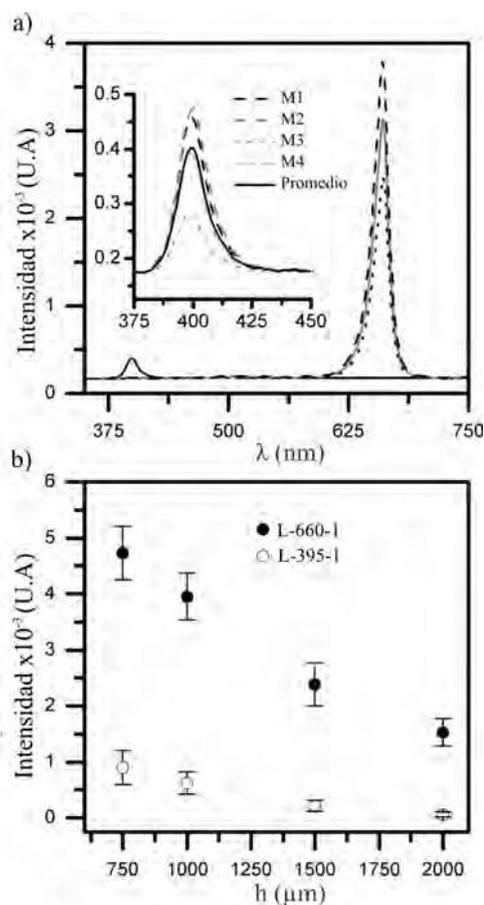


Figura 67. Intensidad de la luz transmitida en la piel que recubre el tumor: a) para 395 nm y 660 nm . Se incluyen (inset) cuatro espectros en diferentes sitios de la piel. La señal más pequeña se obtiene de regiones con una gran densidad de vasos sanguíneos; b) dependencia de la intensidad de la luz transmitida con el espesor del tumor.

Se realizaron mediciones de fluorescencia *ex situ* siguiendo el esquema de la figura 34b, para discriminar la contribución tanto de la piel, como la del tumor, en la señal total de la fluorescencia. Seis ratones fueron inyectados con m-THPC a una dosis de $0,75 \text{ mg/kg}$ y después de 48 h se sacrificaron tres

ratones antes de la iluminación y otros tres inmediatamente después de la iluminación. La fluorescencia se determinó dentro de las cuatro horas posteriores al sacrificio de los ratones en (i) tumor cubierto de piel, (ii) el tumor sin piel y (iii) la piel. En todos los casos, se realizaron mediciones colocando la fibra óptica en cuatro sitios apicales diferentes.

En la mayoría de los casos, las mediciones de fluorescencia fueron en promedio mayores antes de la iluminación que inmediatamente después de la iluminación. Esto indica que la reacción del *Fs* se produce a la dosis de luz aplicada como en el caso las mediciones *in vivo*. Las señales más grandes se obtuvieron en sitios del tumor cubierto de piel y el tumor sin piel. En contraste, la fluorescencia de los sitios en la piel fue significativamente más pequeña (Figura 68).

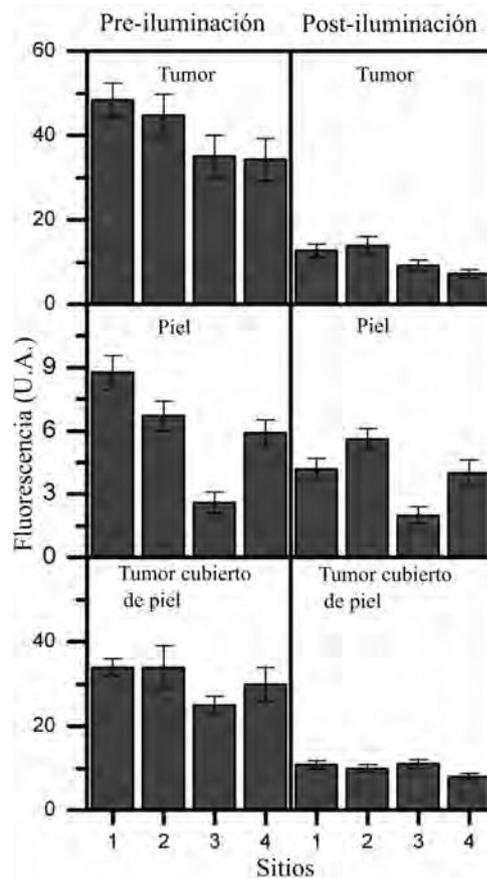


Figura 68. Mediciones de fluorescencia *ex vivo* de la piel que recubre el tumor, el tumor con piel y del tumor sin piel, antes y luego de la iluminación. En todos los casos, la fibra óptica fue colocada en la misma coordenada espacial.

Las mediciones promedio de fluorescencia del tumor cubierto de piel, tumor y piel indican que la contribución de la piel a la señal de fluorescencia total

es aproximadamente 15 y 30 %, antes y después de la iluminación, respectivamente.

La contribución de los diferentes planos del tumor desde la dermis al tejido peritoneal está relacionado con la dependencia de la transmitancia en 395 y 660 *nm* con el grosor del tumor.

Existen trabajos que muestran que la iluminación durante el período inicial luego de la inyección del *Fs* no es efectiva [256] [257][258][259]. La farmacocinética de m-THPC en una rata con un modelo de tumor de fibrosarcoma indica que la concentración del *Fs* en el tumor es aproximadamente dos veces y 1,35 veces que el valor observado retenido en la piel 48 y 72 *h* después de la administración [258]. En un modelo de mesotelioma, la piel tiene una absorción de drogas mayor que el tumor [259]. Para nuestro modelo de tumor, la fluorescencia de la piel permanece significativamente más pequeño que en el tumor a las 48 y 72 *h* posterior a la administración del *Fs*, como se puede apreciar en los datos representados en la figura 68 y sus comentarios.

3.3.6. Evaluación de la TFD en el crecimiento de los tumores de fibrosarcoma en modelo murino

El efecto de la terapia se observó después de 15 días de la iluminación; la masa tumoral disminuyó y se formó la escara en los animales tratados en comparación con los ratones control. La disminución en el volumen no fue homogénea, pero fue más significativo en la región apical, donde estaba el tumor iluminado directamente, mientras que las zonas caudal, craneal, ventral y dorsal recibieron la luz tangencialmente.

En el caso de la dosis más alta probada (1,4 *mg/kg*), daños en otras partes del ratón, incluida la cola, hacen al procedimiento no recomendable. En estos casos, es necesario ser extremadamente cuidadoso para evitar la exposición del ratón a la luz solar (Figura 69).

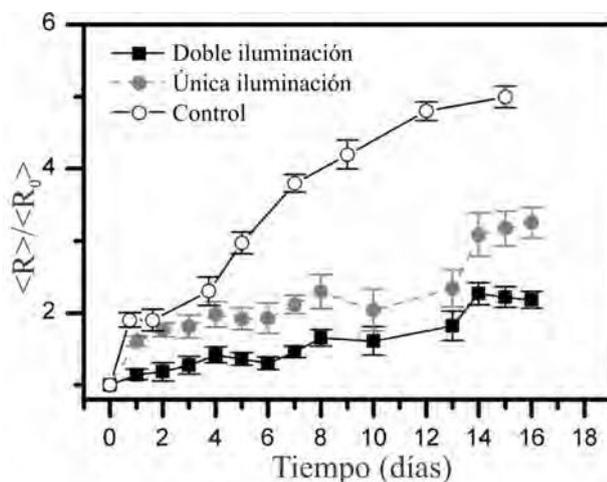


Figura 69. Radio tumoral normalizado en función del tiempo para los ratones inyectados con una dosis $0,75 \text{ mg/kg}$ y tratados 24 h y 48 h luego de ser inyectados e iluminados una vez (círculo gris sólido), recibir doble iluminación (cuadrados sólidos) y ratón control (círculos). Se consideró un tamaño muestral de 6 roedores y el error estándar.

Si bien los datos muestran que hay una mayor disponibilidad de Fs para la reacción fotoquímica, las regiones circundantes pueden ser dañadas, haciendo que la terapia sea menos controlable. Además, la reacción fotoquímica genera calor, lo que hace que la terapia sea menos tolerable.

Para cuantificar la evolución del tamaño del tumor se utilizó el cociente entre el radio tumoral promedio (R), calculado como el promedio entre el radio máximo y mínimo, dividido por el radio inicial del tumor (R_0).

La tasa de crecimiento tumoral disminuyó significativamente en el caso de ratones tratados en comparación con los ratones control. Una segunda iluminación después del “efecto rebote” mejoró estadísticamente el resultado del tratamiento TFD como se muestra en la figura 68, aunque para este tipo de tumor y para la configuración experimental utilizada para realizar la iluminación, no se puede esperar una mejora más significativa en el tratamiento. El objetivo principal del trabajo fue mostrar la importancia de las mediciones de fluorescencia para seguir la evolución de la concentración de Fs durante el tratamiento con TFD. Gracias a esto, pudimos observar el “efecto rebote” y emplearlo para aplicar una segunda iluminación. Recientemente, informaron ese fraccionamiento ligero, que consta de dos aplicaciones de dosis de luz separadas 4 h , aumenta la eficacia de la TFD utilizando ácido 5-aminolevulínico como Fs en piel de ratón normal [260]. El “efecto rebote” es relevante localmente, como fue demostrado en este trabajo mediante mediciones de fluorescencia en diferentes sitios del tumor. Estos resultados están asociados con la heterogeneidad del tumor reflejada en diferencias en

el nivel de concentración del Fs y del oxígeno, como informaron en [261]. De hecho, el daño vascular juega un papel clave en la determinación del resultado TFD y depende de la membrana basal[261]. La imagen de los vasos tumorales después de la TFD propuso como un marcador valioso para predecir la efectividad del tratamiento [262]. En cualquier caso, las medidas de fluorescencia promedio en diferentes sitios del tumor, pueden detectar el “efecto rebote ” y parecen ser útiles para aplicar una segunda iluminación.

3.3.7. Monitoreos *in vivo*

Una forma de controlar la extensión de la reacción fotoquímica es a través del monitoreo de la temperatura. Dicha herramienta, es capaz de revelar la distribución de la droga fotoactivable en el área iluminada. En una primera serie de experimentos, se utilizaron ratones BALB/c a los que se les inyectó el Fs en dos concentraciones, $0,4\text{ mg/kg}$ y $0,75\text{ mg/kg}$ y se iluminaron con la fuente L-637-1,06 con lentes acopladas, ya sea realizando una o dos aplicaciones de TFD (Figura 70).



Figura 70. Lámpara utilizada en la iluminación de los BALB/c. Se puede visualizar el uso de protecciones con telas negras, dejando solamente expuesto el área tumoral, así también como, el rasurado de los ratones en el área tumoral para que el pelo no interfiera luz incidente.

Luego de mantener los ratones protegidos de la exposición a la luz del ambiente por 24 *h*, se ensayó la TFD según se indicó en el párrafo de arriba y se siguió el proceso midiendo la temperatura de la zona iluminada empleando la cámara AGEMA 550, de la figura 34a. El experimento control consistió en realizar el mismo procedimiento con tumores inoculados en el flanco de ratones que no fueron inyectados con el *Fs* (Figura 71).

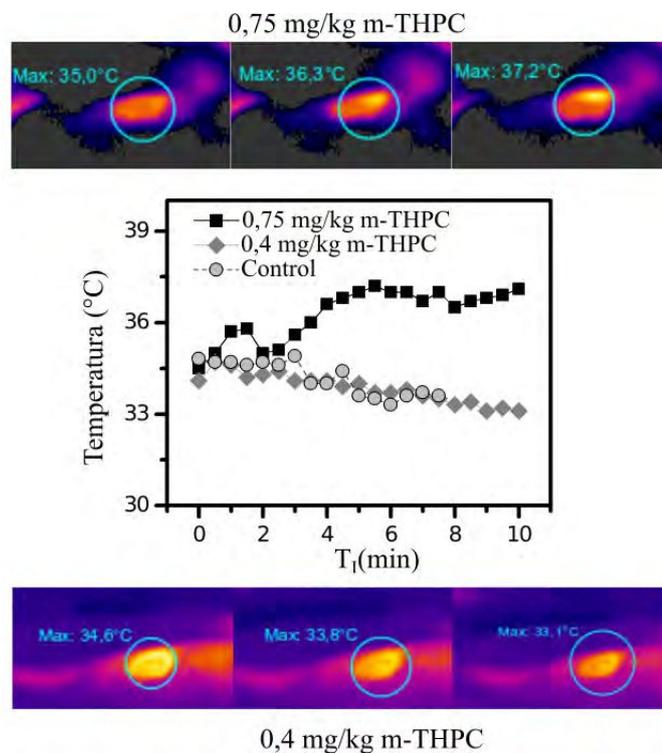


Figura 71. Termografía en ratón BALB/*c* tratado con iluminación única con dos concentraciones de m-THPC de 0,4 *mg/kg* y 0,75 *mg/kg*.

La temperatura se incrementó gradualmente con la presencia del *Fs* en comparación con los ratones control de (28,7°C a 35,2°C). Aquel aumento, también, se apreció en BALB/*c* tratados con doble iluminación y una concentración única de *Fs* de 0,75 *mg/kg* (Figura 72).

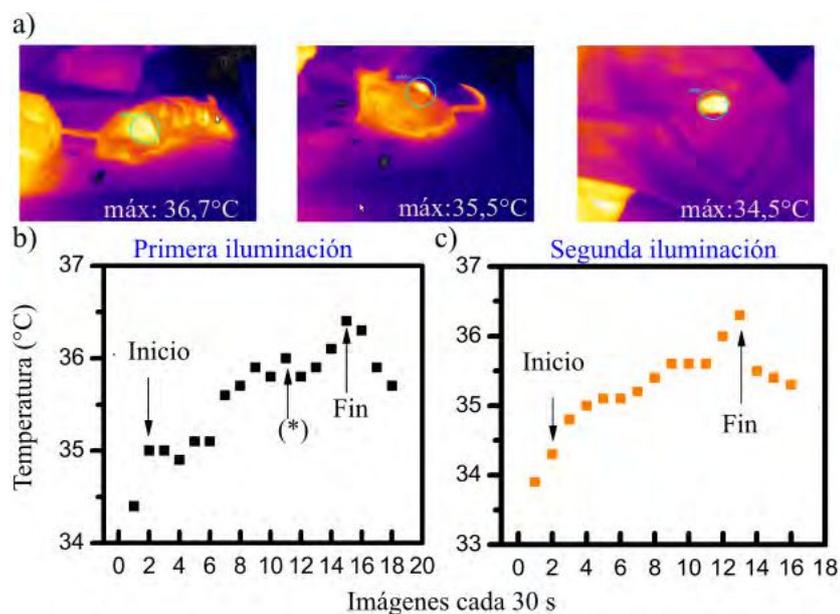


Figura 72. Termografía en ratón BALB/c tratado con doble iluminación y una dosis de m-THPC de $0,75 \text{ mg/kg}$: a) termografías obtenidas cada cinco minutos; b) seguimiento de la temperatura local tumoral durante la primera iluminación; c) seguimiento de la temperatura local tumoral durante la segunda iluminación.

En otro modelo tumoral, con murinos BALB/n, se realizó una iluminación única con la fuente L-420-12 de la figura 24. Se registró un aumento de la temperatura local a medida que transcurre el tiempo de iluminación (Figura 73), mediante la cámara SDS INFRARED E8N N/S E8210040 de la figura 34b.

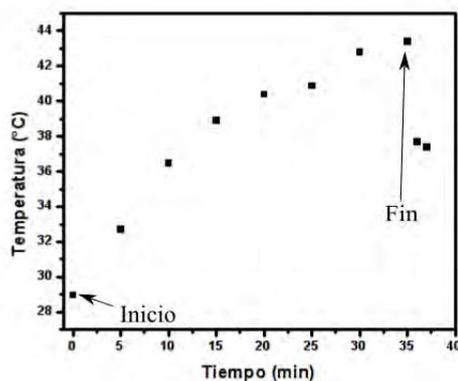


Figura 73. Termografía en ratón BALB/n a lo largo del tiempo de iluminación durante la TFD usando L-420-12 y una dosis de F_s de 1 mg/kg .

Éste comportamiento se corresponde con lo previamente observado en ratones BALB/c. En este último caso, a diferencia de los BALB/c, el ratón

estaba anestesiado con una dosis de ketamina.

Poder contar con una herramienta, como lo es la termografía, permite el control de los umbrales de dolor, evitando la anestesia, lo cual resulta una ventaja en la práctica clínica. En los casos de no anestesia, se puede llegar a la dosis de iluminación mediante el fraccionamiento de la misma y aplicando compresas frías entre una aplicación y otra.

Durante el tratamiento fotodinámico se determinó la intensidad de fluorescencia a 652 nm , y se observó que esta cayó en forma monótona con el tiempo, indicando la disminución de la cantidad de Fs en la zona tumoral (Figura 74).

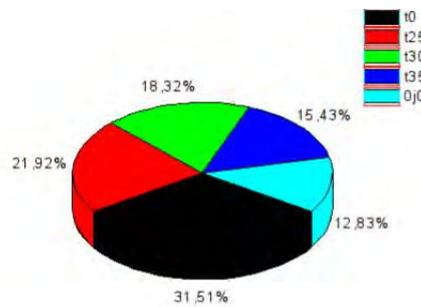


Figura 74. Medición de la fluorescencia de m-THPC en ratón BALB/n a lo largo de la TFD siguiendo el set up de la figura 8b. Para 0, 25, 30 y 35 *min* de tratamiento.

3.4. Comparación de la TFD con fuentes LEDs de distintas longitudes de onda en modelos 2D y 3D de células HeLa

Siguiendo con el objetivo de validar los efectos inhibidores del crecimiento tumoral de la TFD, empleamos fuentes LED de diferentes longitudes de onda en cultivos de células HeLa en monocapa (2D) y en esferoides (3D), como en el trabajo [263]. Particularmente, con el modelo 3D se intentó modelar varias capas de células HeLa como ocurre en las lesiones intraepiteliales cervicales de bajo grado (CINs); para verificar la eficacia de la fuente L-395-1, que si bien penetra menos que el rojo, la absorción del Fs allí, es mucho más elevada.

Cuantificación de la muerte celular en cultivos de células HeLa 2D: ensayo MTT

Se evaluó la viabilidad celular a través de la medición de la absorbancia del formazan generado por las células vivas, 24 *h* después del tratamiento con T_I en el rango de 0 a 20 *min* y C_F en el rango de 0,05 a 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ utilizando las fuentes L-395-1, L-460-1, L-635-1 y L-660-1 (Figura 75).

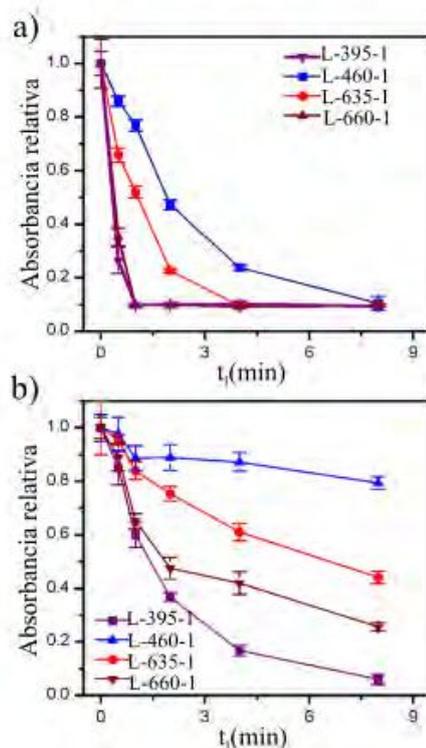


Figura 75. Ensayo MTT para cultivos de células HeLa en monocapa después de 6*h* de aplicada la TFD con diferentes T_I , se emplearon las fuentes L-395-1, L-460-1, L-635-1 y L-660-1 para: a) $C_F = 2 /\text{ml}$; b) $0,5 /\text{ml}$. La viabilidad es expresada como absorbancia relativa y el error estándar se calcula para tres experimentos de cada condición. La fuente L-395-1 resultó ser la fuente más eficiente.

Para $C_F = 2 \text{ } \mu\text{g/ml}$ la viabilidad celular disminuye a un valor mínimo cercano a 0,1 con un $T_I = 8 \text{ min}$, independientemente de la longitud de onda de la luz. Tanto para L-395-1 como para L-660-1 el valor mínimo se alcanza en T_I cerca de 1 *min*, mientras que para L-460-1 y L-635-1 este T_I es de 4 *min* y 8 *min*, respectivamente. Por lo tanto, la disminución de la viabilidad celular es más abrupta para L-395-1 y L-660-1 que para L-460-1 y L-635-1; siendo esta última la menos efectiva.

Por otro lado, para $C_F = 0,5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ y $T_I = 8 \text{ min}$ la viabilidad celular alcanzó 0,1 solo para la luz LED de 395 *nm*. Para luces LED de 460, 635 y 660 *nm*, la viabilidad celular dió como resultado 0,8; 0,45 y 0,25 respectivamente (Figura 76).

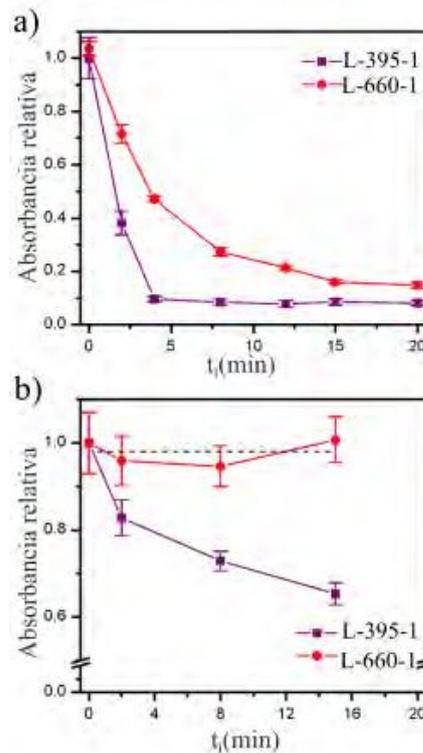


Figura 76. Ensayo MTT para cultivos de células HeLa en monocapa 6 *h* después de la TFD con diferentes T_I , empleando las fuentes L-395-1 y L-660-1 para: a) $C_F = 1 \text{ } \mu\text{g/ml}$; b) $C_F = 0,05 \text{ } \mu\text{g/ml}$. La viabilidad se expresa como absorbancia relativa y el error estándar se incluye para tres experimentos independientes en cada condición. Para la concentración mínima de *Fs* la L-660-1 no puede producir el efecto fotodinámico. Esquema experimental de la figura 22.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, elegimos las fuentes L-395-1 y L-660-1 dado que resultaron ser más efectivas para la TFD y se evaluó la

efectividad del tratamiento empleando C_F más alto o más pequeño que $0,5 \mu g/ml$ para representar mejor el efecto de la longitud de onda a diferentes densidades de energía lumínica.

En consecuencia, se utilizaron T_I de 20, 15, 12, 8, 4 y 2 *min*. Por lo tanto, para $1 \mu g/ml$ y para $0,003 J/cm^2$ ($T_I = 4 \text{ min}$) solamente L-395-1 alcanza el valor mínimo de 0,1. Además, para $C_F = 0,5 \mu g/ml$ solo L-395-1 parece ser útil para dañar las células.

Los resultados de los ensayos de MTT para diferentes longitudes de onda de luz y C_F representados como curvas de la absorbancia relativa (fracción de células supervivientes) en función del tiempo, se asemeja a las funciones de decaimiento exponencial. Por lo tanto, basado en el modelo de irradiación lineal cuadrático [266], los datos experimentales se ajustaron para cuantificar el efecto fotodinámico de las diferentes longitudes de onda, empleando la siguiente ecuación que considera la parte exponencial del modelo:

$$S = \exp^{\alpha T_I} \quad (3.4)$$

Donde, S , es la fracción de células supervivientes; α es una constante y T_I es el tiempo de iluminación. El término en la exponencial es una indicación de la dosis fotodinámica $D = \alpha T_I$. Mediante la ecuación 3.4, se obtuvieron valores de α de $4,4 \text{ min}^{-1}$; $0,49 \text{ min}^{-1}$; $0,96 \text{ min}^{-1}$ y 5 min^{-1} para 660, 635, 460 y 395 *nm*, respectivamente.

Los espectros de absorción y fluorescencia del m-THPC unido a las células (Figura 77) se obtuvieron de una suspensión celular de HeLa de 10^5 células/*ml* en PBS. Estas células se incubaron previamente en una botella de cultivo T-25 con una solución de $2 \mu g/ml$ de m-THPC en medio RPMI durante 24 *h*, y después de lavar tres veces con PBS helado, se rasparon con un raspador Falcon. El espectro de absorción del m-THPC también fue obtenido, tanto de una solución en PBS, como de una solución en metanol (Figura 77).

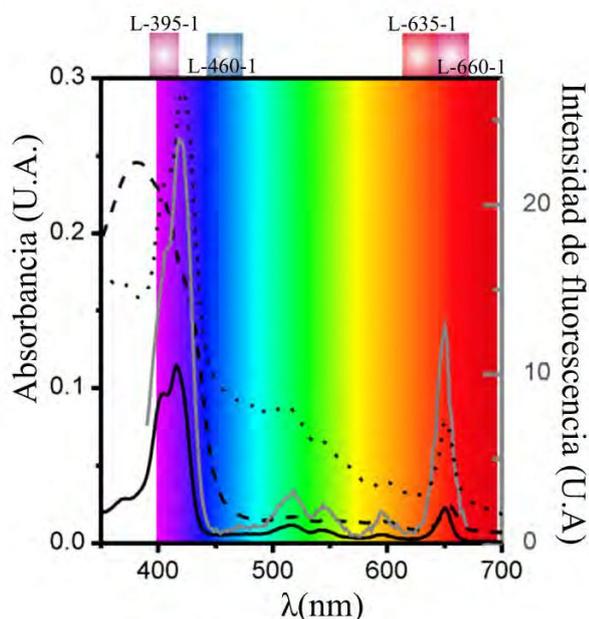


Figura 77. Espectros de absorción del m-THPC en PBS a $4 \mu\text{g/ml}$ (línea negra discontinua), en metanol a $4 \mu\text{g/ml}$ (línea negra continua) y unido a las células HeLa (línea negra punteada) superpuestas con el espectro de luz visible. También, se incluye el espectro de fluorescencia de emisión-excitación para el m-THPC unido a las células HeLa (línea gris punteada). Los diferentes rangos de emisión de las luces LED empleadas en los experimentos se indican con cajas de colores.

Tanto en la región del espectro correspondiente al violeta como al rojo, las bandas de absorción están presentes para los fotosensibilizadores más comunes utilizados en TFD. El hecho de que la banda de absorción en la región del violeta sea mayor, es un hecho importante para posibles aplicaciones de luz violeta en el tratamiento de casos tempranos de carcinoma cervicouterinos. En estos casos, la luz debe ser capaz de atravesar alrededor de $250 \mu\text{m}$ para alcanzar las células anormales del epitelio [264] [265]. Trabajos informan que el tratamiento con TFD es más efectivo empleando luz azul que luz roja en el rango de $635\text{-}660 \text{ nm}$ con ácido aminolevulínico o su derivado [267], Photofrin [268], o incluso *Fs* naturales [269]. Este hecho se explica por la mayor absorción del *Fs* debido a la banda Soret en comparación con las bandas presentes en la región del rojo, particularmente por el *Fs* disuelto en PBS. En nuestro trabajo, utilizamos m-THCP como *Fs*, y de acuerdo con los resultados de MTT, el espectro de absorción del m-THPC unido a las células sería más similar al del m-THCP en metanol. En consecuencia, la absorción a 660 nm (rojo) es mayor que a 460 nm (azul).

3.4.1. Cuantificación de muerte celular en cultivos celulares 2D: ensayo TUNEL

El ensayo TUNEL se empleó para detectar la muerte celular apoptótica para L-395-1 y L-660-1, $C_F = 0,5 \mu g/ml$ y diferentes T_I (4, 6 y 8 *min*). Para cada condición, se visualizaron muestras luego de transcurrido 1 y 3 *h* después de la iluminación. Lamentablemente, la observación a tiempos más prolongados no fue posible debido al desprendimiento de las células después de la TFD.

Los datos indican que para ambas fuentes LED, la fracción (o índice) celular apoptótica aumenta independientemente del tiempo de observación después de la iluminación, ya sea 1 o 3 *h* . Para un mismo T_I , la fracción de células apoptóticas es mayor para cultivos celulares iluminados con L-395-1 en comparación con L-660-1, independientemente del tiempo de observación (1 o 3 *h* postiluminación). Para luz de 395 *nm*, la fracción porcentual de células apoptóticas detectadas por TUNEL, 1 *h* después de la iluminación, aumenta de aproximadamente 5 % a 10 %, y a 55 % para T_I de 4, 6 y 8 *min*, respectivamente. Por el contrario, para L-660-1 y 1 *h* después de la iluminación, la fracción de células muertas permanecen constantes y cercanas a 5 % tanto para $T_I = 4 \text{ min}$ como para $T_I = 6 \text{ min}$. Después, el índice apoptótico aumenta hasta aproximadamente 30 % para un T_I mayor. Por otro lado, cuando se observaron cultivos 3 *h* después del tratamiento, la fracción de las células apoptóticas para L-395-1 toman valores que van de aproximadamente 10 % para $T_I = 4 \text{ min}$ a 20 %, para $T_I = 6 \text{ min}$ y 80 % para $T_I = 8 \text{ min}$. En el caso de L-660-1 la fracción de células apoptóticas es aproximadamente la mitad de lo obtenido para L-395-1 (Figura 78).

Mediante el análisis estadístico de varianzas (ANOVA), se obtuvo información adicional mediante la comparación de la media de los datos de células apoptóticas informadas para los diferentes T_I para cada longitud de onda de iluminación y cuantificando las células apoptóticas en 1 *h* o 3 *h* después del tratamiento. Se empleó la prueba de LSD (por sus siglas en inglés, least significant difference) de Fisher con $p < 0,05$. El asterisco en la figura 78 representa diferencia significativa entre el $T_I = 8 \text{ min}$ de L-395-1 y L-660-1, tanto para la condición de 1 *h* y como la de 3 *h*, luego del tratamiento.

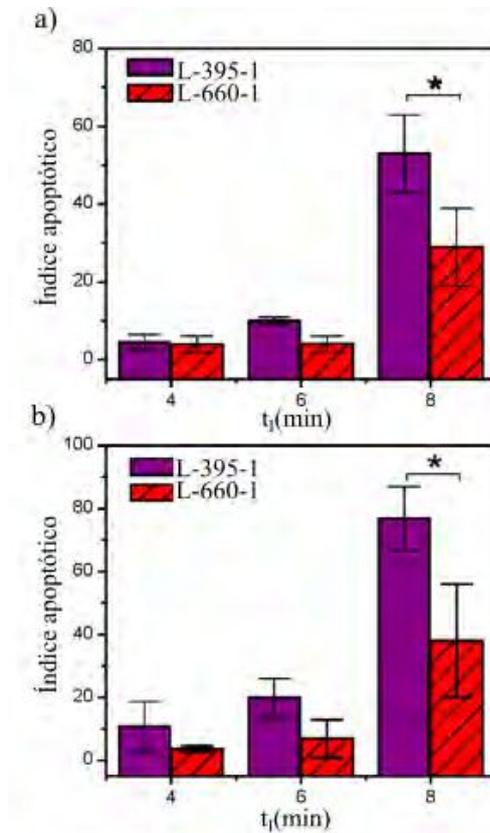


Figura 78. Ensayo TUNEL para cultivos de células HeLa observados a) 1 h; b) 3 h después de la iluminación con luz proveniente del L-395-1 para $T_I = 4 \text{ min}$, $T_I = 6 \text{ min}$ y $T_I = 8 \text{ min}$ y luz proveniente de L-660-1 para $T_I = 4 \text{ min}$, $T_I = 6 \text{ min}$ y $T_I = 8 \text{ min}$. Los experimentos se realizaron con $C_F = 0,5 \mu\text{g/ml}$.

En generales, los resultados indican que el aumento en la proporción de células apoptóticas después de TFD con el aumento de T_I se correlaciona con los datos MTT, independientemente de la longitud de onda de la luz de iluminación. Por lo tanto, se espera que ambas longitudes de onda de luz LED induzcan el mismo tipo de muerte celular, al menos dentro de nuestros errores experimentales. Este último dependerá de varios factores como se revisó en otras investigaciones [270].

3.4.2. Muerte celular inducida en esferoides de células HeLa luego de la TFD

Realizamos experimentos de TFD empleando esferoides para estudiar las diferencias entre distintas longitudes de onda en un modelo tridimensional, que representa más fehacientemente el entorno celular real. Los esferoides celulares preparados, como se describe en la sección experimental, se transfirieron a un Placa de Petri con medio de crecimiento RPMI al 10 % y se dejó durante la noche para lograr la adhesión al fondo de las placas de Petri. Luego se incubaron con el Fs en medio de mantenimiento y se iluminaron con L-395-1 y L660-1 a diferentes T_I .

Además, se analizó la dinámica de colonias 2D y 3D generadas por esferoides, esto es, la medición de la evolución del radio promedio de la interfaz de la región 2D para obtener información complementaria sobre el resultado del tratamiento mediante TFD. Además, los esferoides se utilizaron para describir semicuantitativamente la dosis durante TFD (Figura 79). La penetración del Fs en el esferoide de células HeLa 3D se midió mediante microscopía de fluorescencia después de la incubación con $1 \mu g/ml$ de m-THCP durante 24 h . Se observó la fluorescencia del m-THCP con una mayor concentración en el borde del esferoide, lo cual puede inferirse del patrón de fluorescencia, en concordancia con los resultados informados recientemente por otros autores [271]. Para las condiciones empleadas en nuestro trabajo, se puede ver una gran fluorescencia roja incluso dentro del esferoide. Esta observación permite concluir que la concentración de m-THCP no es un factor limitante.

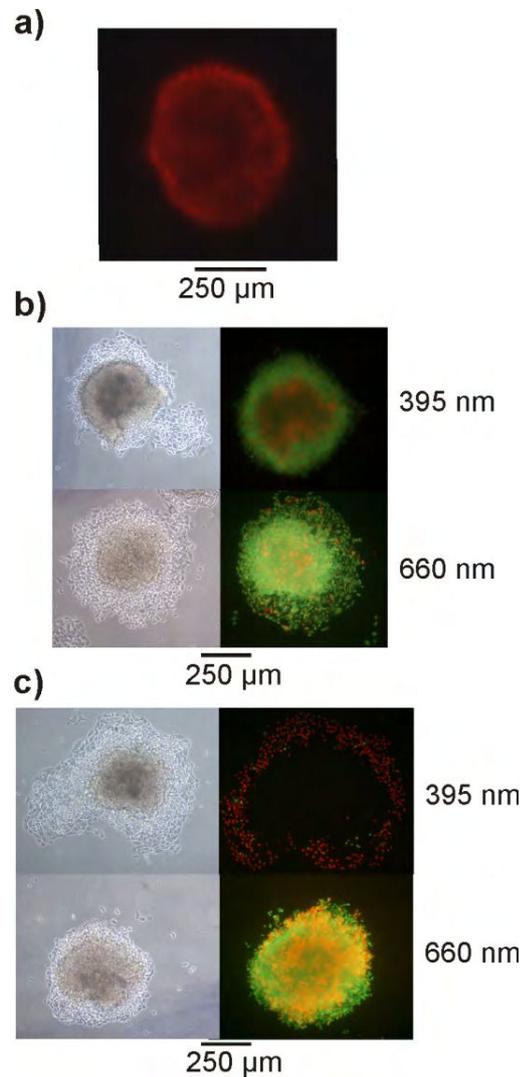


Figura 79. Esferoides de células HeLa incubadas durante 24 *h* con $C_f = 1 \mu\text{g/ml}$: a) fluorescencia típica del m-THCP en esferoides celulares antes de la iluminación. Fluorescencia típica del m-THCP en esferoides celulares después de la iluminación con L-395-1 y L-660-1: b) durante 2 *min* y c) durante 12 *min*. Izquierda: imágenes de contraste de fase de esferoides antes de incorporada la droga. Derecha: imágenes de fluorescencia coloreadas con NA/IP 24 *h* después de la iluminación.

Se visualizó la fluorescencia con Naranja de Acridina (NA) e Ioduro de Propidio (IP) para evaluar la muerte celular después de aplicar TFD con diferentes condiciones. La tinción verde indica células vivas y las células teñidas de rojo son indicativas de células muertas. Por lo tanto, la viabilidad celular fue significativamente inferior, 24 *h* después de la iluminación, en esferoides tratados con L-395-1 en comparación con L-660-1 para la misma concentración

de F_s de $C_F = 1 \mu g/ml$ y T_I de 2 y 12 *min*.

Además, se observa una diferencia significativa en el patrón de colonias después del tratamiento de esferoides con las diferentes fuentes de luz.

Para $T_I = 2 \text{ min}$ la fracción de células teñidas con NA, ubicado principalmente en el centro de los esferoides, es significativamente más grande después de la iluminación con L-395-1 en comparación con el cultivo tratado con L-660-1. Por otra parte, el anillo 2D se observa poco después de la iluminación con L-395-1. Para $T_I = 12 \text{ min}$, la comparación de las imágenes por contraste de fase y las imágenes de fluorescencia de cultivos 24 *h* después de la iluminación con L-395-1 indica que todas las células de los esferoides se eliminaron (núcleo de colonia 3D). Además, el anillo bidimensional de células vivas antes de la iluminación, desaparecen (para L-660-1) o aparecen en estado necrótico después del tratamiento con TFD (L-395-1). Los resultados presentados en esta subsección son consistentes con la figura de viabilidad MTT y ensayos TUNEL de monocapas de células HeLa, sugiriendo un resultado TFD más efectivo para L-395-1.

3.4.3. Esferoides celulares: dinámica de colonias en la evaluación del tratamiento de TFD

Se informó la dinámica de las regiones 2D y 3D de colonias cuasicelulares circulares originadas por esferoides celulares [272] para inferir sobre el proceso de la expansión de colonias de gran tamaño. Otros autores, mostraron que el crecimiento de la colonia celular es útil para inferir acerca de procesos patológicos en el organismo en el que están involucradas esas células [273]. Aquí, empleando L-395-1 o L-660-1, comparamos el efecto de TFD siguiendo el crecimiento de las regiones 2D y 3D de las colonias.

Después de su adhesión, los esferoides celulares se incubaron con el F_s en concentración $C_F = 2 \mu g/ml$ durante 24 *h* antes del tratamiento TFD con la luz LED deseada. El seguimiento de las colonias comenzó (t_0) aproximadamente 12 *h* después de la adhesión del esferoide al fondo de la placa de Petri. Así, en la mayoría de los casos, las colonias estaban formadas por un núcleo central de aglomerado celular 3D y una región anular de 1 - 4 células de espesor de crecimiento 2D (Figura 80). Por otro lado, se obtuvieron imágenes del patrón de colonias 12*h* después de la adhesión del agregado celular, inmediatamente después de la iluminación, a 2, 5 y 9 *h* después de la iluminación y diariamente durante aproximadamente una semana (Figura 81).

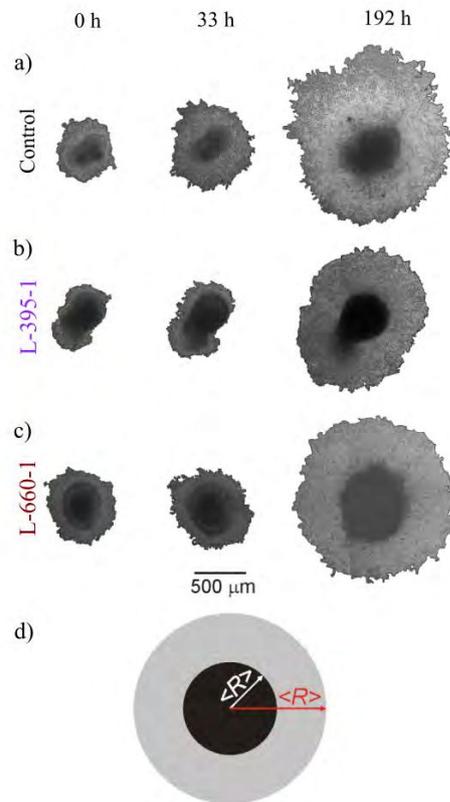


Figura 80. Imágenes de contraste de fase de la evolución de los patrones de colonias de células HeLa de un cultivo a) no tratado; b) incubado durante 24 h con $C_F = 2 \mu\text{g/ml}$ e iluminado durante $T_I = 8 \text{ min}$ con L-660-1; c) con L-395-1; d) esquema geométrico.

Los resultados de los cultivos no tratados (sin incubación con el F_s y sin iluminación) estuvieron de acuerdo con los obtenidos previamente para diferentes líneas celulares [274]. El radio promedio de la colonia de células 2D sigue una relación lineal con el tiempo de crecimiento.

Los resultados de la expansión de colonias 2D para regiones iluminadas y no tratadas se muestran en la figura 81. Antes de la iluminación, el radio promedio de la colonia aumenta con el tiempo, 2 h después de la iluminación, la velocidad de expansión del crecimiento de la colonia se vuelve negativa. Posteriormente, la velocidad de expansión alcanza un valor mínimo a las 30-50 h, y luego aumenta. Los cultivos tratados con L-395-1 exhibieron una disminución más notable en el radio promedio de la colonia en comparación con cultivos iluminados con L-660-1. Además, para L-395-1 el aumento de la velocidad de desplazamiento después del régimen de radio constante disminuyen con el tiempo. Este hecho está ausente en cultivos no tratados y en aquellos iluminados con L-660-1.

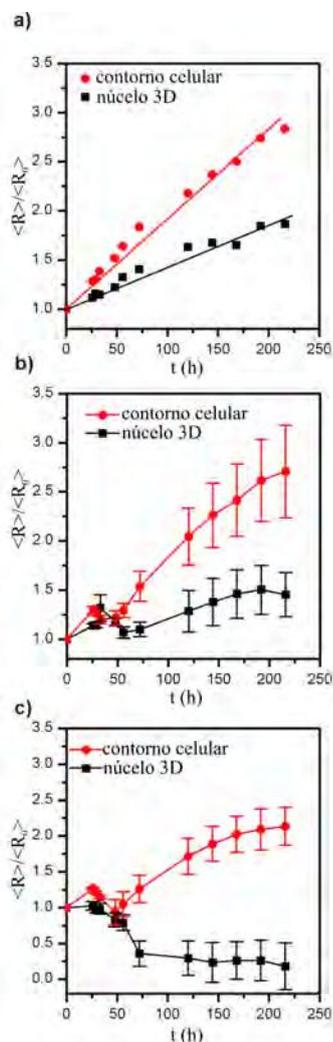


Figura 81. Dinámica de las regiones 2D y 3D de colonias de células HeLa :
a) esferoides no tratados (sin droga y sin iluminación); b) esferoides incubados durante 24 h con m-THCP a $C_F = 2 \mu\text{g/ml}$ y se iluminaron durante $T_I = 8 \text{ min}$ con L-660-1; c) esferoides incubados durante 24 h con m-THCP a $C_F = 2 \mu\text{g/ml}$ y se iluminaron durante $T_I = 8 \text{ min}$ con L-395-1.

La evolución del dominio 3D de las colonias se evaluó siguiendo el radio promedio de los contornos trazados a mano después de establecer el nivel de contraste de imagen apropiado. Los resultados indican un similar comportamiento al obtenido para regiones anulares 2D de cultivo no tratados y tratados con TFD, aunque se pueden señalar algunas características distintas. El radio promedio de la zona central 3D 2 h después de la iluminación presenta un aumento, en el caso de cultivos iluminados con L-660-1, y una disminución relativamente pequeña para cultivos iluminados con L-395-1.

Este comportamiento contrasta con el del radio promedio de la región de colonias 2D. En este último, el radio promedio disminuye casi inmediatamente después de la iluminación. Vale la pena señalar que el aumento observado para los dominios de colonias 3D está ausente en el caso de los esferoides no tratados.

Estos resultados están de acuerdo con la penetración más profunda de la L-660-1 en comparación con la de L-395-1, el primero logra un resultado del tratamiento TFD más efectivo en las células de las capas más profundas, produciendo una mayor cantidad de células muertas que irían al agregado 3D, permaneciendo transitoriamente allí, aumentando el radio promedio.

3.4.4. Esferoides celulares: imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia en esferoides celulares luego del tratamiento de TFD

Las imágenes confocales de fluorescencia de células teñidas con NA e IP en cúmulos de células HeLa, muestran el efecto de la TFD. Los resultados obtenidos para los esferoides no tratados comparados con los esferoides incubados con $2 \mu\text{g/ml}$ m-THCP durante $3 h$, e iluminados con L-395-1 durante $T_I = 4 \text{ min}$ y, observados a las $3-5 h$ después de la iluminación (Figura 82). Este tiempo de observación es apropiado ya que los datos obtenidos de la dinámica de las colonias presentados en la sección anterior indican que no se observan cambios significativos en el patrón de las colonias celulares.

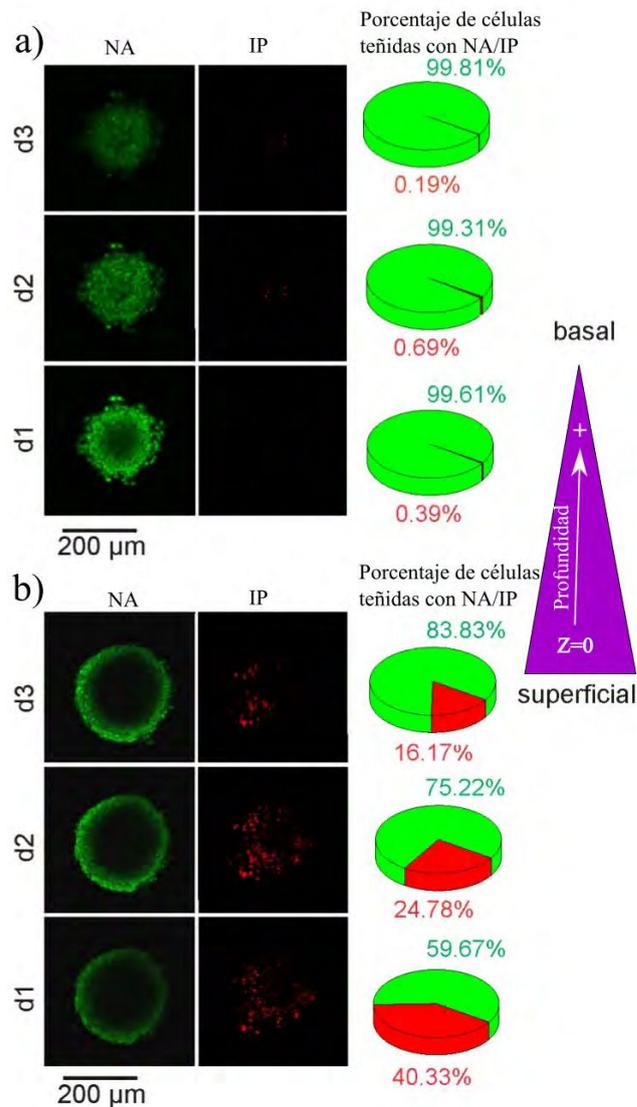


Figura 82. Imágenes de fluorescencia para la tinción de NA/IP de esferoides de células HeLa. En la columna izquierda: tinción de NA en esferoide a) no tratado; b) tratado con TFD con L-395-1. Columna central: tinción de IP en esferoide a) no tratado; b) tratado con TFD con L-395-1. Columna derecha: gráficos de torta del porcentaje relativo de tinción de NA/IP de los esferoides a) no tratados; b) tratados con TFD con L-395-1. Las imágenes fueron tomadas de cultivos 3 h después de la iluminación con $T_I = 4 \text{ min}$ y previamente incubados con $2 \mu\text{g/ml}$ de m-THCP durante 3 h. Las imágenes fueron tomadas a las profundidades de $d1 = 20$, $d2 = 50$ y $d3 = 100 \mu\text{m}$. La barra de escala y la profundidad creciente en los esferoides, así como el gradiente de intensidad de luz se indican en la figura.

La tinción de NA/IP de un esferoide no tratado y tratado con TFD muestra

una fluorescencia verde proveniente de células vivas con una región interna más bien oscura y rojo en regiones resaltadas (teñidas con IP) cerca del centro del esferoide que están principalmente compuesto de células muertas. Para el esferoide no tratado, la cantidad de células muertas es muy pequeña y solo se pueden ver unas pocas células ubicadas en regiones internas teñidas con IP. Este hecho se distingue más claramente de las gráficas de torta presentadas en la figura 67c y f. Para los esferoides de células HeLa tratados con L-395-1, el efecto de la TFD, cuantificado como la cantidad de las células teñidas con IP, se puede distinguir de las imágenes de fluorescencia y de las células de las capas más externas que están resaltadas en verde brillante (teñidas con NA) y que consisten de células proliferativas.

Después de la iluminación, este patrón de tinción puede parecer contradictorio, pero puede entenderse considerando los datos dinámicos de las colonias celulares que indican una reorganización que implica la transferencia de células dañadas desde el plano basal a las regiones 3D. Posteriormente, las células muertas en la periferia se separarían del esferoide.

Estos resultados sugieren que los experimentos de TFD con esferoides se pueden utilizar para evaluar la extensión del tratamiento TFD en relación, principalmente, con la concentración del F_s y la cantidad de luz depositada en diferentes secciones de la muestra.

Tenemos la intención de avanzar una correlación semicuantitativa entre estos factores y el resultado de la TFD en diferentes secciones del esferoide. Se necesitarían más datos y análisis adicionales para establecer este tipo de experimento como modelos para mejorar estrategias para aplicaciones de TFD. Los datos de un conjunto de cinco esferoides similares para cada condición, es decir, tratados con L-395-1 o con L-660-1, se representan como la fracción de células teñidas con NA/IP como una función de la profundidad, medida desde el ápice del esferoide hasta el plano basal (Figura 83). La tendencia mencionada se confirma aunque el análisis de cada sección implica un gran error de medición. A pesar de este inconveniente, se puede ver que la iluminación con L-395-1 induce una fracción mayor de células muertas teñidas con IP que la iluminación con L-660-1. El efecto de la TFD de ambas fuentes de luz disminuye con la distancia desde el ápice del esferoide, aunque esta tendencia (comparable a la ecuación 1.17) es más pronunciada para L-395-1. En planos más profundos, el efecto de la TFD de la L-395-1 es similar o tiende a ser incluso más pequeño que el de la L-660-1. La proporción de células HeLa sobrevivientes, obtenida de la proporción de células muertas, en cada sección a lo largo del grosor del esferoide, disminuyen desde el ápice del esferoide hasta su plano basal.

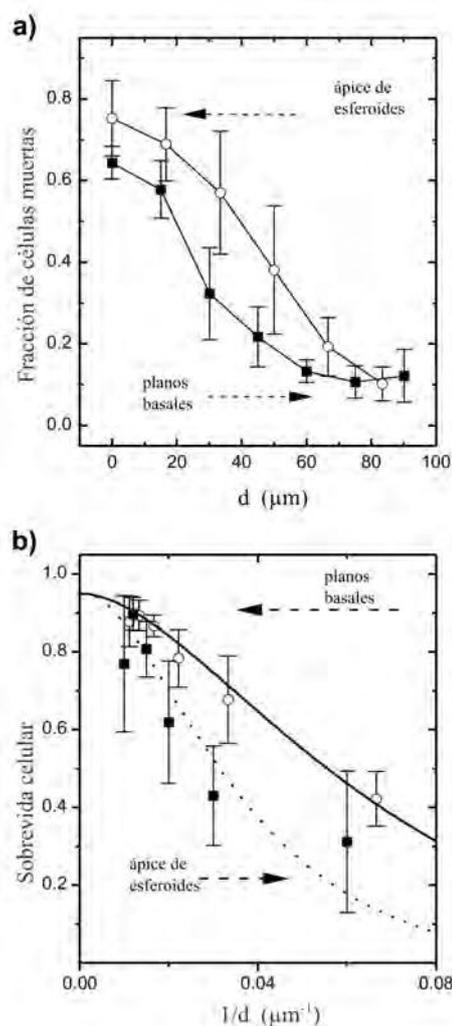


Figura 83. Efecto del tratamiento con TFD en diferentes planos de esferoides de células HeLa determinados a partir de tinción con NA/IP de imágenes de fluorescencia confocal a) fracción de células muertas en función de la profundidad medida desde el ápice de esferoides iluminados durante 8 *min* con L-660-1 (cuadrados negros) y L-395-1 (círculos abiertos); b) fracción promedio de células que sobreviven en función de $1/d$ (la fluencia disminuye al ir desde el ápice del esferoide al plano basal). El error estándar se incluye para $n=5$. Los esferoides se incubaron con $2 \mu\text{g/ml}$ de m-THCP durante 3 *h* antes del tratamiento con TFD.

La mayor fracción de células muertas observadas para L-395-1 se debe al mayor coeficiente de absorción del m-THCP, particularmente en planos cer-

ca del ápice donde la atenuación es menor. La representación de la fracción de supervivencia de las células en función de $1/d$ exhibe una forma similar a la reportada en la literatura para estudios que emplean la suspensión de Células MLL [275]. En el presente trabajo, la fluencia se ve afectada por la penetración de la luz a través del esferoide. En consecuencia, la dosis fotodinámica aumentaría con la fluencia después de una dependencia logarítmica, y la atenuación, una exponencial decreciente, con la distancia. Por lo tanto, una descripción aproximada de la fracción de supervivencia de las células con la fluencia podría darse empleando una ecuación similar a la ecuación de la referencia [275]:

$$FS = 1 - (1 - exp - D/D_0)^u \quad (3.5)$$

Siendo D/D_0 la fracción de dosis de TFD, en este caso relacionada con la fluencia relativa llegando a cada sección del esferoide celular, y u una constante relacionada con el hombro de la curva de supervivencia. Aunque no podemos medir la dosis de TFD, la ecuación anterior se usa para cuantificar las diferencias entre las luces L-660-1 y L-395-1. Se observa una coincidencia razonable (trazos sólidos y punteados en la figura) entre datos experimentales y la expresión teórica. Los datos serían dispersados principalmente por la influencia del FS heterogéneamente distribuido, en particular, si los datos se consideran en la periferia del esferoide. A pesar de este inconveniente, el ajuste de curvas trazadas permite confirmar las diferencias entre las fuentes de LED empleadas en el presente trabajo.

La variación de fluencia es mayor para L-395-1 comparada con L-660-1, por lo tanto, los resultados según la ecuación anterior arroja valores más pequeños para el primero que para el segundo. Recientemente, estudios destacan que la utilización de modelos 3D para estudiar la dosis fotodinámica representa una alternativa valiosa en lugar de los modelos animales.

Además, varios autores propusieron modelos para la cuantificación de la dosis de TFD y para inferir resultado en diferentes sistemas multicelulares, incluida la suspensión de células y esferoides.

Incorporan la medición experimental de fluorescencia durante el tratamiento, así como también el fotoblanqueo del FS y la determinación de oxígeno singulete que se usa como medida de la dosis.

Volviendo al objetivo principal del presente trabajo relacionado con el tratamiento mediante la TFD para mujeres con CIN 1/2, se informaron estudios realizados con la administración intravaginal de hexaminolevulinato y luz roja de un dispositivo LED [276]. Los autores concluyen que la TFD parece ser prometedora en el tratamiento de mujeres con CIN clínicamente relevante de infecciones persistentes oncogénicas por VPH. Comparando la eficiencia de la TFD a base de ácido aminolevulínico con luz violeta con respecto a la luz roja

en el tratamiento de enfermedades dermatológicas como la queratosis actínica, enfermedad de Bowen y carcinoma basocelular [277], la primera mostró una mejor respuesta. Y en el caso de melanomas, la combinación de luz de longitud de onda de 420 nm y luz roja mejorarían resultados en la TFD [278]. Recientemente, propusieron un dispositivo miniaturizado fotónico inalámbrico implantable para la entrega de luz violeta y roja para aplicaciones TFD [279], ampliando el posibilidades de este enfoque no invasivo con luz violeta. Los resultados presentados en nuestro trabajo pretende contribuir a expandir la TFD con luz violeta en tratamientos de CIN 1/2.

3.4.5. Transmisión de luz en cúmulos de células HeLa

Para caracterizar la cantidad de luz a través de los cúmulos, se llevaron a cabo experiencias *in vitro* de transmisión de luz. Para ello, se utilizó el esquema descrito en la sección de materiales y métodos (Figura 37b), comparando la emisión de luz de las fuentes L-660-1 y L-395-1 a través de un mismo espesor de cúmulo (cuadro 3.6.).

λ (nm)	I_V (nm)	I_C	$\frac{I_C}{I_V}$	$\mu(450)$
660	$81,44 \pm 2,13$	$43,8 \pm 12,3$	0,538	13,78
395	$45 \pm 0,1$	$6,72 \pm 3,35$	0,149	42,3

Cuadro 3.6: Valores medidos de intensidad de luz a través de un cúmulo. Promedio de 10 mediciones, tanto para L-660-1 como para L-395-1.

Los resultados del experimento de transmisión indican que para la longitud de onda de 395 nm la luz transmitida es aproximadamente tres veces menor que la de la luz de 660 nm . Un hecho que está de acuerdo con la disminución más lenta en la supervivencia de las células para la luz LED de 395 nm en comparación con la obtenida para 660 nm .

3.5. Vinculación con la práctica clínica

La terapia con LED representa una herramienta emergente y más segura para el tratamiento de muchas afecciones. En general, el uso de luz sola o combinada con fotosensibilizadores exógenos, puede estimular fibroblastos, linfocitos, queratinocitos y melanocitos [298] y proliferación de macrófagos [299][300]. Otros efectos observados incluyen la modulación de la oxidación celular [283], efectos antiinflamatorios [284], estimulación de angiogénesis y flujo sanguíneo[293], la inducción de factores de transcripción [294], actividad antibacteriana[295] y la alteración de la síntesis de colágeno [296]. A pesar de su creciente eficacia y uso en la práctica médica, el conocimiento sobre la terapia con LED sigue siendo limitado. Los estudios publicados a menudo se dirigieron a un pequeño número de pacientes y son difíciles de comparar entre sí debido a la diversidad en los parámetros utilizados. Por lo tanto, la longitud de onda de iluminación, la densidad de potencia y el tiempo de tratamiento pueden influir en los resultados clínicos. Por ejemplo, un aspecto de la aplicación de la TFD, es la aplicación de la luz, en el tejido patológico, y diferentes dispositivos de diversos fabricantes, pueden presentar diferencias en las características de la luz y densidad de potencia. El hecho que la TFD implica la interacción de la luz y el fotosensibilizador en presencia de oxígeno, la medida de la dosificación del tratamiento requiere de más estudio[297]. En esta sección de la presente tesis describimos algunos usos para las lámparas LED desarrolladas:

- Detección de la protoporfirina IX mediante la medida de la autofluorescencia de la región afectada.
- Diagnóstico Fotodinámico (DFD): la administración de fotosensibilizadores en baja concentración y la iluminación en un periodo corto de tiempo se utiliza para distinguir, mediante fluorescencia, zonas patológicas, que son imperceptibles sin el análisis asistido.
- Terapia fotodinámica *in vitro*, *in vivo* (discutido en las secciones anteriores) y en situaciones clínicas. Entre ellas, orientadas al tratamiento de lesiones en cérvix.
- También se describe el uso de la termografía para detectar la región afectada por el tejido neoplásico.

3.5.1. Autofluorescencia natural, caso 1

Es el caso de un paciente con cáncer de piel no melanoma quien recibió tratamiento de TFD utilizando ALA como F_s y la fuente de iluminación

l-652. Las imágenes de la figura 84, corresponden a la autofluorescencia con lámpara L-395-12 con orientación paralela, de una región en la cabeza antes y después de la TFD. El paciente presenta en la cabeza, manchas de tejido patológico. Es de esperar un mayor contenido de protoporfirina IX en ellas, y por ende ante la excitación con luz violeta, una fluorescencia apreciable en la región de las longitudes de onda del rojo (Ver espectro de fluorescencia de la PpIX del apéndice 5.5).

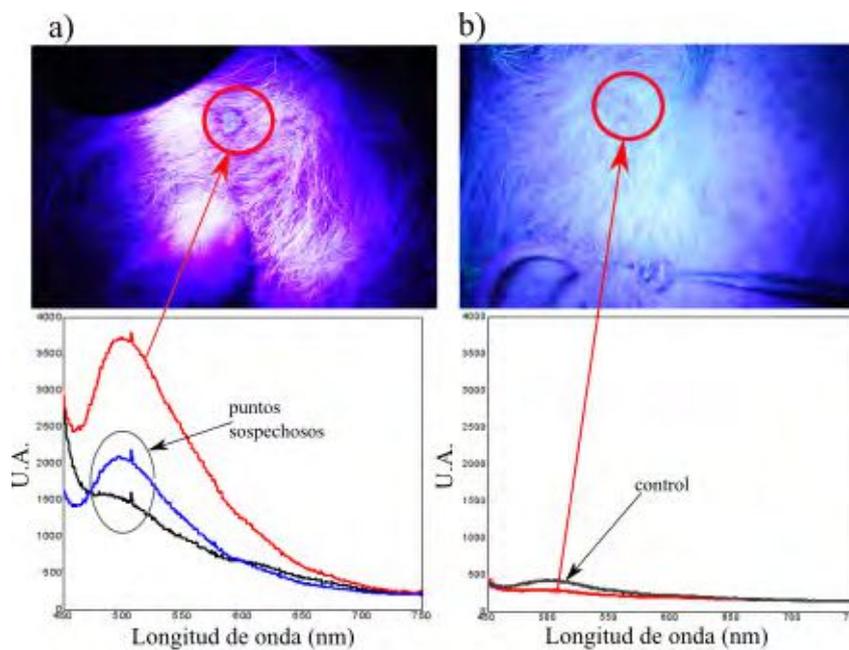


Figura 84. Autofluorescencia con lámpara L-395-12 con orientación paralela en paciente con cáncer de piel no melanoma: a) antes de la TFD; b) después de la TFD y los respectivos espectros obtenidos mediante fluorimetría del área delimitada con un círculo rojo. También, con esta técnica, se muestran otros puntos sospechosos antes de la TFD, así como también, una zona zona libre de lesión después del tratamiento.

En las figuras 84a (antes de la TFD) aparece una escara en el mismo lugar que en la figura 84b (después de la TFD) no aparece. Además de la observación visual de la autofluorescencia, realizamos determinaciones de la emisión, empleando un espectrofotómetro. Para tal fin se propuso incrementar la intensidad de la luz de excitación para obtener una mayor señal de emisión. Se utilizó la lámpara L-395-12 con cuatro LEDs provistos de lentes orientadas en forma convergente. En la figura 85 se compara con la misma con lentes orientadas en forma paralela.

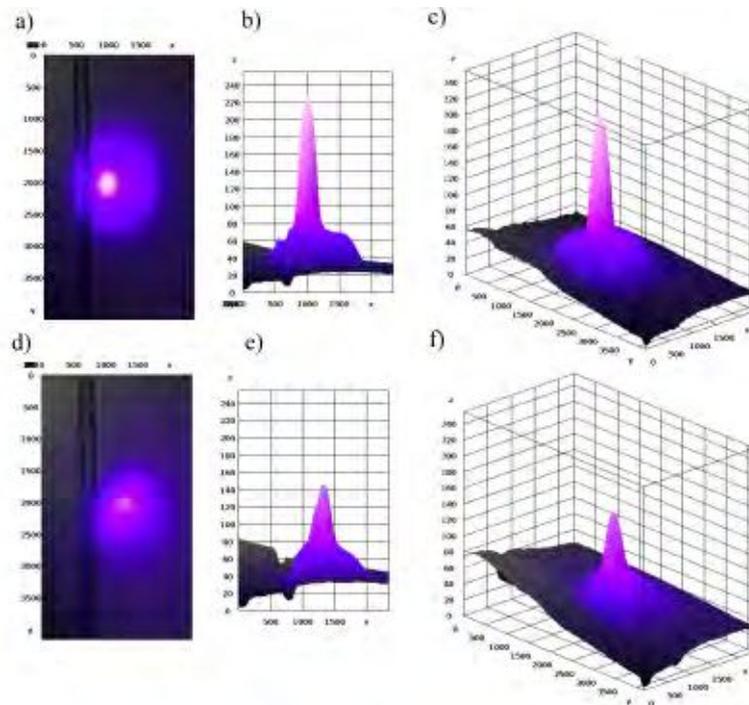


Figura 85. Intensidad de la fuente L-395-12: a) imagen a 15 cm de distancia en modo paralelo; b) vista lateral de la intensidad del color de la imagen de (a); c) gráfica 3D de la intensidad de color de la imagen (a); d) imagen a 15 cm de distancia en modo convergente; e) vista lateral de la intensidad del color de la imagen de (d); f) gráfica 3D de la intensidad de color de la imagen (d).

De las gráficas anteriores (Figura 85 a-f), puede apreciarse la mayor intensidad correspondiente a la orientación convergente de las lentes de la fuente L-395-12.

Utilización de filtros

Debido a que la observación ocular de la región afectada puede dificultarse debido a la dispersión de la luz de excitación, se ensayó la utilización de un filtro rojo de la figura 86, para solucionar este inconveniente, mejorando la sensibilidad de la técnica.



Figura 86. Filtro rojo escalón que transmite a partir de 600 nm.

En las imágenes de la figura 87 corresponden a fotografías luego del tratamiento, con lo cual, si hubiese presencia de PpIX, el uso del filtro rojo, permitiría la visualización específica en la región de interés.

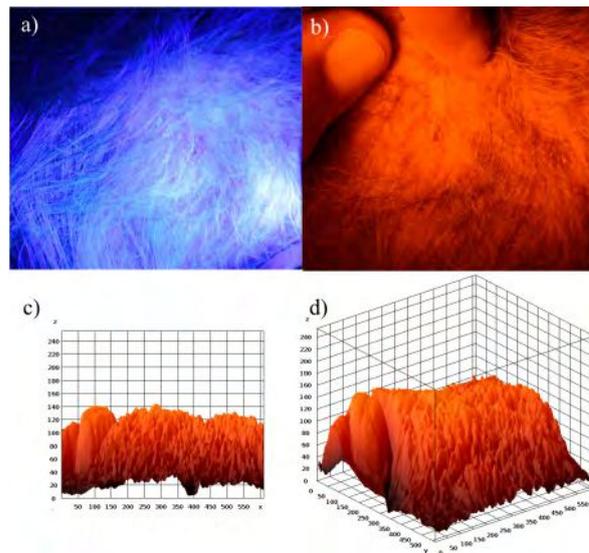


Figura 87. Autofluorescencia con L-395-12 con orientación paralela en paciente con cáncer de piel no melanoma luego del tratamiento: a) sin el filtro rojo; b) con el filtro rojo; c) vista lateral de la intensidad del color de la imagen de (b); d) gráfica 3D de la intensidad de color de la imagen de (b).

En este caso, no tiene zonas con color rojo intensas y resulta similar al caso de un lunar de una persona sana que se muestra seguidamente. En otro paciente, se visualizó un lunar voluminoso en 10 *cm* del esternón y del vértice del hombro izquierdo, aproximadamente.

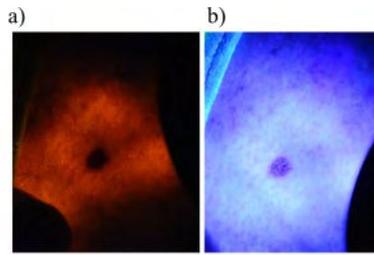


Figura 88. Autofluorescencia con L-395-12 con orientación convergente en paciente con lunar a) usando el filtro rojo; b) sin filtro rojo.

De las imágenes de autofluorescencia de la figura 88 aparece una depresión en la región donde está localizado el lunar, y no se muestra presencia de PpIX.

3.5.2. Diagnóstico Fotodinámico (DFD) y TFD, caso 3

La fluorescencia natural de ciertos tumores puede ser realizada mediante la administración de un *Fs*. Luego de su administración al paciente se le puede determinar la ubicación del tumor y delimitar su extensión observando la fluorescencia cuando es iluminado con luz violeta. Es también útil para encontrar lesiones extra-tumorales en áreas que aparecen como sanas. Además, usando un espectrómetro podemos inferir acerca de la concentración del *Fs* tanto en áreas sanas como tumorales antes y después del tratamiento de TFD. En este caso, se presenta un paciente con carcinoma de células escamosas *in situ* o SCC al que se le suministró el *Fs* ALA y al cabo de unas 3 horas se iluminó con luz de 395 nm de un LED de 1 W. Una vez identificada la extensión del área tumoral (realizado con color rojo), con tela negra se fabrica un recubrimiento que protege, durante la iluminación de tratamiento las zonas del tejido sano (Figura 89a). El tumor fue tratado mediante Terapia Fotodinámica con láser de 652 nm con una dosis de 20 J/cm². También se registró con el fluorómetro el cambio en la fluorescencia antes y después de la TFD en la zona tumoral, así como también, los espectros de fluorescencia en dos puntos ubicados en el tejido sano (Figura 89b). En una porción de la nariz (no realizada de color rojo) el paciente presenta previo tratamiento mediante escisión por bisturí.

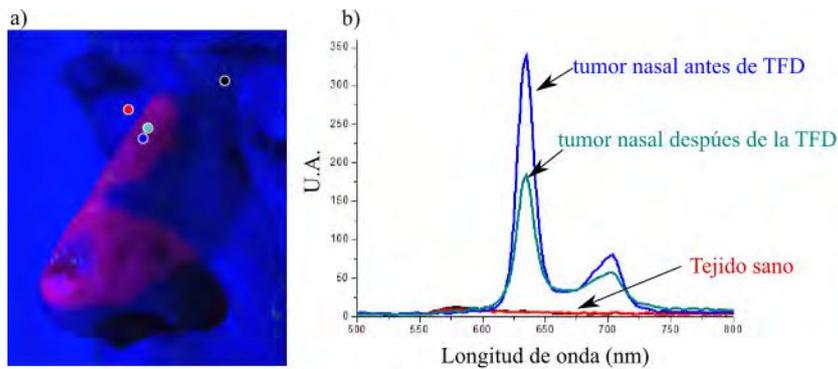


Figura 89. Paciente con carcinoma de células escamosas *in situ* o SCC en el área nasal: a)DFD antes de aplicar la TFD con láser de 652 nm; b)espectros obtenido mediante fluorimetría en los puntos marcados en (a).

La visualización mediante DFD, permite una identificación más precisa de la extensión de la actividad neoplásica. Además, el uso del fluorómetro muestra una disminución en la fluorescencia, y esto se corresponde con la efectividad de la TFD. Por lo tanto, se destaca la importancia de incorporar dicha medida como herramienta complementaria.

3.5.3. Autofluorescencia, termografía infrarroja y TFD, caso 4

En este caso, el paciente presenta un tumor en la parótida derecha e intenciones muy fuertes de preservar la funcionalidad de las cuerdas vocales, situación por la cual, no quiso someterse a una cirugía.

A través de la termografía infrarroja, se detectó la distribución de las zonas de alta vascularización de lesiones preneoplásicas y neoplásicas comparándolas con el tejido normal. La figura 90 corresponde al paciente antes de la TFD.

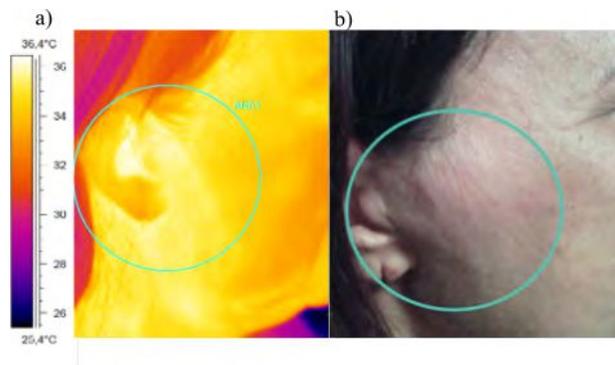


Figura 90. Paciente con tumor de parótida antes de la TFD: a)imagen mediante termografía infrarroja de la región tumoral; b)fotografía de la misma región analizada por termografía.

Mediante el análisis de las imágenes de termografía de la zona tumoral, se detectó una diferencia promedio de $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ entre el lado facial tumoral respecto al sano (Figura 91). Esto muestra la diferencia en la irrigación / perfusión sanguínea, que es de esperar que traiga aparejado un incremento en la concentración de protoporfirina IX en la región.

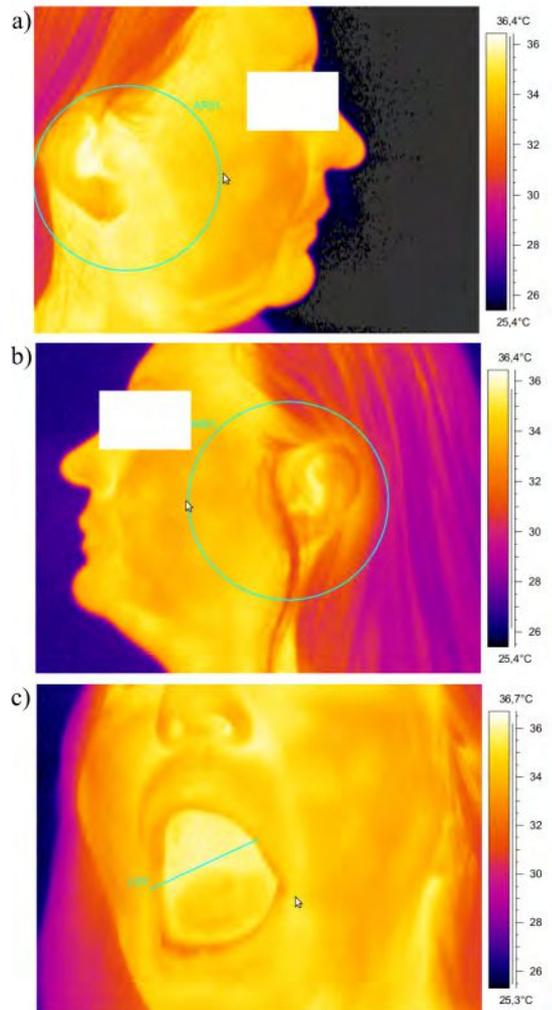


Figura 91. Termografías en distintas zona: a)tumor de parótida; b)lado facial sin tumor; c)cara interna.

Para corroborar la hipótesis anterior, se realizaron medidas de la autofluorescencia mediante el uso del fluorómetro de la figura 33a y, se realizaron varias medidas en distintos sitios, de acuerdo a lo indicado en la figura 92.

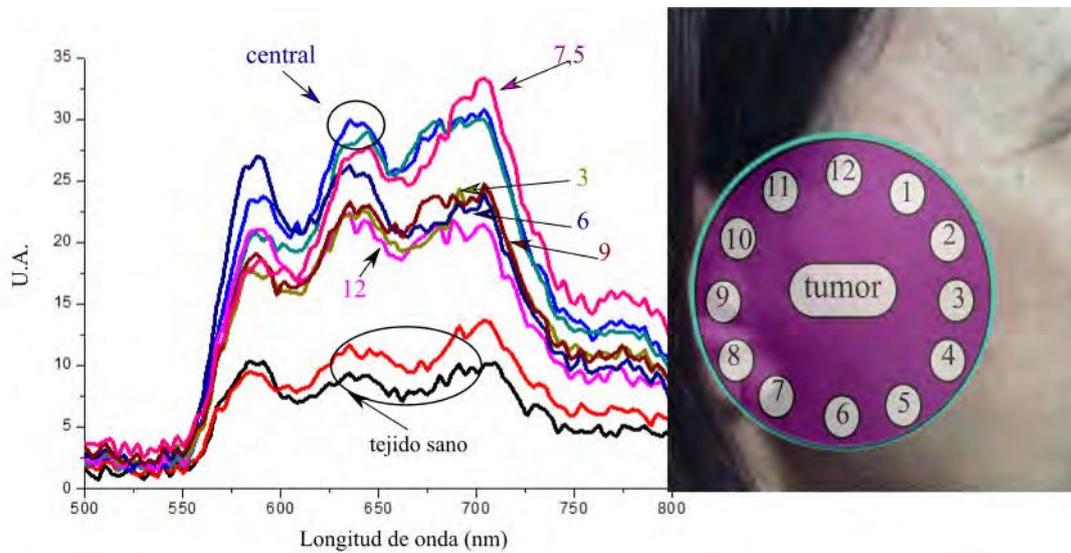


Figura 92. Espectros obtenidos en distintos puntos en tejido sano y tejido tumoral (indicado como central, 3 6 7,5 9 y 12)

Del registro de autofluorescencia, se verifica una diferencia entre los espectros obtenidos entre la zona tumoral y el tejido sano. La señal de 635 nm aproximadamente que, corresponde al espectro de emisión de la protoporfirina IX, es mayor en relación a los picos de 700 nm y 575 nm en comparación con el tejido sano.

Existe una heterogeneidad que se ve manifestada en la diferencia entre espectros, para cada zona, y el error asociado a la realización de la medida.

Luego, el paciente fue tratado mediante TFD utilizando ALA y láser de 652 nm (no mostrado aquí).

Los casos mostrados permiten destacar la importancia del uso de herramientas complementarias a la TFD que ayuden a una descripción del tejido tumoral, ya sea a través de la distribución de vasos sanguíneos o de la presencia de PpIX.

Capítulo 4

Conclusiones

Esta tesis apunta, no sólo a dar a conocer a la TFD, sino que también, a la mejora en los protocolos de aplicación y en la factibilidad del uso de fuentes LEDs debido a sus ventajas aplicativas como: portabilidad, seguridad, economía, fáciles de usar y mantener.

Se concluye que, las fuentes LED desarrolladas y caracterizadas, pueden fotoactivar, de forma análoga al láser de uso clínico, probado en ensayo en células y ratones. El área superpuesta entre los picos de excitación de las fuentes láser y no láser y la banda de absorción del *Fs*, está relacionada con la eficiencia de la fotoactivación y, por lo tanto, con el porcentaje de células muertas.

Mostramos la importancia de usar fluorescencia para monitorear la acumulación del *Fs* en el tejido afectado, aprovechando el “ efecto rebote ” para mejorar el resultados del tratamiento con TFD.

Utilizamos modelos tridimensionales como alternativa a los animales, para ensayar experimentos de TFD o combinado con otras estrategias. Es importante enfatizar que, si bien los resultados apoyan la utilización de la luz LED de 395 *nm* para tratar las primeras etapas de las enfermedades neoplásicas cervicales, se requiere un mayor número de experimentos para lograr una mejor descripción estadística, debido a factores como, la variabilidad de los esferoides, de las propiedades ópticas, las diferencias en los fenotipos celulares, la distribución heterogéneo del *Fs*, etc.

Por otro lado, se destaca la ventaja del DFD para realzar los límites tumorales. Mostramos que, la utilización de herramientas complementaria, como la termografía infrarroja y la autofluorescencia, perfeccionan la estrategia de aplicación en la práctica clínica de la TFD.

Además, con el objetivo de lograr un diagnóstico preventivo, que alcance masivamente a la población, tanto a través de costos adecuados y facilidad de implementación, se presentó un proyecto al concurso IDEAS-Exactas 2019 de UNLP para la construcción de un equipo de detección temprana de carcinomas, particularmente los producidos por el Virus del Papiloma Humano (VPH) en el cérvix, capaz de detectar la señal de fluorescencia proveniente de los cromóforos propios del tejido (autofluorescencia) o de fotosensibilizadores incorporados externamente y que se acumulan en la zona afectada del tejido.

Capítulo 5

Apéndice

5.1. Datos técnicos de la fibra óptica, FD1

El distribuidor de luz frontal FD1 produce un punto circular de luz con bordes definidos con una excepcional homogeneidad. Dichas propiedades lo hacen un dispositivo ideal para una iluminación precisa de una gran variedad de órganos tratados mediante TFD en humanos o animales (piel, cabeza y cuello, pulmones, etc). El patrón de luz uniforme también es adecuado para iluminar cultivos celulares o para ser usado como fuente de calibración de sensores de luz. Presenta un ángulo de apertura que resulta útil en el caso de pequeños espacios para iluminar el tumor, este es el caso de TFD endoscópicas. El distribuidor FD1 trabaja con longitudes de onda que van desde los 395 hasta los 800 nm , siendo adecuado para el uso de varios F_s . Para su desinfección deben usarse soluciones desinfectantes líquidas estándar como óxido de etileno (EtO, máximo $60^{\circ}C$).

Dimensiones mecánicas	FD1
Diámetro	2 mm
Largo	4 m
Características ópticas	
Transmisión*	> 80 %
Ángulo de divergencia	34,7 °C
Diámetro del haz a 0 mm de distancia	0,6 mm
Diámetro del haz a 10 mm de distancia	7,6 mm
Diámetro del haz a 20 mm de distancia	13,2 mm
Uniformidad	±10 %
Entrada láser	
Máxima potencia de entrada (en aire)	2,5 W
Rango de longitud de onda	400-800 nm
Fibra óptica	
Material de la fibra	SILICA, bajo OH^-
Diámetro del núcleo	600 μm
Apertura numérica	0,37
Radio mínimo de pandeo	94 mm
Conector de la fibra	SMA 905

Cuadro 5.1: Datos técnicos. La transmisión es definida a través de la comparación con una fibra en forma de barra de silica de 5 metros longitud, de 600 μm de diámetro y AN (Apertura Numérica) de 0,37.

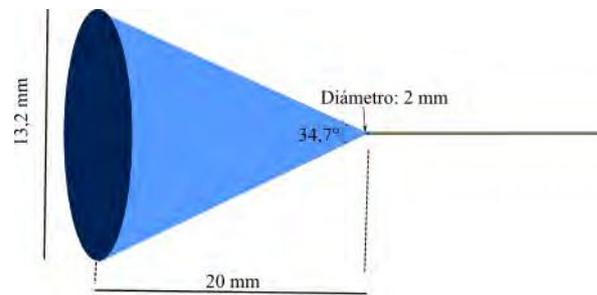


Figura 93. Esquema de la fibra óptica modelo FD1 utilizada para el seguimiento de la TFD.

5.2. Protocolo para determinar el tipo de muerte celular

1. Se preparan dos tubos recubiertos con papel aluminio, uno para la preparación de Hoechst (H) y, otro, para el Ioduro de Propidio (IP)
2. Para el H se debe tener una dilución de 1:50 a partir del reactivo comercial. Si se toman por ejemplo 4 *ml* de medio o PBS, el volumen de Hoechst que debe incorporarse es de 80 μ l. Los 4,08 *ml* se deben preparar en el tubo y agitar para lograr homogeneizar la solución. Análogamente, tomar el otro tubo y preparar una dilución de 1:100 de IP; en este caso, se preparan por ejemplo 2 *ml* de PBS y en el mismo se debe incorporar 20 μ l de IP
3. Tomar una cápsula con células y tirar el contenido (medio RPMI). Las células quedan adheridas al fondo de la cápsulas de Petri. Incorporar 1 *ml* de H, para posteriormente incubar en estufa 5 *min*.
4. Recoger 1 *ml* de H y enjuagar la cápsula con 1 *ml* de PBS.
5. Volcar 0,5 *ml* de IP
6. Observar en microscopio de fluorescencia, teniendo en cuenta los patrones mostrados en la figura 94

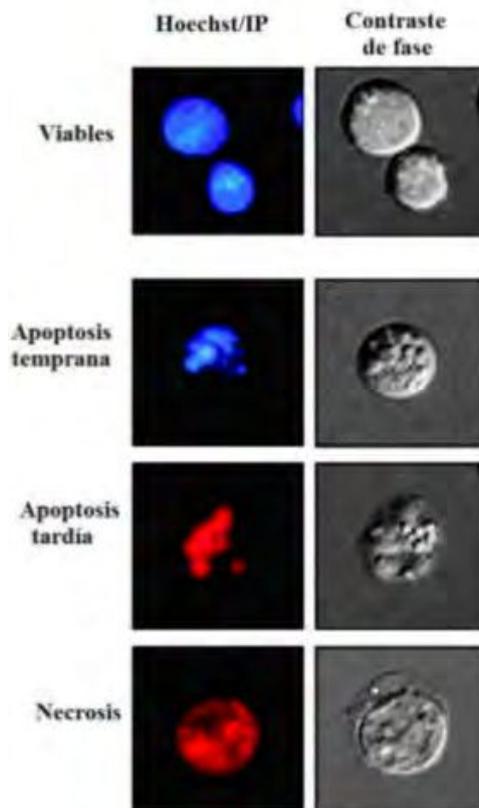


Figura 94. La morfología celular fue clasificada como sigue: (i) células vivas (núcleo normal, creatina azul con estructuras organizadas); (ii) células apoptóticas (apoptosis temprana, cromatina azul brillante, la cual está altamente condensada, o fragmentada; (iii) apoptosis tardía con cromatina rojo brillante, altamente condensada o fragmentada); (iv) células necróticas (núcleo rojo estirado con estructura normal).

5.3. Protocolo Foscan[®]

5.3.1. Nombre del medicamento

Foscan[®] 1 mg/ml solución inyectable

5.3.2. Composición cualitativa y cuantitativa

Solución inyectable violeta oscuro. Cada 1 ml contiene 1 mg de temopor-
fina.

Excipientes: cada *ml* contiene 376 *mg* de etanol anhidro y 560 *mg* de propilenglicol.

5.3.3. Indicaciones terapéuticas

Está indicado para el tratamiento paliativo de pacientes con carcinoma avanzado de células escamosas en la cabeza y el cuello, que hayan fracasado a terapias anteriores y resulten inadecuados para radioterapia, cirugía o quimioterapia sistémica.

5.3.4. Posología y forma de administración

La terapia fotodinámica de *Foscan*[®] debe administrarse bajo supervisión de médicos con experiencia en la TFD. El *Foscan*[®] se administra a través de una cánula intravenosa residente en una vena proximal grande de una extremidad, preferiblemente en la fosa antecubital, como una sola inyección intravenosa lenta a lo largo de un mínimo de seis minutos. La permeabilidad de la cánula residente debe ser ensayada antes de la inyección y hay que adoptar todas las precauciones posibles contra la extravasación.

La dosis es de 0,15 *mg/kg* de peso corporal. No diluir el *Foscan*[®].

Administrar la dosis de *Foscan*[®] necesaria por inyección intravenosa lenta, durante un tiempo mínimos de seis minutos, 96 *h* después de la administración de *Foscan*[®], el lugar de tratamiento ha de ser iluminado con luz de 652 *nm* de una fuente láser aprobada. Debe aplicarse la luz a toda la superficie del tumor por medio de una fibra óptica de microlente aprobada. Siempre que sea posible la zona iluminada debe extenderse más allá del margen del tumor en una distancia de 0,5 *cm*.

La dosis de luz incidente es de 20 *J/cm²*, aplicada con una irradiancia de 100 *mW/cm²* a la superficie del tumor, lo cual supone un tiempo de iluminación de 200 *s*. Contraindicaciones: hipersensibilidad al principio o a alguno de los excipientes; porfiria u otras enfermedades exacerbadas por la luz; hipersensibilidad a las porfirinas; tumores que se sabe que están erosionando un vaso sanguíneo importante en el lugar de iluminación o adyacente a el; un procedimiento quirúrgico previsto en los 30 días siguientes; enfermedad oftálmica coexistente que probablemente requiera un examen con lámpara de hendidura en los 30 días siguientes; terapia existente con un agente fotosensibilizante.

5.3.5. Advertencias y precauciones especiales de empleo

Hay que tener especial cuidado para prevenir la extravasación en el lugar de inyección. Si se produce una extravasación hay que proteger la zona de la luz durante al menos tres meses. No existe ningún beneficio conocido por inyectar otra sustancia en el lugar de la extravasación. Algunos oxímetros de pulso pueden producir luz de una longitud de onda próxima a la empleada para la fotoactivación de *Foscan*[®]. Los oxímetros deben ser recolocados cada 10-15 minutos para evitar el riesgo de quemaduras locales cutáneas.

Durante los 6 meses siguientes al tratamiento con *Foscan*[®], evite la exposición prolongada a la luz solar de la zona del brazo en el que se le haya aplicado la inyección. Como medida de precaución, si se planea una actividad prolongada al aire libre, proteja el lugar de la inyección utilizando una camisa de manga larga y de color.

Solo deben llevarse a cabo procedimientos quirúrgicos no planificados o de emergencia donde se ha administrado *Foscan*[®] durante los 30 días anteriores si es absolutamente necesario y los beneficios potenciales compensan el riesgo para el paciente. Hay que tomar todas la precauciones para evitar la iluminación directa del paciente con lámparas quirúrgicas durante estos procedimientos.

Todos los pacientes que reciban *Foscan*[®] se volverán temporalmente fotosensibles. Hay que adoptar precauciones para evitar la exposición de la piel y los ojos a la luz solar directa o luces artificiales intensas durante los primeros 15 días después de la inyección. Las reacciones de fotosensibilidad de la piel son provocadas por la luz visible; por tanto los filtros solares ultravioletas no proporcionan protección alguna. Es importante que los pacientes sean reintroducidos a la luz normal gradualmente.

5.3.6. Efectos sobre la capacidad para conducir y utilizar máquinas

La cantidad de alcohol de este medicamento puede afectar su capacidad para conducir o utilizar máquinas.

5.3.7. Reacciones adversas

Todos los pacientes que reciben *Foscan*[®] se vuelven temporalmente fotosensibles y deben ser instruidos para que sigan las precauciones de evitar la luz solar y las luces artificiales. La mayor parte de las toxicidades asociadas con esta terapia son efectos locales en la región de iluminación y a veces en

los tejidos circundantes. Las reacciones adversas locales son características de una respuesta tisular inflamatoria aguda inducida por la fotoactivación.

5.3.8. Sobredosis

En caso de sobredosis, el tratamiento con láser ocasionaría una necrosis del tumor más profunda que la esperada con la dosis recomendada. Solo debe llevarse a cabo la iluminación del tumor si el beneficio potencial justifica el riesgo potencial de la necrosis excesiva. Si el tumor no es iluminado, debe dejarse un plazo de al menos 4 semanas entre la sobredosis y la nueva administración de Foscan[®]. Puede esperarse que las reacciones adversas asociadas con la sobredosis se limiten a reacciones de fotosensibilidad. La exposición a la luz ambiental tras una sobredosis conlleva un aumento del riesgo de reacciones de fotosensibilidad. Las investigaciones clínicas publicadas han demostrado que la duración y la intensidad de la fotosensibilidad a la dosis recomendada de 0,15 mg/kg se reducían en un tercio con respecto a una dosis de 0,3 mg/kg. Ciertos estudios animales han revelado algunos cambios hematológicos y químicos sanguíneos (reducción de las plaquetas, eritrocitos y hemoglobina, aumento de los neutrófilos, fibrinógeno, bilirrubina, triglicéridos y colesterol). Se requiere un seguimiento estricto del régimen de reducción de la luz. Debe llevarse a cabo una prueba de fotosensibilidad de la piel antes de que el paciente regrese a unas condiciones normales de luz. No se conoce ningún síntoma sistémico específico asociado con la sobredosis. El tratamiento debe ser sintomático. Existe información limitada acerca de los efectos de la sobre-exposición a la luz de láser durante el tratamiento. Se notificó un incremento de los daños a los tejidos.

5.4. Código Python para cuantificar la intensidad de color

```
import pylab
import matplotlib.pyplot as plt
import matplotlib.image as mpimg
import numpy as np
img2 = mpimg.imread('example13.jpg')
Calcular separadamente la diferencia absoluta para cada canal
errorr = np.fabs(img2[:, :, 0])
errorg = np.fabs(img2[:, :, 1])
errorb = np.fabs(img2[:, :, 2])
Calcular el máximo error para cada pixel
```

```
lum_img = np.maximum(np.maximum(error_r, error_g), error_b)  
lum_img = np.negative(lum_img);  
imgplot = plt.imshow(lum_img)  
Elegir una paleta de color  
imgplot.set_cmap('jet')  
imgplot.set_cmap('Spectral')  
plt.colorbar()  
plt.axis('off')  
pylab.show()
```

5.5. Protocolo para aplicaciones dérmicas

Las características y particularidades de los fotosensibilizantes en TFD son importantes para el resultado del tratamiento. Según Stapleton y Rodes [298] las características que deben reunir los fotosensibilizantes son:

- Capacidad para localizarse específicamente en el tejido o células a tratar.
- Distribución homogénea en la diana.
- Alta lipofilia a fin de que penetren las barreras biológicas.
- Vida media corta y rápida eliminación en los tejidos no enfermos.
- Espacio de tiempo lo más breve posible entre la administración y la acumulación máxima en la diana a tratar.
- Activación frente a longitudes de onda determinadas y penetración óptima en el tejido.
- Alto rendimiento en la producción de oxígeno reactivo monoatómico (singulete) o, en general, de especies reactivas de oxígeno.
- Ausencia de toxicidad en un ambiente oscuro.

Los fotosensibilizantes que han demostrado eficacia en TFD cutánea incluyen el ácido 5-aminolevulínico (5-ALA), el metil éster de ácido levulínico (MAL), los derivados de la hematoporfirina, los derivados de la benzoporfirina, y la meta-tetrahidroxifenilclorina [299]. Entre los que se encuentran comercializados destacan el 5-ALA (Levulan[®] Kerastic[™] DUSA Pharmaceuticals, Wilmington, MA, EE.UU.) y el MAL (Metvix[®] PhotoCure SAS, Oslo, Noruega), con la ventaja, este último, de que es más liposoluble. La

mayor liposolubilidad permite una mejor penetración en el tejido empleando dosis menores. Ambos compuestos se consideran óptimos para su aplicación clínica aunque también se dispone de otras moléculas fotosensibilizantes, algunas en fase de investigación, que reaccionan de forma notoria frente a diferentes longitudes de onda. El 5-ALA, MAL y HAL no son fotosensibilizantes efectivos por sí mismos, sino que después de su administración, se transforman en protoporfirina IX (PpIX); es decir, el agente sensibilizante principal sobre el que se actúa durante el tratamiento (Figura 95). Aunque se conocen las particularidades de reacción y absorción de las porfirinas frente al extenso espectro de longitudes de onda (Figura 96).

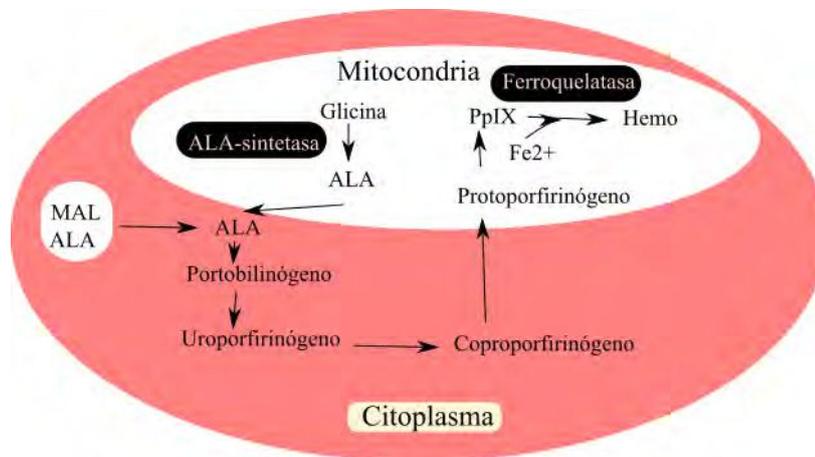


Figura 95. Síntesis de protoporfirina IX después de la aplicación de ALA [300].

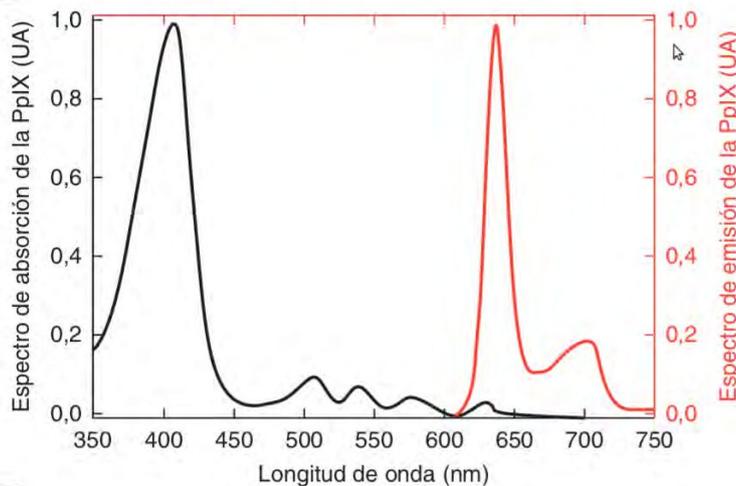


Figura 96. Picos de absorción de la protoporfirina IX en el espectro de la luz. Aparecen cinco bandas en la que es posible obtener la excitación del fotosensibilizador.

Podemos analizar la distribución y definición objetiva de las lesiones a tratar mediante luz ultravioleta (UV) con lámpara de Wood, que permiten ver la fluorescencia que desprende el producto en su forma de porfirina y posibilita el seguimiento iconográfico. Para sistematizar adecuadamente el tratamiento conviene ordenar los siguientes pasos:

- Limpieza del área a tratar (eliminar maquillajes, etc.). Se recomienda peeling de salicílico, microdermoabrasión, limpieza enérgica con gasa o emplear una cucharilla con maniobras suaves, particularmente en las KA muy elevadas
- Aplicación del fotosensibilizante
- Colocar un apósito oclusivo y mantener, dependiendo de la alteración cutánea, entre 30 minutos a 5 horas. En algunos casos, como en los tratamientos de estética cutánea, la oclusión puede sustituirse por aplicaciones del agente sensibilizante cada 10 minutos. Es importante añadir un protector opaco después de su aplicación para evitar que el producto reaccione con la luz ambiental
- En el caso de emplear ALA, diluido entre el 1 % al 20 % , se recomienda mantener tiempos de oclusión entre 30 minutos y 5 horas. Si se utiliza ALA en liposomas al 0,5 % , su aplicación debe ser de una hora con intervalos de 10 minutos, sin necesidad de ocluir el área de tratamiento.
- En el caso de emplear MAL (generalmente al 16 %), se mantiene la oclusión durante 3 horas. Este tiempo es más reducido en los tratamientos de estética cutánea
- Transcurrido este tiempo, se retira el apósito y los residuos del producto lavando suavemente con agua y jabón no agresivo
- Se procede al tratamiento con el sistema seleccionado de luz coherente (láser) o no coherente (LED, IPL, luz de banda estrecha, etc.), siguiendo las dosis indicadas para cada sistema y de acuerdo a la lesión a tratar

Bibliografía

- [1] K.M. Beauchemin, P. Hays, Phototherapy is a useful adjunct in the treatment of depressed in patients, *Acta Psychiatr Scand* 95 (1997) 424-427.
- [2] W.L. Raymond, D.F. Kripke, J. C. Gillin, Phototherapy for Depressive Disorders: A Review, *Can. J. Psychiatry* 34 (1989).
- [3] J.D. Spikes, The historical development of ideas on applications of photosensitised reactions in health sciences, *Primary Photoprocesses in Biology and Medicine* (1985) 209-227.
- [4] J.F. Carvin, *TDes Bienfaits de Linsolation*, Faculté de médecine, Paris, 1915.
- [5] M.F. Holick, J.A. MacLaughlin, J.A. Parrish, R.R. Anderson, The photochemistry and photobiology of vitamin D3, *The Science of Photomedicine* (1982) 195-218. DOI:10.1007/978-1-4684-8312-3-7
- [6] N.R. Finsen, *Phototherapy*, 1901.
- [7] R.J. Cremer, P.W. Perryman, D.H. Richards, Influence of light on the hyperbilirubinemia in infants(1958) 1094-1097.
- [8] M. A. Oldham, D. A. Ciraulo, Bright light therapy for depression: A review of its effects on chronobiology and the autonomic nervous system, *Chronobiol Int.* 31:3 (2014) 305-319. DOI:10.3109/07420528.2013.833935
- [9] Y. Meesters, J. H. C. Jansen, D. G. M. Beersma, A. L. Bouhuys, R. H. Van Den Hoofdakker, Light Therapy for Seasonal Affective Disorder the Effects of Timing. *The British Journal of Psychiatry* 166:5 (1995) 607-612. DOI:10.1192/bjp.166.5.607

- [10] S. L. Chellappa, R. Steiner, P. Oelhafen, Dieterlang, T. Götzi, J. Krebs and C. Cajochen. Acute exposure to evening blue-enriched light impacts on human sleep. *J.SleepRes.* 22 (2013) 573580. DOI: 10.1111/jsr.12050
- [11] T. J. Dougherty, An update on photodynamic therapy applications, *J. Clin. Laser Med. Surg.* 20 (2002) 3-7.
- [12] R. Ackroyd, C. Kelty, N. Brown, M. Reed, The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 74 (2001) 656-669.
- [13] H.v. Tappeiner, Die photodynamische Erscheinung. *Ergebn. Physiol.* 8 (1909) 698-741.
- [14] W.Hausmann, Die senibilisierende wirkung des hematoporphyrins, *Biochem Z* 30(1911)276-316.
- [15] E. Meyer-Betz, Untersuchungen tiber die biologische (photodynamische) Wirkung des H imatoporphyrins und andere Derivate des Blut- und Gallenfarbstoffes, *Dtsch. Arch. Klin. Med.* 112 (1913) 476-503.
- [16] A. Policard, Etudes sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la lumiere de Wood. *C R Soc Biol* 91 (1924) 1423-1428.
- [17] J.Korbler, Untersuchung von krebsgewebe im fluoreszenerregenden licht, *Strahlen-therapie* 41(1931)510-518.
- [18] H. Auler, G.Banzer, Untersuchungen uber die rolle der porphyrine bei geschwulst- kranken menschen und tieren, *Z Krebsforsch* 53 (1942) 65-68.
- [19] R-M. Szeimies, J. Dräger, C. Abels, Michael Landthaler, History of photodynamic therapy in dermatology, *Comprehensive Series in Photosciences*, 2 (2001) 3-15. DOI:10.1016/S1568-461X(01)80105-8
- [20] N. L. Oleinick, R. L. Morris, I. Belichenko, The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how, *Photochem. Photobiol.* 1 (2002) 1-21.
- [21] M.B. Vrouenraets, G. W. Visser, G. B. Snow, G. A. van Dongen, Basic principles, applications in oncology and improP. Grosjean, G. Wagnieres, C. Fontolliet, H. van den Bergh, P. Monnier, Clinical photodynamic therapy for superficial cancer in the oesophagus and the bronchi: 514 nm compared with 630 nm light irradiation after sensitization with Photofrin 11, *Oncology Reports* 29 (2013) 911-916.

-
- [22] T.Kosaki, T. Ikeda, Y. Takatsuka, T. Saka, Studies on the affinities of cells and their formative elements for porphyrin bodies. *Mie Medical J* 1-2 (1955) 7-15.
- [23] R.L. Lipson, E.J. Baldes, The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative, *Arch Dermatol* 82(1960)508-516.
- [24] K.R.Weishaupt, C. J. Gomer, T. J. Dougherty, Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor, *Cancer Res.* 36 (1976) 2326-2329.
- [25] J.F. Kelly, M.E. Snell, Hematoporphyrin Derivative: A Possible Aid in the Diagnosis and Therapy of Carcinoma of the Bladder. *The Journal of Urology* 115 (1976). DOI:10.1016/S0022-5347(17)59108-9
- [26] C. Cochrane, S. R. Mordon, J. C. Lesage, V. Koncar, New design of textile light diffusers for photodynamic therapy, *Materials Science and Engineering C* 33 (2013) 11701175. DOI:10.1016/j.msec.2012.12.007
- [27] L.R.Braathen, R.M.Szeimies, N.BassetSeguin , et al, Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: an international consensus, *International Society for Photodynamic Therapy in Dermatology, J Am Acad Dermatol.* 56 (2007) 125-143.
- [28] M.S. Nestor, M.H. Gold, A.N.Kauvar, et al, The use of photodynamic therapy in dermatology: results of a consensus conference, *J Drugs Dermatol.* 5 (2006) 140154.
- [29] M.Biel, Advances in photodynamic therapy for the treatment of head and neck cancers, *Lasers Surg Med.* 38 (2006) 349355.
- [30] G.S.Keller, D.R. Doiron, G.U.Fisher, Photodynamic therapy in otolaryngologyhead and neck surgery, *Arch Otolaryngol.* 111 (1985) 758761.
- [31] J.Feyh, A. Goetz, W. Muller, R. Konigsberger, E. Kastenbauer, Photodynamic therapy in head and neck surgery. *J Photochem Photobiol B.* 7(1990) 353358.
- [32] J.Feyh, A. Gutmann, A. Leunig, A photodynamic therapy in head and neck surgery, *Laryngol Rhinol Otol.* 72 (1993) 273278.
- [33] H.C.Wolfsen, Carpe luzseize the light: endoprevention of esophageal adenocarcinoma when using photodynamic therapy with porfimer sodium. *Gastrointest Endosc.* 62 (2005) 499503.

- [34] I.Wang, N. Bendsoe, C.A.Klinteberg, et al, Photodynamic therapy vs. cryosurgery of basal cell carcinomas: results of a phase III clinical trial. *Br J Dermatol.* 144 (2001) 832840.
- [35] H.C.Wolfsen, Uses of photodynamic therapy in premalignant and malignant lesions of the gastrointestinal tract beyond the esophagus. *J Clin Gastroenterol.* 39 (2005) 653664
- [36] H.Nakamura, J. Johansson, R. Berg, K. Svanberg, S. Svanberg, Laser-induced fluorescence studies of normal and malignant tumor tissue of rat following intravenous injection of amino levulinic acid, *Laser Surg. Med.* 20 (1997) 272274.
- [37] S.G.Bown, A.Z. Rogowska, D.E. Whitelaw, et al, Photodynamic therapy for cancer of the pancreas. *Gut.* 50 (2002) 549557.
- [38] C.S.Loh, P. Bliss, S.G. Bown, N. Krasner, Photodynamic therapy for villous adenomas of the colon and rectum. *Endoscopy,* 26 (1994) 243246.
- [39] T.Nakamura, H.Fukui, Y.Ishii, K.Ejiri, M. Ejiri, Photodynamic therapy with polypectomy for rectal cancer. *Gastrointest Endosc.* 57 (2003) 266269.
- [40] Pasquale Spinelli , A. Mancini, M. Dal Fante, Endoscopic treatment of gastrointestinal tumors: indications and results of laser photocoagulation and photodynamic therapy, *Seminars in Surgical Oncology,* 11:4 (1995) 307-318. DOI:10.1002/ssu.2980110406
- [41] A.M.Abulafi, M.Dejode, J.T.Allardice, J. Ansell, J. Rogers, N.S.Williams, Adjuvant intraoperative photodynamic therapy in experimental colorectal cancer, *Br J Surg.* 82 (1995) 178181.
- [42] S.Wang, E. Bromley, L. Xu, J.C. Chen, L. Keltner, Talaporfin sodium. *Expert Opin Pharmacother.* 11 (2010) 133140.
- [43] R.A.Weersink, J. Forbes, S. Bisland, et al, Assessment of cutaneous photosensitivity of TOOKAD (WST09) in preclinical animal models and in patients, *Photochem Photobiol.* 81 (2005) 106113.
- [44] J.Trachtenberg, A. Bogaards, R.A. Weersink, et al, Vascular targeted photodynamic therapy with palladiumbacteriopheophorbide photosensitizer for recurrent prostate cancer following definitive radiation therapy: assessment of safety and treatment response, *J Urol.* 178 (2007) 19741979.

-
- [45] J.Trachtenberg, R.A. Weersink, S.R. Davidson, et al, Vasculartargeted photodynamic therapy (padoporfin, WST09) for recurrent prostate cancer after failure of external beam radiotherapy: a study of escalating light doses. *BJU Int.*102 (2008) 556562.
- [46] M.A. D'Hallewin, L.Baert, Longterm results of whole bladder wall photodynamic therapy for carcinoma in situ of the bladder, *Urology*, 45 (1995) 763767.
- [47] U.O Nseyo, B. Shumaker, E.A. Klein, K.Sutherland, Photodynamic therapy using porfimer sodium as an alternative to cystectomy in patients with refractory transitional cell carcinoma in situ of the bladder. Bladder Photofrin Study Group, *J Urol.* 160:1 (1998) 39-44.
- [48] T.Uchibayashi, K. Koshida, K. Kunimi, H.Hisazumi, Whole bladder wall photodynamic therapy for refractory carcinoma in situ of the bladder, *Br J Cancer* 71(1995) 625628.
- [49] J. 3rd LoCicero, M. Metzdorff, C. Almgren, Photodynamic therapy in the palliation of late stage obstructing nonsmall cell lung cancer. *Chest.* 98 (1990) 97100.
- [50] J.P. DiazJimenez, J.E. MartinezBallarin, A. Llunell, E.Farrero, A. Rodriguez, M.J.Castro, Efficacy and safety of photodynamic therapy versus NdYAG laser resection in NSCLC with airway obstruction, *Eur Respir J.* 14 (1999) 800805.
- [51] J.S. McCaughan, T.E. Williams, Photodynamic therapy for endobronchial malignant disease: a prospective fourteenyear study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 114 (1997) 940946.
- [52] K.Furuse , M. Fukuoka, H. Kato, et al, A prospective phase II study on photodynamic therapy with photofrin II for centrally located earlystage lung cancer, The Japan Lung Cancer Photodynamic Therapy Study Group. *J Clin Oncol.* 11 (1993) 18521857.
- [53] C.Perria, T. Capuzzo, G. Cavagnaro, et al, Fast attempts at the photodynamic treatment of human gliomas, *J Neurosurg Sci.* 24 (1980) 119129.
- [54] A.H.Kaye, J.J. Morsty, R. Berg, K. Svanberg, S. Svanberg, Laser-induced fluorescence studies of normal and malignant tumor tissue of rat following intravenous injection of amino levulinic acid, *Laser Surg. Med.* 20 (1997) 272274.

- [55] S.Krishnamurthy, S.K. Powers, P. Witmer, T. Brown, Optimal light dose for interstitial photodynamic therapy in treatment for malignant brain tumors, *Lasers Surg Med.* 27(2000) 224234.
- [56] H.Kostron, E. Fritsch, V. Grunert, Photodynamic therapy of malignant brain tumours: a phase I/II trial, *Br J Neurosurg.* 2 (1988) 241248.
- [57] P.V.Marks, P.E. Belchetz, A. Saxena, et al, Effect of photodynamic therapy on recurrent pituitary adenomas: clinical phase I/II trial an early report, *Br J Neurosurg.* 14 (2000) 317325.
- [58] A. Ferreira dos Santos, D.R. Queiroz de Almeida, L. Ferreira Terra, M. S. Baptista, L. Labriola, Photodynamic therapy in cancer treatment-an update review, *J Cancer Metastasis Treat* 5(2019). DOI:10.20517/2394-4722.2018.83
- [59] C. Qi, H. Zhang, Y. Chen, S. Su, F.X. Wang, Q.X. Huang, C. Fang, B. Li, M.X. Xia, P. He, Effectiveness and safety of indocyanine green fluorescence imaging-guided hepatectomy for liver tumors: A systematic review and first meta-analysis, *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 28 (2019) 346-353. DOI:10.1016/j.pdpdt.2019.10.007
- [60] J.Huang, M. Guo, S. Jin, M. Wu, C. Yang, G. Zhang, P. Wang, J. Ji, Q.Zeng, X. Wang, H. Wang, Antibacterial Photodynamic Therapy Mediated by 5-aminolevulinic acid on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 28 (2019) 330-337. DOI:10.1016/j.pdpdt.2019.09.008
- [61] N. Hodgkinson, C. A Kruger, H. Abrahamse, Targeted photodynamic therapy as potential treatment modality for the eradication of colon cancer and colon cancer stem cells, *Tumor Biology* (2017) 1η-17 . DOI:10.1177/1010428317734691
- [62] S. Mallidi, S. Anbil, A-L. Bulin, G. Obaid, M. Ichikawa, T. Hasan, Beyond the Barriers of Light Penetration: Strategies, Perspectives and Possibilities for Photodynamic Therapy, *Theranostics* 6:13 (2016) 2458-2487. DOI: 10.7150/thno.16183
- [63] B.C. Wilson, M.S. Patterson, The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy, *Phys Med Biol* 53 (2008) R61-109. DOI:10.1088/0031-9155/ 53/9/r01
- [64] T M. Makropoulou, G. Kareliotis, E. Spyratou, E. Drakaki, A.A. Serafeinides, E. Efstathopoulos, Non-ionizing, laser radiation in Theranostics:

-
- The need for dosimetry and the role of Medical Physics, *Physica Medica* 63 (2019) 7-18. DOI:10.1016/j.ejmp.2019.05.016
- [65] B.W. Pogue, J.T. Elliott, S.C. Kanick, S.C. Davis, K.S. Samkoe, E.V. Maytin, et al, Revisiting photodynamic therapy dosimetry: reductionist surrogate approaches to facilitate clinical success, *Phys Med Biol* 61 (2016) R5789. DOI:10.1088/0031-9155/61/7/r57
- [66] E. Spyratou, M. Makropoulou, E.P. Efstathopoulos, A.G. Georgakilas, L. Sihver, Recent advances in cancer therapy based on dual mode gold nanoparticles. *Cancers*. 9(2017). DOI:10.3390/cancers9120173.
- [67] Plan Nacional del Control del Cáncer (2018-2022)
- [68] Control del cáncer. Aplicación de los conocimientos. Guía de la OMS para desarrollar programas eficaces. Detección temprana
- [69] J.M.M. Walhoomers, M.V. Jacobs, M.M. Manos, F.X. Bosch, J.A. Kummer, K.V. Shah, P.J.F. Snijders, J. Peto, J.L.M. Meijer, M. Muñoz, Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide *J. Pathol.* 189 (1999) 12-19.
- [70] World Health Organization, *Comprehensive cervical cancer control: a guide to essential practice* 2nd Ed. Switzerland, 2014.
- [71] C. Mujat, C. Greiner, A. Baldwin, J. M. Levitt, F. Tian, A. Lee, Stucenski, M. Hunter, L. K. Young, V. Backman, M. Feld, K. Munger, I. Georgakoudi. Endogenous optical biomarkers of normal and human papillomavirus immortalized epithelial cells, *Int. J. Cancer* 122 (2008) 363-371.
- [72] C. K. Brookner, U. Utzinger, G. Staerckel, R. Richards-Kortum, M. Follen Mitchell. Cervical Fluorescence of Normal Women, *Lasers in Surgery and Medicine* 24 (1999) 29-37.
- [73] A. F. Zuluaga, U. Utzinger, A. Durkin, H. Fuchs, A. Gillenwater, R. Jacob, B. Kemp, J. Fan and R. Richards-Kortum. Fluorescence Excitation Emission Matrices of Human Tissue: A System for in Vivo Measurement and Method of Data Analysis, *APPLIED SPECTROSCOPY* 53:3 (1999)
- [74] L. Coghlan, U. Utzinger, R. Richards-Kortum, C. Brookner, A. Zuluaga, I. Gimenez-Conti, M. Follen, Fluorescence Spectroscopy of Epithelial Tissue Throughout the Dysplasia-Carcinoma Sequence in an Animal

- Model: Spectroscopic Changes Precede Morphologic Changes, *Lasers in Surgery and Medicine* 29 (2001) 1-10.
- [75] U. Utzinger, M. Follen, R. Richards-Kortum, D. Cox, E. Neely Atkinson, Effects of biographical variables on cervical fluorescence emission spectra, *Journal of Biomedical Optics* 8:3 (2003) 479-483.
- [76] N. Bedard, R. A. Schwarz, A. Hu, V. Bhattar, J. Howe, M. D. Williams, A. M. Gillenwater, R. Richards-Kortum, T. S. Tkaczyk, Multimodal snapshot spectral imaging for oral cancer diagnostics: a pilot study, *Bio-med Opt Express*, 4:6 (2013) 938-49. DOI:10.1364/BOE.4.000938
- [77] M. C. Pierce, Y.Y. Guan, M. K. Quinn, X. Zhang, W-H. Zhang, Y-L. Qiao, P. Castle, R. Richards-Kortum, A Pilot Study of Low-Cost, High-Resolution Microendoscopy as a Tool for Identifying Women with Cervical Precancer, *Cancer Prev Res* (2012). DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-12-0221
- [78] E. Peter Chizenga, R. Chandran, H. Abrahamse, Photodynamic therapy of cervical cancer by eradication of cervical cancer cells and cervical cancer stem cells. *Oncotarget*, 10:43 (2019) 4380-4396
- [79] X. H. Tao, Y. Guan, D. Shao, W. Xue, F. Shun Ye, M. Wang, M. H. He, Efficacy and safety of photodynamic therapy for cervical intraepithelial neoplasia: A systemic review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 11 (2014) 104-112.
- [80] P. Soergel, L. Makowski, E. Makowski, C. Schippert, H. Hertel, P. Hillemanns, Treatment of high grade cervical intraepithelial neoplasia by photodynamic therapy using hexylaminolevulinate may be cost-effective compared to conisation procedures due to decreased pregnancy-related morbidity, *Lasers Surg Med* 43:7 (2011) 713-20.
- [81] H. Ichimura, S. Yamaguchi, A. Kojima, T. Tanaka, K. Niiya, M. Take-mori, K. Hasegawa, R. Nishimura, Eradication and reinfection of human papillomavirus after photodynamic therapy for cervical intraepithelial neoplasia, *Int J Clin Oncol* 8(2003) 322-325. DOI 10.1007/s10147-003-0354-4
- [82] T. Muroya, K. Kawasaki, Y. Suehiro, T. Kunugi, K. Umayahara, T. Akiya, H. Iwabuchi, H. Sakunaga, M. Sakamoto, T. Sugishita, Y. Tenjin, Application of PDT for uterine cervical cancer. *Diagn Ther Endosc.* 5 (1999) 183-190. DOI:10.1155/DTE.5.183

-
- [83] A.A.Barnett, J.C. Haller, F.Cairnduff, G. Lane, S.B.Brown, D.J.Roberts, A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of photodynamic therapy using 5-aminolaevulinic acid for the treatment of cervical intraepithelial neoplasia, *Int J Cancer*. 103 (2003) 829-832. DOI:10.1002/ijc.10888
- [84] K.Bodner, B. Bodner-Adler, F. Wierrani, A. Kubin, J. Szölts-Szölts, B.Spängler, W.Grünberger, Cold-knife conization versus photodynamic therapy with topical 5-aminolevulinic acid (5-ALA) in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) II with associated human papillomavirus infection: a comparison of preliminary results. *Anticancer Res*. 23 (2003) 1785-1788.
- [85] M. Sakamoto. Safety Guidelines for Photodynamic Therapy in the treatment of early stage cancer and displasia of the uterine cervix, www.jstage.jst.go.jp/browse/islsm
- [86] E.Ramón-Gallegos, Present and future of the photodynamic therapy in cervical cancer treatment, *Cervical Cancer: From Public Health to Molecular Pathogenesis*. Research Signpost. C9 (2015) 189-218.
- [87] Apuntes de cátedra del Ing. Pablo Inxtaina
- [88] Y. Zong, M. E. Nadal, B. K. Tsai, C. Cameron Miller, NIST Measurement Services Photometric Calibrations, 2018. DOI: 10.6028/NIST.SP.250-95
- [89] The International Commission on Illumination. Measurements of LEDs. CIE 127:2007 2nd edition
- [90] L. D. Marín Naranjo. Análisis de la ley de cuadrado inverso para medición práctica de iluminancia. *Ingeniería* 19 (1): 87-96, ISSN: 1409-2441; 2009. San José, Costa Rica
- [91] A . E. Profio, D. R. Doiro, Transport of light in tissue in Photodynamic Therapy,.*Photochemktry and Photobiology* 46:5 (1987) 591-599.
- [92] R.C.Miralles Marrero, I.Miralles Rull, *Biomecánica clinica de los tejidos y las articulaciones el aparato locomotor*, Masson, Barcelona, 2005.
- [93] O.Minet, G.Mueller, J.Beuthan, Selected papers on optical tomography Vol.Fundamental and Applictions in Medecine.,147,SPIEPress,Bellinghan,1988.

- [94] V.V.Tuchin(Ed.), Selected papers on tissue optics: Applications in medical diagnostics and therapy.,102,SPIE Press, Bellinghm, 1994.
- [95] Bohren, F.Craig, R.Donald, Huffman. Absorption and scattering of light by small particles, John Wiley Sons, NewYork, 1998.
- [96] D. García Vizcaino, Sistema láser de medida de velocidad por efecto doppler debajo coste para aplicaciones industriales e hidrodinámicas, Universidad Politécnica de Cataluña, Barcelona, 2005.
- [97] Z.S.Wu, Y.P.Wang, Electromagnetic scattering for multilayered sphere: Recursive algorithms. *RadioScience* 26:6 (2012) 1393-1401.
- [98] B.C.Wilson, G.Adam, A Monte Carlo model for the absorption and flux distributions of light in tissue.*Medical Physics* 10:6 (1983) 824-830.
- [99] S.A. Prahl, M.Keijzer,S.L.Jacques, A.J.Welch.S.A.Prahl, M.Keijzer, S.L.Jacques, A.J.Welch, Proceedings of Dosimetry of Laser Radiation in Medicine and Biology, SPIE IS5 (1989) 102-111.
- [100] L.Wang, S.L.Jacques, L.L.Zheng, MCMLMonte Carlo modeling of light transport in multi Layered tissues, *Comp.Meth.Prog.Biom* 47 (1995) 131-146.
- [101] K.Vishwanath, B.Poque,M.A.Mycek, Quantitative fluorescence life time spectroscopy in turbid media:Comparison of theoretical, experimental and computational methods, *Phys Med Biol* 47:18 (2002) 3387-3405.
- [102] D.P.Friedmann, M.P.Goldman, S.G.Fabi, I.Guiha, The effect of multiple sequential light sources to activate Aminolevulinic acid in the treatment of actinic Keratoses: a retrospective study, *J Clin Aesthetic Dermatol* 7 (2014) 20-25.
- [103] D.R.Opel, E. Hagstrom, A.K. Pace, et al, Light-emitting diodes: a brief review and clinical experience, *J Clin Aesthetic Dermatol* 8 (2015) 36-44
- [104] J.R.Jagdeo, L.E.Adams,N.I. Brody, et al,Transcranial red and near infrared light transmission in a cadaveric model. *PLoS One* 7:e47460 (2014)
- [105] M.E. Chaves ME, A.R.de Araújo, A.C.C. Piancastelli, M. Pinotti, Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. *An Bras Dermatol* 89 (2014) 616-623.

-
- [106] Martijn Laurens Triesscheijn, Oostzaan, mTHPC-mediated photodynamic therapy; from bed to bench and back again, 2006.
- [107] K. Plaetzer, B. Krammer, J. Berlanda, F. Berr, T. Kiesslich, Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects, *Lasers Med Sci* 24 (2009) 259-268.
- [108] D. Garca Fresnadillo, Fotosensibilización y el sensibilizador: síntesis, propiedades y limitaciones, 2005.
- [109] Y.H.Ong, M. Kim, T. Zhu, Photodynamic Therapy Explicit Dosimetry. Recent Advancements and Applications in Dosimetry, 2018.
- [110] B.C.Wilson, M.S.Patterson, L.Lilge, Implicit and explicit dosimetry in photodynamic therapy: a New paradigm, *Lasers in Medical Science* 12:3 (1997) 182-199.
- [111] M.T. Jarvi, M.S. Patterson, B.C.Wilson. Insights into photodynamic therapy dosimetry: simultaneous singlet oxygen luminescence and photosensitizer photobleaching measurements. *Biophysical* 102:3(2012) 661-71.
- [112] A.A.Krasnovskii, Photosensitized luminescence of singlet oxygen in aqueous solutions, *Biofizika* 24:4 (1979) 747-748. detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells in vitro and tissues in vivo, *Photochem Photobiol* 75:4(2002) 382-391. photodynamic therapy. *Physics in Medicine Biology* 53:9(2008) R61. detection with a fiber-coupled superconducting nanowire single-photon detector, *Opt. Express* 21:4(2013), 5005-5013.
- [113] H.Wu, Q. Song, G. Ran, X.Lu, B. Xu, Recent developments in the detection of singlet oxygen with molecular spectroscopic methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30:1 (2011) 133-141.
- [114] K. Tanaka, T. Miura, N.Umezawa, Y.Urano, K.Kikuchi, T. Higuchi, T. Nagano, Rational Design of Fluorescein-Based Fluorescence Probes. Mechanism-Based Design of a Maximum Fluorescence Probe for Singlet Oxygen, *J American Chemical Society* 123:11(2001) 2530-2536.
- [115] H.Lin, Y.Shen, D.Chen, L. Lin, B.C. Wilson, B.Li, S. Xie, Feasibility Study on Quantitative Measurements of Singlet Oxygen Generation Using Singlet Oxygen Sensor Green, *J Fluorescence* 23:1 (2013) 41-47.

- [116] C.Lu, G.Song, J-M Lin, Reactive oxygen species and their chemiluminescence-detection methods, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 25:10 (2006) 985-995.
- [117] D.Zhu, D. Xing, Y.Weii, X. Li, B. Gao, Evaluation of the degree of medical radiation damage with a highly sensitive chemiluminescence method, *Luminescence* 19:5 (2004) 278-282.
- [118] J.Moan, K. Berg, The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen, *Photochem Photobiol* 53:4(1991) 549-53.
- [119] H.Wu, Q. Song, G. Ran, X. Lu, B.Xu, Recent developments in the detection of singlet oxygen with molecular spectroscopic methods, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 30:1 (2011) 133-141.
- [120] K. Tanaka, T. Miura, N.Umezawa, Y. Urano, K. Kikuchi, T.Higuchi, T.Nagano, Rational Design of Fluorescein-Based Fluorescence Probes. Mechanism-Based Design of a Maximum Fluorescence Probe for Singlet Oxygen, *J American Chemical Society* 123:11(2001) 2530-2536.
- [121] R.Cheung, M. Solonenko, T.M. Busch, F.Del Piero, M.E.Putt, S.M. Hahn, A.G. Yodh. Correlation of in vivo photosensitizer fluorescence and photodynamic-therapy-induced depth of necrosis in a murine tumor model, *J Biomedical Optics*, 8:2(2003) 248-52.
- [122] C.Sheng, P.J.Hoopes, T. Hasan, B.W. Pogue, Photobleaching-based dosimetry predicts deposited dose in ALA-PpIX PDT of rodent esophagus, *Photochem Photobiol* 83:3 (2007) 738-48.
- [123] W.J. Cottrell, A.D. Paquette, K.R. Keymel, T.H Foster, A.R. Oseroff, Irradiance-dependent photobleaching and pain in delta-aminolevulinic acid- photodynamic therapy of superficial basal cell carcinomas, *Clinical Cancer Research* 14:14 (2008) 4475-4483.
- [124] R.M. Valentine, S.H. Ibbotson, C.T.A. Brown, K. Wood, H. Moseley, A Quantitative Comparison of 5-Aminolaevulinic Acid and Methyl Aminolevulinic Acid Induced Fluorescence, Photobleaching and Pain During Photodynamic Therapy, *Photochemistry Photobiology* 87:1 (2011) 242-249.
- [125] S.Mallidi, S. Anbil, S.Lee, D.Manstein, S.Eltrington, G. Kositratna, D. Schoenfeld, B.Pogue, S.J. Davis, T. Hasan, Photosensitizer fluorescence

-
- and singlet oxygen luminescence as dosimetric predictors of topical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy induced clinical erythema, *J Biomedical Optics* 19:2 (2014) 028001.
- [126] R.J. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Tercera edición. 2006.
- [127] L.H.P.Murrer, J.P.A. Marijnissen, P. Baas, N.Van Zandwijk, W.M. Star, Applicator for light delivery and in situ light dosimetry during endobronchial photodynamic therapy: First measurements in humans, *Lasers in Medical Science*, 12:3 (1997) 253-259.
- [128] R.L.P.van Veen, M.C.G. Aalders, K.L. Pasma, P.D. Siersema, J. Haringsma, W. van de Vrie, E.E.E. Gabeler, D.J.Robinson, H.J.C.M. Sterenborg, In situ light dosimetry during photodynamic therapy of Barrett's esophagus with 5-aminolevulinic acid. *Lasers in Surgery and Medicine* 31:5(2002) 299-304.
- [129] Y.H.Ong, M.M.Kim, J.C. Finlay, A. Dimofte, S.Singhal, E.Glatstein, K.A. Cengel, T.C.Zhu, PDT dose dosimetry for Photofrin-mediated pleural photodynamic therapy (pPDT), *Phys Med Biol* 63:1 (2017) 015031.
- [130] T.Johansson, M. Soto Thompson, M. Stenberg, Ca Klinteberg, S. Andersson-Engels, S.Svanberg, K. Svanberg, Feasibility study of a system for combined light dosimetry and interstitial photodynamic treatment of massive tumors, *Applied Optics* 41:7 (2002) 1462-1468.
- [131] A. Dimofte, J.C. Finlay, T.C. Zhu, A method for determination of the absorption and scattering properties interstitially in turbid media, *Phys Med Biol* 50:10(2005) 2291-311.
- [132] L. Wang, S.L.Jacques, L.Zheng, MCMLMonte Carlo modeling of light transport in multi-layered tissues, *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 47:2(1995) 131-146.
- [133] M.L. De Jode, Monte Carlo Simulations of Light Distributions in an Embedded Tumour Model: Studies of Selectivity in Photodynamic Therapy, *Lasers in Medical Science* 15:1 (2000) 49-56.
- [134] R.M. Valentine, K. Wood, C.T.A.Brown, S.H. Ibbotson, H. Moseley, Monte Carlo simulations for optimal light delivery in photodynamic therapy of non-melanoma skin cancer, *Phys Med Biol* 57:20 (2012) 6327-45.

- [135] T.J.Farrell, M.S. Patterson, B. Wilson, A diffusion theory model of spatially resolved, steady-state diffuse reflectance for the noninvasive determination of tissue optical properties in vivo, *Med Phys* 19:4 (1992) 879-888.
- [136] C.M. Gardner, S.L. Jacques, A.J. Welch, Light transport in tissue: Accurate expressions for one-dimensional fluence rate and escape function based upon monte carlo simulation, *Lasers Surg Med* 18:2(1996) 129-138.
- [137] S.L. Jacques, Light distributions from point, line and plane sources for photochemical reactions and fluorescence in turbid biological tissues, *Photochem Photobiol* 67:1(1998) 23-32.
- [138] Y.H.Ong T.C. Zhu, Analytic function for predicting light fluence rate of circular fields on a semi-infinite turbid medium, *Opt. Express* 24:23(2016) 26261- 26281.
- [139] T.C.Zhu, S.M. Hahn, A.S. Kapatkin, A.Dimofte, C.E. Rodriguez, T.G.Vulcan, E.Glatstein, R.A. Hsi, In vivo optical properties of normal canine prostate at 732 nm using motexafin lutetium-mediated photodynamic therapy, *Photochem Photobiol* 77:1 (2003) 81-88.
- [140] T.C. Zhu, A. Dimofte, J.C. Finlay, D.Stripp, T. Busch, J.Miles, R. Whittington, S.B. Malkowicz, Z.Tochner, E. Glatstein, S.M. Hahn, Optical properties of human prostate at 732 nm measured in mediated photodynamic therapy, *Photochem Photobiol* 81:1 (2005) 96-105.
- [141] T.C.Zhu, J.C. Finlay, S.M. Hahn, Determination of the distribution of light, optical properties, drug concentration, and tissue oxygenation in vivo in human prostate during motexafin lutetium-mediated photodynamic therapy, *Journal of photochemistry and photobiology, Biology* 79:3 (2005) 231-241.
- [142] N.Honda, K. Ishii, T. Terada, T.Nanjo, K. Awazu, Determination of the tumor tissue optical properties during and after photodynamic therapy using inverse Monte Carlo method and double integrating sphere between 350 and 1000 nm, *J Biomedical Optics* 16:5 (2011) 058003.
- [143] T.M.Baran, J.D. Wilson, S. Mitra, J.L.Yao, E.M.Messing, D.L.Waldman, T.H. Foster, Optical property measurements establish the feasibility of photodynamic therapy as a minimally invasive intervention for tumors of the kidney, *J Biomedical Optics* 17:9 (2012) 98002-1.

-
- [144] T.C. Zhu, J.C. Finlay, Prostate PDT dosimetry, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 3:4 (2006) 234-246.
- [145] A. Johansson, J. Axelsson, S. Andersson-Engels, J. Swartling, Realtime light dosimetry software tools for interstitial photodynamic therapy of the human prostate, *Med Phys* 34:11 (2007) 4309-4321.
- [146] J.Swartling, J.Axelsson, G. Ahlgren, K.M.Kalkner, S. Nilsson, S. Svanberg, K. Svanberg, S.Andersson-Engels, System for interstitial photodynamic therapy with online dosimetry: first clinical experiences of prostate cancer, *J Biomedical Optics* 15:5 (2010) 058003.
- [147] T.C.Zhu, M.M. Kim, S.L. Jacques, R. Penjweini, A. Dimofte, J.C. Finlay, C.B. Simone, K.A. Cengel, J. Friedberg, Real-time treatment light dose guidance of Pleural PDT: an update. *Proceedings of SPIE -the International Society for Optical Engineering* (2015) 9308. DOI: 10.1117/12.2080110
- [148] Z.Huang, H.Xu, A.D. Meyers, A.I. Musani, L. Wang, R. Tagg, A.B. Barqawi, Y.K. Chen, Photodynamic therapy for treatment of solid tumors potential and technical challenges, *Technol Cancer Res Treat* 7:4 (2008) 309-320.
- [149] S.A.de Visscher, M.J. Witjes, S. Kascakova, H.J. Sterenberg, D.J. Robinson, J.L.Roodenburg, A. Amelink, In vivo quantification of photosensitizer concentration using fluorescence differential path-length spectroscopy: influence of photosensitizer formulation and tissue location, *J Biomedical Optics* 17:6 (2012) 067001.
- [150] M.Solonenko, R. Cheung, T.M. Busch, A. Kachur, G.M. Griffin, T. Vulcan, T.C. Zhu, H.W.Wang, S.M. Hahn, A.G. Yodh, In vivo reflectance measurement of optical properties, blood oxygenation and motexafin lutetium uptake in canine large bowels, kidneys and prostates, *Phys Med Biol* 47:6 (2002) 857-873.
- [151] H.W.Wang, T.C. Zhu, M.E. Putt, M. Solonenko, J. Metz, A.Dimofte, J. Miles, D.L. Fraker, E. Glatstein, S.M. Hahn, A.G. Yodh, Broadband reflectance measurements of light penetration, blood oxygenation, hemoglobin concentration, and drug concentration in human intraperitoneal tissues before and after photodynamic therapy, *J Biomedical Optics* 10:1 (2005) 14004.
- [152] J.H. Woodhams, A.J. MacRobert, S.G. Bown, The role of oxygen monitoring during photodynamic therapy and its potential for treatment

- dosimetry, *Photochemical Photobiological Sciences* 6:12 (2007) 1246-1256.
- [153] M.W. Reed, A.P. Mullins, G.L. Anderson, F.N. Miller, T.J. Wieman, The effect of photodynamic therapy on tumor oxygenation, *Surgery* 106:1 (1989) 94-99.
- [154] D.F. Wilson, J.M. Vanderkooi, T.J. Green, G. Maniara, S.P. DeFeo, D.C. Bloomgarden, A versatile and sensitive method for measuring oxygen, *Advances Experimental Med Biol* 215(1987) 71-77.
- [155] H.M. Swartz, T. Walczak, Developing in vivo EPR oximetry for clinical use, *Advances Experimental Med Biol* 454 (1998) 243-452.
- [156] J.D. Chapman, M.S. McPhee, N. Walz, M.P. Chetner, C.C. Stobbe, K. Soderlind, M. Arnfield, B.E. Meeker, L. Trimble, P.S. Allen, Nuclear magnetic resonance spectroscopy and sensitizer-adduct measurements of photodynamic therapy-induced ischemia in solid tumors, *J NCI* 83:22(1991) 1650-1659.
- [157] C.L. Davies, T. Ranheim, Z. Malik, E.K. Rofstad, J. Moan, T. Lindmo, Relationship between changes in antigen expression and protein synthesis in human melanoma cells after hyperthermia and photodynamic treatment, *Br J Cancer* 58:3(1988).
- [158] J. Moan, J.V. Johannessen, T. Christensen, T. Espevik, J.B. McGhie, Porphyrin-sensitized photoinactivation of human cells in vitro, *Am J Path* 109:2 (1982) 184-192.
- [159] J. Moan, A.I. Vistnes, Porphyrin photosensitization of proteins in cell membranes as studied by spin-labelling and by quantification of DTNB-reactive SH-groups, *Photochem Photobiol* 44:1 (1986) 15-19.
- [160] J. van Steveninck, T.M. Dubbelman, H. Verweij, Photodynamic membrane damage, *Adv Exp Med Biol* 160 (1983) 227-240.
- [161] D. Kessel, Y. Luo, Photodynamic therapy: a mitochondrial inducer of apoptosis, *Cell Death Differ* 6:1 (1999) 28-35.
- [162] D. Kessel, Y. Luo, Mitochondrial photo- damage and PDT-induced apoptosis, *J Photochem Photobiol B* 42:2 (1998) 89-95.
- [163] L. Wyld, M.W. Reed, N.J. Brown, Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type, *Br J Cancer* 84:10 (2001) 1384-1386.

-
- [164] M. Korbelik, G. Krosli, P.L. Olive, D.J. Chaplin, Distribution of Photofrin between tumour cells and tumour associated macrophages, *Br J Cancer* 64:3 (1991) 508-512.
- [165] H.F. Dvorak, Leaky tumor vessels: consequences for tumor stroma generation and for solid tumor therapy, *Rog Clin Biol Res* 354A (1990) 317-330.
- [166] R.K. Jain, Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Res* 47:12 (1987) 3039-3051.
- [167] L.E. Gerweck, The pH difference between tumor and normal tissue offers a tumor specific target for the treatment of cancer, *Drug Resist Update* 3:1 (2000) 49-50.
- [168] J. Moan, L.W. Ma, V. Iani, On the pharmacokinetics of topically applied 5-aminolevulinic acid and two of its esters, *Int J Cancer* 92:1 (2001) 139-143.
- [169] D.A. Musser, J.M. Wagner, F.J. Weber, N. Datta-Gupta, The binding of tumor localizing porphyrins to a fibrin matrix and their effects following photoirradiation, *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 28 (1980) 505-525.
- [170] I. Freitas, Lipid accumulation: the common feature to photosensitizer-retaining normal and malignant tissue, *J Photochem Photobiol B* 7 (1990) 359-361.
- [171] D. Kessel, HPD: structure and determinants of localization, *Photodynamic therapy of neoplastic diseases* (1990) 1-14.
- [172] G. Jori, Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy, *J Photochem Photobiol B* 36 (1996) 87-93.
- [173] B.A. Allison, P.H. Pritchard, J.G. Levy, Evidence for low-density lipoprotein receptor-mediated uptake of benzoporphyrin derivative, *Br J Cancer* 69 (1994) 833-839.
- [174] M. Soncin, L. Polo, E. Reddi, G. Jori, M.E. Kenney, G. Cheng, et al, Effect of axial ligation and delivery system on the tumor-localising and photosensitising properties of Ge(IV)-octabutoxy-phthalocyanines, *Br J Cancer* 71 (1995) 727-732.

- [175] S.I. Zaidi, N.L. Oleinick, M.T. Zaim, H. Mukhta, Apoptosis during photodynamic therapy-induced ablation of RIF-1 tumors in C3H mice: electron microscopic, histopathologic and biochemical evidence. *Photochem Photobiol* 58 (1993) 771-776.
- [176] D. Mew, C.K. Wat, G.H.N. Towers, J.G. Levy, Photoimmunotherapy: treatment of animal tumors with tumor-specific monoclonal antibody-porphyrin conjugates, *J Immunol* 130 (1993) 1473-1477.
- [177] P.J. Bugelski, C.W. Porter, T.J. Dougherty, Autoradiographic distribution of hematoporphyrin derivative in normal and tumor tissue of the mouse, *Cancer Res* 41 (1981) 4604-4612.
- [178] M. Korbelik, G. Krosol, D.J. Chaplin, Photofrin uptake by murine macrophages, *Cancer Res* 51 (1991) 2251-2255.
- [179] L.E. Gerweck, K. Seetharaman, Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer. *Cancer Res* 56 (1996) 1194-1198.
- [180] J.A. Dickson, S.K. Calderwood, Effects of hyperglycemia and hyperthermia on the pH, glycolysis and respiration of the Yoshida sarcoma in vivo, *J Natl Cancer Inst* 63 (1979) 1371-1381.
- [181] I.F. Tannock, D. Rotin, Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation, *Cancer Res* 49 (1989) 4373-4384.
- [182] A.J. Barrett, J.C. Kennedy, R.A. Jones, P. Nadeau, R.H. Pottier, The effect of tissue and cellular pH on the selective biodistribution of porphyrin-type photochemotherapeutic agents: a volumetric titration study, *J Photochem Photobiol B* 6 (1990) 309-323.
- [183] R. Pottier, J.C. Kennedy, The possible role of ionic species in selective biodistribution of photochemotherapeutic agents toward neoplastic tissue, *J Photochem Photobiol B* 8 (1990) 1-16.
- [184] M. Korbelik, G. Krosol, Cellular levels of photosensitisers in tumors: the role of proximity to the blood supply, *Br J Cancer* 70 (1994) 604-610.
- [185] I. Georgakoudi, M.G. Nichols, T.H. Foster, The mechanism of Photofrin photobleaching and its consequences for photodynamic dosimetry, *Photochem Photobiol* 65(1997) 135-144.

-
- [186] T.H. Foster, R.S. Murant, R.G. Bryant, R.S. Knox, S.L. Gibson, R. Hilf, Oxygen consumption and diffusion effects in photodynamic therapy, *Radiat Res* 126 (1991) 296-303.
- [187] J. Zilberstein, A. Bromberg, A. Frantz, V. Rosenbach-Belkin, A.Kritzman, R. Pfefermann, et al, Light-dependent oxygen consumption in bacteriochlorophyll-serine-treated melanoma tumors: on-line determination using a tissue-inserted oxygen microsensor, *Photochem Photobiol* 65 (1997) 1012-1019.
- [188] S.A. Blant, A. Woodtli, G. Wagnieres, C. Fontollet, H. van den Bergh, P. Monnier, In vivo fluence rate effect in photodynamic therapy of early cancers with tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin, *Photochem Photobiol* 64 (1996) 963-968.
- [189] B.W. Henderson, V.H. Fingar, Oxygen limitation of direct tumor cell kill during photodynamic treatment of a murine tumor model, *Photochem Photobiol* 49 (1989) 299-304.
- [190] B.W. Henderson, V.H. Fingar, Relationship of tumor hypoxia and response to photodynamic treatment in an experimental mouse tumor, *Cancer Res* 47 (1987) 3110-3114.
- [191] R. Bevernaegie, B. Doix, E. Bastien, A. Diman, A. Decottignies, O. Feron, B. Elias, Exploring the photo-toxicity of hypoxic active iridium(III)-based sensitizers in 3D tumor spheroids, *J. Am. Chem. Soc.* DOI: 10.1021/jacs.9b07723
- [192] M.J. Gilissen, L.E. van de Merbel-de Wit, W.M. Star, J.F. Koster, W. Sluiter, Effect of photodynamic therapy on the endothelium-dependent relaxation of isolated rat aortas, *Cancer Res* 53 (1993) 2548-2552.
- [193] V.H. Fingar, T.J. Wieman, K.W. Doak, Role of thromboxane and prostacyclin release on photodynamic therapy-induced tumor destruction, *Cancer Res* 50 (1990) 2599-2603.
- [194] V.H. Fingar, K.A. Siegel, T.J. Wieman, K.W. Doak, The effects of thromboxane inhibitors on the microvascular and tumor response to photodynamic therapy, *Photochem Photobiol* 58 (1993) 393-399.
- [195] S.W. Taber, T.J. Wieman, V.H. Fingar, The effects of aspirin on microvasculature after photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 57 (1993) 856-861.

- [196] M.Korbelik, The role of nitric oxide in the response of solid tumors to photodynamic therapy, *Photochem Photobiol* 65 (1997) 55S-56S.
- [197] J. Shi, P.W. Kantoff, R. Wooster, O.C. Farokhzad, Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities, *Nat. Rev. Cancer* 17 (2017) 20-37. DOI: 10.1038/nrc.2016.108
- [198] K. Ariga, Y.M. Lvov, K. Kawakami, Q. Ji, J.P. Hill, Layer-by-layer self-assembled shells for drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63 (2011) 762-771. DOI: 10.1016/j.addr.2011.03.016
- [199] M. Nakamura, Y. Tahara, S. Fukata, M. Zhang, M. Yang, S. Iijima, M. Yudasaka, Significance of optimization of phospholipid poly(Ethylene glycol) quantity for coating carbon nanohorns to achieve low cytotoxicity, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 90(2017) 662-666. DOI: 10.1246/bcsj.20170003.
- [200] E.J. Hong, D.G. Choi, M.S. Shim, Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials, *Acta Pharm. Sin. B* 6 (2016) 297-307. DOI:10.1016/j.apsb.2016.01.007
- [201] Y. Hao, B. Zhang, C. Zheng, M. Niu, H. Guo, H. Zhang, J. Chang, Z. Zhang, L. Wang, Y. Zhang, Multifunctional nanoplateform for enhanced photodynamic cancer therapy and magnetic resonance imaging, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 151 (2017) 384-393. DOI:10.1016/j.colsurfb.2016.10.039
- [202] P. Rong, K. Yang, A. Srivastan, D.O. Kiesewetter, X. Yue, F. Wang, L. Nie, A. Bhirde, Z. Wang, Z. Liu, G. Niu, W. Wang, X. Chen, Photosensitizer Loaded Nano-Graphene for Multimodality Imaging Guided Tumor Photodynamic Therapy, *Theranostics* 4(2014) 229-239. DOI:10.7150/thno.8070
- [203] Stanisaw Kwiatkowski , Bartosz Knap, Dawid Przystupski, Jolanta Saczko, Ewa Kdzierska, Karolina Knap-Czop, Jolanta Kotliska, Olga Michel, Krzysztof Kotowski, Julita Kulbacka. Photodynamic therapy mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine Pharmacotherapy* 106 (2018) 1098-1107
- [204] C.J. Gomer, M. Luna, A. Ferrario, S. Wong, A. Fisher, N. Rucker, Cellular targets and molecular responses associated with photodynamic therapy, *J Clin Laser Med Surg* 14 (1996) 315-321.

-
- [205] M.L. Agarwal, H.E. Larkin, S.I. Zaidi, H. Mukhtar, N.L. Oleinick, Phospholipase activation triggers apoptosis in photosensitized mouse lymphoma, *Cancer Res* 53 (1993) 5897-5902.
- [206] G.M. Cuenco, T.L. Knisely, L. Averboukh, L. Garrett, S. Castro, A.H. Cincotta, Induction of glucose regulatory proteins in tumor cells after treatment with a benzophenothiazine analogue, *Photochem Photobiol* 65 (1997) 19S.
- [207] M. Korbely, Induction of tumor immunity by photodynamic therapy, *J Clin Laser Med Surg* 14 (1996) 329-334.
- [208] M. Korbely, Photosensitizer distribution and photosensitized damage of tumor tissues, *The fundamental bases of phototherapy*, Milan, 1996.
- [209] M. Ochsner, Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors, *J Photochem Photobiol B* 39 (1997) 1-18.
- [210] O. Kepp, A. Marabelle, L. Zitvogel, G. Kroemer, Oncolysis without viruses-inducing systemic anticancer immune responses, *Nature Reviews Clinical oncology with local therapies*. DOI:10.1038/s41571-019-0272-7
- [211] C. Qian, C. Muchao, L. Zhuang, Local biomaterials-assisted cancer immunotherapy to trigger systemic antitumor responses, *Chem. Soc. Rev.* DOI: 10.1039/c9cs00271e
- [212] C. Fritsch, T. Ruzicka, *Fluorescence Diagnosis and Photodynamic Therapy of Skin Diseases Atlas and Handbook*, Springer Verlag Wien, 2003.
- [213] J. Oliva Encina, C. Rioja Sanz, Diagnóstico fotodinámico (PDD) en el cáncer vesical no músculo-invasivo. Revisión bibliográfica, *Actas Urol Esp* 33:9 (2009).
- [214] J.P. Burgués, G. Conde, J. Oliva, J.M. Abascal, I. Iborra, M. Puer-tas, F. Ordoño, Diagnóstico fotodinámico con hexaminolevulinato en el cáncer vesical no músculo invasivo: experiencia del grupo BLUE / Hexa-minolevulinate photodynamic diagnosis in non-muscle invasive bladder cancer: experience of the BLUE group *Actas urol. esp*, 35:8 (2011) 439-445.
- [215] N. Ramanujam, Fluorescence spectroscopy in vivo. In *Encyclopedia of analytical chemistry*, ed. R. A. Meyers, 2000.

- [216] K. Sokolov, M. Follen, R. Richards-Kortum, Optical spectroscopy for detection of neoplasia, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6 (2002) 651-658. DOI:10.1016/S1367-5931(02)00381-2
- [217] S. R. Bradley, M. S. Thorniley, A review of attenuation correction techniques for tissue fluorescence, *J. R. Soc. Interface* 3 (2006) 1-13. DOI: 10.1098/rsif.2005.0066
- [218] M. Valentine, H. S. Ibbotson, K. Wood, C. Tom, A. Brown, H. Moseley Ronan, Modelling fluorescence in clinical photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol. Sci.* 12 (2013) 203.
- [219] J. Park, W.S. Jang, K.Y. Park, K. Li, S.J. Seo, C.K. Hong, et al, Thermography as a predictor of postherpetic neuralgia in acute herpes zoster patients: A preliminary study, *Skin Res Technol.* 18 (2012) 88-93.
- [220] D. Mikulska, R. Maleszka, M. Parafiniuk, The usefulness of thermography as a diagnostic method in dermatology on the basis of clinical trials in 2001-2005, *Ann Acad Med Stetin* 52 (2006) 91-97.
- [221] A.Cholewka, A.Stanek, A.Siero, Z.Drzazga, Thermography study of skin response due to whole body cryotherapy, *Skin Res Technol.* 18:2(2012) 180-187. DOI:10.1111/j.1600-0846.2011.00550.x. Epub 2011 Apr 21.
- [222] A.Cholewka, Z.Drzazga, G. Knefel, M. Kawecki, M. Nowak, Thermal imaging in hyperbaric oxygen therapy (HBO). *Inynieria Biomedyczna* 16 (2010) 120-122.
- [223] A.Cholewka, Z. Drzazga, A. Michnik, A. Siero, B. Winiowska. Temperature effects of whole cryotherapy determined by termography. *Thermology International* 14 (2004) 57-63.
- [224] A. Cholewka, A. Stanek, S. Kwiatek, A. Siero, Z. Drzazga. Does the temperature gradient correlate with the photodynamic diagnosis parameter numerical colour value (NCV)?. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 10 (2013) 33-38. DOI:10.1016/j.pdpdt.2012.07.001
- [225] J.Murawski, D. Spinczyk, Data acquisition and analysis for fluorescence targeted biopsy Silesian university of technology, *Studia Informatica* 31:2A (2010) 89.
- [226] C. Song, V. Appleyard, K. Murray, T. Frank, W. Sibbett, A. Cuschieri, A. Thompson. Thermographic assessment of tumor growth in mouse xenografts, *Int. J. Cancer:* 121 (2007) 1055-1058.

-
- [227] M.T.Garcia-Romero, A. Chakkittakandiyil, E. Pope. The role of infrared thermography in evaluation of proliferative infantile hemangiomas. Results of a pilot study, *Int J Dermatol.* 53 (2014) 216-227.
- [228] P.Boixeda, et al, Perspectivas de futuro en láseres, nuevas tecnologías y nanotecnología en dermatología, *Actas Dermosifiliogr*, 2014. DOI: 10.1016/j.ad.2014.07.002
- [229] M.D.Stringasci, Avaliação termográfica para a detecção de lesões cutâneas clinicamente semelhantes, Universidade de SÃO PAULO Instituto de Física de SÃO CARLOS, tesis 2017.
- [230] Billie Ruth Bird, B.A. Francis T. Forrester. Basic laboratory techniques in cell cultures. 1981.
- [231] Ma. Hui-li, J. Qiao, H. Siyuan, W. Yan, C.T. Jin, W. Dongliang, G.Yaling, Z. Guozhang, L. Xing-Jie, Multicellular Tumor Spheroids as an In Vivo Like Tumor Model for Three Dimensional Imaging of Chemotherapeutic and Nano Material Cellular Penetration, *Molecular Imaging* 11:6 (2012) 487-498.
- [232] I. Rizvi , S. Anbil, N. Alagic, J. P. Celli, L. Z. Zheng, A. Palanisam, M. D. Glidden, B. W. Pogue, T. Hasan, PDT Dose Parameters Impact Tumoricidal Durability and Cell Death Pathways in a 3D Ovarian Cancer Model, *Photochem Photobiol.* 89:4 (2013) 942-952. DOI:10.1111/php.12065.
- [233] M.L. Kripke, E. Gruys, I.J. Fidler, Metastatic heterogeneity of cells from an ultraviolet light-induced murine fibrosarcoma of recent origin, *Cancer Res.* 38 (1978) 2962-2967.
- [234] R. Kearney, A. Basten, D.S. Nelson, Cellular basis for the immune response to methylcholanthrene-induced tumors in mice, Heterogeneity of effector cells, *Int. J. Cancer* 15 (1975) 438-450.
- [235] M. Arjomandnejad, A. Muhammadnejad, M. Haddadi, N. Sherkat-Khameneh, S. Rismanchi, S. Amanpour, S. Muhammadnejad, HeLa Cell Line Xenograft Tumor as a Suitable Cervical Cancer Model: Growth Kinetic Characterization and Immunohistochemistry Array, *Arch Iran Med.* 17:4 (2014) 273-277.
- [236] Zemax company website. Zemax,2019.

- [237] R.E. Fischer, B. Tadic-Galeb, P.R. Yoder, *Optical System Design* (2nd ed.), New York, 2008.
- [238] W.J. Smith, *Modern Optical Engineering*, 4th ed., 2007.
- [239] Radiant, Zemax merge with backing from Evergreen Pacific, *Bizjournal*, 2013.
- [240] J.M. Geary, *Introduction to Lens Design: With Practical Zemax Examples*. Willmann-Bel, 2002.
- [241] I. Moreno, C-C. Sun, Modeling the radiation pattern of LEDs, *Opt. Express* 16 (2008) 1808-1819.
- [242] P. Agostinis, K. Berg, K.A. Cengel, T.H. Foster, A.W. Girotti, S.O. Gollnick, S.M. Hahn, M.R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B.C. Wilson, J. Golab, Photodynamic therapy of cancer: an update, *CA Cancer J. Clin.* 61 (2011) 250-281.
- [243] M.H. Teiten, L. Bezdetnaya, P. Morliere, R. Santus, F. Guillemin, Endoplasmatic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of *Foscan*[®] localisation in cultured tumour cells, *Brit. J. Cancer* 88 (2003) 146-152.
- [244] M.E. Etcheverry, M.A. Pasquale, A. Gutiérrez, S. Bibé, C. Ponzinibio, H. Poteca, M. Garavaglia, Photodynamic therapy in fibrosarcoma BALB/c animal model: Observation of the rebound effect, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 21 (2018) 98-107.
- [245] M.E. Etcheverry, M.A. Pasquale, M. Garavaglia, Photodynamic therapy of HeLa cell cultures by using LED or laser sources, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 160 (2016) 271-277.
- [246] S. Anbil, I. Rizvi, J.P. Celli, N. Alagic, T. Hasan, A photobleaching-based PDT dose metric predicts PDT efficacy over certain BPD concentration ranges in a three-dimensional model of ovarian cancer, *Progress in Biomedical Optics and Imaging- Proceeding of SPIE* (2017) 8568.
- [247] I. Rizvi, S. Anbil, N. Alagic, J.P. Celli, L.Z. Zheng, A. Palanisami, M.D. Glidden, B.W. Pogue, T. Hasan, PDT dose parameters impact tumoricidal durability and cell death pathways in a 3D ovarian cancer model, *Photochem. Photobiol.* 89 (2013) 942-952.

-
- [248] A.L. Maas, S.L. Carter, E.P. Wileyto, J. Miller, M. Yuan, G. Yu, A.C. Durham, T.M. Busch, Tumor vascular microenvironment determines responsiveness to photodynamic therapy, *Cancer Res.* 72 (2012) 2079-2088.
- [249] C. Michiels, C. Tellier, O. Feron, Cycling hypoxia: a key feature of the tumor microenvironment, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Rev. Oncancer* 1866 (2016) 7686.
- [250] J.A. Ju, I. Godet, I.C. Ye, J. Byun, H. Jayatilaka, S.J. Lee, L. Xiang, D. Samanta, M.H. Lee, P.-H. Wu, D. Wirtz, G.L. Semenza, D.M. Gilkes, Hypoxia selectively enhances integrin $\alpha 5$ receptor expression in breast cancer to promote metastasis, *Mol. Cancer Res.* 15 (2017) 1-12.
- [251] C. Sheng, B.W. Pogue, H. Dehghani, S.A. ÓHara, P.J. Hoopes, Numerical light dosimetry in murine tissue analysis of tumor curvature and angle incidence effects upon fluence in the tissue, In *Optical methods for tumor treatment and detection. Mechanisms and techniques in photodynamic therapy VII*, in: D. Kessel (Ed.), *Proc. of SPIE*, 4952 (2003) 39-47.
- [252] R. Cheung, M. Solonenko, T.M. Busch, F. Del Piero, M.E. Putt, S.M. Hahn, A.G. Yodh, Correlation of in vivo photosensitizer fluorescence and photodynamic-therapy-induced depth of necrosis in a murine tumor model, *J. Biomed. Opt.* 8 (2003) 248-252.
- [253] P. Cramers, M. Ruevekamp, H. Oppelaar, O. Dalesio, P. Baas, F.A. Stewart, *Foscan*[®] uptake and tissue distribution in relation to photodynamic efficacy, *Br. J. Cancer* 88 (2003) 283-290.
- [254] L. Morlet, V. Vonarx-Coinsmann, P. Lenz, M.T. Foulter, L.X. de Brito, C. Stewart, T. Patrice, Correlation between meta(tetrahydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) biodistribution photodynamic effects in mice, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 28 (1995) 25-32. DOI:10.3892/or.2013.2220
- [255] C.P. Sabino, A.M. Deana, D.F.T. Silva, C.M. França, T.M. Yoshimura, M.S. Ribeiro, Optical properties of mice skin for optical therapy relevant wavelengths: influence of gender and pigmentation, *Proc. of SPIE Mechanisms for Low-Light Therapy X* (2015) 93090D. DOI:10.1117/12.2080853
- [256] J. Johansson, R. Berg, K. Svanberg, S. Svanberg, Laser-induced fluorescence studies of normal and malignant tumor tissue of rat following

- intravenous injection of amino levulinic acid, *Laser Surg. Med.* 20 (1997) 272-274.
- [257] W. Alian, S. Andersson-Engels, K. Svanberg, S. Svanberg, Laser-induced fluorescence studies of meso-tetra(hydroxyphenyl)chlorin in malignant and normal tissues in rats, *Br. J. Cancer* 70 (1994) 980-885.
- [258] H.J. Jones, D.I. Vernon, S.B. Brown, Photodynamic therapy effect of m-THPC (*Foscan*[®]) in vivo: correlation with pharmacokinetics, *Brit. J. Cancer* 89 (2003) 398-404.
- [259] P. Cramers, M. Ruevekamp, H. Oppelaar, O. Dalesio, P. Baas, F.A. Stewart, *Foscan*[®] uptake and tissue distribution in relation to photodynamic efficacy, *Brit. J. Cancer* 88 (2003) 283-290.
- [260] H.S. de Bruijn, S. Brooks, A. van der Ploeg-van den Heuvel, T.L.M. ten Hagen, E.R.M. de Haas, D.J. Robinson, Light fractionation significantly increases the efficacy of photodynamic therapy using BF-200 ALA in normal mouse skin, *PLoS One* 11 (2017) e0148850. DOI:10.1371/journal.pone.0148850
- [261] S.M. Hahn, M.E. Putt, J. Metz, D.B. Shin, E. Rickter, C. Menon, D. Smith, E. Glatstein, D.L. Fraker, T.M. Busch, Photofrin uptake in tumor and normal tissues of patients receiving intraperitoneal photodynamic therapy, *Clin. Cancer Res.* 12 (2006) 54645470.
- [262] T.J.L. Schreurs, S.J. Hectors, I. Jacobs, H. Grull, K. Nicolay, G.J. Strijkers, Quantitative multi-parametric magnetic resonance imaging of tumor response to photodynamic therapy, *PLoS One* 11 (2016) e0165759. DOI:10.1371/journal.pone.0165759
- [263] B. Doix, E. Bastien, A. Rambaud, A. Pinto, C. Louis, V. Grégoire, O. Riant, O. Feron, Preclinical Evaluation of White Led-Activated Non-porphyrinic Photosensitizer OR141 in 3D Tumor Spheroids and Mouse Skin Lesions, *Front. Oncol.* 8 (2018) 393. DOI: 10.3389/fonc.2018.00393
- [264] Ghosh I, Mittal S, Banerjee D, Chowdhury N and Basu P 2015 Study of Correlation of Cervical Epithelial Thickness With the Grade of Colposcopic Abnormality *Int. J. Gynecol. Pathol.* 35 264-274
- [265] MartínezAbaunza V E, Mendoza Castellanos A, Uribe Pérez C J and García Ayala E 2005 Computational model for squamous cells characterization during cervical smear cytology *Rev. Colomb. Biotecnol.* 7 35-46

-
- [266] D.J. Brenner, L.R. Hlatky, P. Hahnfeldt, Y. Huang, R.K. Sachs, The Linear-Quadratic Model and Most Other Common Radiobiological Models Result in Similar Predictions of Time-Dose Relationships, *Radiat. Res.* 150 (1998) 83-91.
- [267] L. Helander, H.E. Krokan, A. Johnsson, O.A. Gederaas, and K. Plaetzer, Red versus blue light illumination in hexyl 5-aminolevulinate photodynamic therapy: the influence of light color and irradiance on the treatment outcome in vitro, *Journal of Biomedical Optics* 19 (2014) 088002.
- [268] P. Grosjean, G. Wagnieres, C. Fontollet, H. van den Bergh, P. Monnier, Clinical photodynamic therapy for superficial cancer in the oesophagus and the bronchi: 514 nm compared with 630 nm light irradiation after sensitization with Photofrin 11, *Oncology Reports* 29 (2013) 911-916.
- [269] Z. Jamali, S. Marjaneh Hejazi, S. Mohsen Ebrahimi, H. Moradi-Sardareh, M. Paknejad, Effects of LED-Based photodynamic therapy using red and blue lights, with natural hydrophobic photosensitizers on human glioma cell line T, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 21 (2018) 50-54.
- [270] J.O. Yoo, K-S Ha, New insights into the Mechanisms for Photodynamic Therapy-Induced Cancer Cell Death, *Int. Ver. Cell. Mol. Biol.* 295 (2012) 139-174.
- [271] J.C. Finlay, S. Mitra, M.S. Patterson, T.H. Foster, Photobleaching kinetics of Photofrin in vivo and in multicell tumour spheroids indicate two simultaneous bleaching mechanisms, *Phys. Med. Biol.* 49 (2004) 4837-60.
- [272] M.A.C. Huergo, M.A. Pasquale, A.E. Bolzán, P. González, A.J. Arvia, Dynamics and Morphology Characteristics of Cell Colonies with Radially Spreading Growth Fronts, *Phys. Rev. E* 84 (2011) 021917.
- [273] A. Brú, S. Albertos, J.L. Subiza, J.L. García-Asenjo, I. Brú, The universal dynamics of tumor growth, *Biophys. J* 85 (2003) 2948-2961.
- [274] M.A.C. Huergo, N.E. Muzzio, M.A. Pasquale, A.E. Bolzán, P. González, A.J. Arvia, Dynamic scaling analysis of two-dimensional cell colony fronts in a gel medium: A biological system approaching a quenched Kardar-Parisi-Zhang universality, *Phys Rev. E* 90 (2014) 22706/1-6.

- [275] J.S. Dysart, M.S. Patterson, Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells in vitro, *Phys. Med. Biol.* 50 (2005) 2597-616.
- [276] P. Hillemmans, F. Garcia, K. U. Petri, V. Dvorak, O. Sadvovsky, O-E. Iversen, M. H. Einstein, A randomized study of hexaminolevulinate photodynamic therapy in patients with cervical intraepithelial neoplasia 1 / 2, *Am. J. Obstetric Gynecol.* (2015) 495e1-7. DOI: 10.1016/j.ajog.2014.10.1107.
- [277] A.T. Dijkstra, I.M.L Majoie, J.W.F Van Dongen, H. Van Weelden, W.A. Van Vloten, Photodynamic therapy with violet light and topical -aminolaevulinic acid in the treatment of actinic keratosis, Bowens disease and basal cell carcinoma, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 15 (2001) 550-554.
- [278] L-W Ma, K.P. Nielsen, V. Ioni, J. Moan, A New Method for Photodynamic Therapy of Melanotic Melanoma Effects of Depigmentation with Violet Light Photodynamic Therapy, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 26 (2007) 165-172.
- [279] A. Bansal, F. Yang, T. Xi, Y. Zhang, J.S. Ho, In vivo wireless photonic photodynamic therapy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115 (2018) 1469-1474.
- [280] P. Brondon, I. Stadler, R.J. Lanzafame, Pulsing influences photoradiation outcomes in cell culture, *Lasers Surg Med* 41 (2009) 222-226.
- [281] P. Bolton, S. Young, M. Dyson, Macrophage responsiveness to light therapy: a dose response study, *Laser Ther* 2 (1990) 101-106.
- [282] N.C.de Morais, A.M. Barbosa, M.L. Vale, et al, Anti-inflammatory effect of low-level laser and light-emitting diode in zymosan-induced arthritis, *Photomed Laser Surg* 28 (2010) 227-232
- [283] D.B. Barolet, Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology, *Semin Cutan Med Surg* 27 (2008) 227-238.
- [284] V.S. Ghate, K.S. Ng, W. Zhou, et al, Antibacterial effect of light emitting diodes of visible wavelengths on selected foodborne pathogens at different illumination temperatures, *Int J Food Microbiol* 16:166 (2013) 399-406.

-
- [285] A. Wunsch, K. Matuschka, A controlled trial to determine the efficacy of red and near-infrared light treatment in patient satisfaction, reduction of fine lines, wrinkles, skin roughness, and intradermal collagen density increase, *Photomed Laser Surg* 32 (2014) 93-100.
- [286] T.J. Dougherty, G.B.Grindey, R. Fiel, K.R. Weishaupt, D.G. Boyle, Photoradiation therapy. II, Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light, *J Natl Cancer Inst* 55 (1975) 115-121
- [287] K. Kalka, H. Merk, H. Mukhtar, Photodynamic therapy in dermatology, *J Am Acad Dermatol* 42 (2000) 389-413.
- [288] C.R. Simpson, M. Kohl, M. Essenpreis, M.Cope, Near-infrared optical properties of ex vivo human skin and subcutaneous tissues measured using the Monte Carlo inversion technique, *Phys Med Biol* 43(1998) 2465-2478.
- [289] E.Sorbellini, M.Rucco, F.Rinaldi, Photodynamic and photobiological effects of light-emitting diode (LED) therapy in dermatological disease: an update, *Lasers in Medical Science* 33 (2018) 1431-1439.DOI:10.1007/s10103-018-2584-8
- [290] Stapleton M, Rodes LE.: Photosensitizers for photodynamic therapy of cutaneous disease. *J Dermatol Treat* 14 (2003) 107.
- [291] N.S.Uebelhoer, J.S. Dover, Photodynamic therapy for cosmetic applications. *Dermatologic therapy* 18 (2005) 242.
- [292] C. Vicentini, J.-B. Tylcz, C. Maire, S. Mordon, L. Mortier, Terapia fotodinámica, *EMC - Dermatología* 51:3 (2017) 1-8. DOI: 10.1016/S1761-2896(17)85934-3
- [293] A. Wunsch, K. Matuschka, A controlled trial to determine the efficacy of red and near-infrared light treatment in patient satisfaction, reduction of fine lines, wrinkles, skin roughness, and intradermal collagen density increase, *Photomed Laser Surg* 32 (2014) 93-100.
- [294] T.J. Dougherty, G.B.Grindey, R. Fiel, K.R. Weishaupt, D.G. Boyle, Photoradiation therapy. II, Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light, *J Natl Cancer Inst* 55 (1975) 115-121
- [295] K. Kalka, H. Merk, H. Mukhtar, Photodynamic therapy in dermatology, *J Am Acad Dermatol* 42 (2000) 389-413.

- [296] C.R. Simpson, M. Kohl, M. Essenpreis, M.Cope, Near-infrared optical properties of ex vivo human skin and subcutaneous tissues measured using the Monte Carlo inversion technique, *Phys Med Biol* 43(1998) 2465-2478.
- [297] E.Sorbellini, M.Rucco, F.Rinaldi, Photodynamic and photobiological effects of light-emitting diode (LED) therapy in dermatological disease: an update, *Lasers in Medical Science* 33 (2018) 1431-1439. DOI:10.1007/s10103-018-2584-8
- [298] Stapleton M, Rodes LE.: Photosensitizers for photodynamic therapy of cutaneous disease. *J Dermatol Treat* 14 (2003) 107.
- [299] N.S.Uebelhoer, J.S. Dover, Photodynamic therapy for cosmetic applications. *Dermatologic therapy* 18 (2005) 242.
- [300] C. Vicentini, J.-B. Tylcz, C. Maire, S. Mordon, L. Mortier, Terapia fotodinámica, *EMC - Dermatología* 51:3 (2017) 1-8. DOI: 10.1016/S1761-2896(17)85934-3