

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**



***“FOTOACTIVACIÓN DE RODAMINAS POR ABSORCIÓN DE 1064 nm
PARA TERAPIA FOTODINÁMICA DE CÉLULAS DE CÁNCER”***

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOINGENIERÍA MÉDICA**

**PRESENTA:
P.L.B.M. ALBERTO ARCOS NÚÑEZ**

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. EN C.S. LILIANA ARANDA LARA**

**CO-ASESORA DE TESIS:
DRA. EN Q. KEILA ISAAC OLIVÉ**

**REVISORES:
DR. EN C. JOSÉ JAVIER REYES LAGOS
DR. EN C. EUGENIO TORRES GARCÍA**

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, OCTUBRE 2021

EL PRESENTE PROYECTO SE FINANCIÓ
CON RECURSOS DEL PROYECTO UAEM
CON CLAVE 6251/2020CIB OTORGADA EN
EL PERIODO 2020-2021 POR LA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE MÉXICO.

CONTENIDO

CONTENIDO.....	2
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	6
MARCO TEÓRICO.....	8
Proceso de célula sana a célula de cáncer	8
Terapia fotodinámica	11
Antecedentes del uso de la FDT como tratamiento al cáncer	12
Procesos efectores de la terapia fotodinámica tipo I y II	14
Destrucción directa de las células tumorales por ROS citotóxicos	15
Daño vascular al tumor por los ROS citotóxicos	16
Respuesta inflamatoria local	16
Características (cualidades y ventajas)	16
Limitaciones y/o Consecuencias	17
Fotosensibilizadores.....	17
Primera generación de fotosensibilizadores.....	20
Segunda generación de fotosensibilizadores.....	20
Tercera generación de fotosensibilizadores	22
Absorción de dos fotones.....	23
Terapia Fotodinámica de dos fotones.....	25
Radiación de Cerenkov y características	27
Radionúclido emisor de positrones: ^{18}F	30
Análogo de la glucosa: ^{18}F -FGD y su acumulación en las células de cáncer.....	32
Terapia fotodinámica inducida por radiación de Cerenkov	35
Rodamina (Rodamina 6G, Rodamina 123, Rodamina B).....	37
Características	37
Usos.....	40
Asociación en tratamientos con terapia fotodinámica	41
Terapias Convencionales: Quimioterapia y Radioterapia	41
Quimioterapia	41

Funcionamiento de la quimioterapia	42
Agentes quimioterapéuticos y su importancia	42
Radioterapia	43
Funcionamiento de la radioterapia	44
Efectos positivos y negativos de la quimioterapia y radioterapia en el organismo	44
Uso de agentes quimioterapéuticos en terapia fotodinámica	45
Metotrexato	46
Doxorrubicina	47
Bleomicina	48
Paclitaxel	49
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	51
JUSTIFICACION	52
HIPÓTESIS	53
OBJETIVOS	53
MÉTODOLOGÍA.....	54
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
CONCLUSIONES	66
IMPLICACIONES ÉTICAS.....	66
BIBLIOGRAFÍA.....	67

RESUMEN

La terapia fotodinámica usa fuentes de luz para excitar moléculas fotosensibles (fotosensibilizador) y producir especies reactivas de oxígeno (ROS), los cuales pueden inducir daño o muerte celular. Las ROS se producen cuando el fotosensibilizador, en su estado excitado triplete ($^3\text{PS}^*$), experimenta reacciones de transferencia electrónica o protónica (tipo I) o transferencia de energía (tipo II). Particularmente, en la *reacción tipo I*, la transferencia electrónica ocurre entre $^3\text{PS}^*$ y una biomolécula (ácido fólico o ADN) para originar ROS, siendo eficaz en condiciones deficientes de O_2 . La terapia fotodinámica convencional está limitada por el uso de fuentes de luz con bajo porcentaje de transmisión en piel. Para resolver dicho obstáculo, se utilizan longitudes de onda de 800 a 1100 nm las cuales penetran la piel y activan fotosensibilizadores localizados en regiones profundas. La eficacia de la terapia fotodinámica depende en gran medida de la localización subcelular del fotosensibilizador ya que determina el mecanismo de muerte celular. Al considerar que las rodaminas se acumulan en las mitocondrias de células de cáncer y en particular que, la rodamina 6G foto-excitada produce daño a través de reacciones de tipo I, el presente trabajo tiene como objetivo comparar la ocurrencia de reacciones de transferencia tipo I al irradiar Rodamina 6G (R6G), Rodamina 123 (R123) y Rodamina B (RB) con 1064 nm y evaluar *in vitro* su potencial como fotosensibilizadores tipo I para terapia fotodinámica mediante excitación con 1064 nm. Para lograr este objetivo, se estimó la ocurrencia de reacciones tipo I en R6G, R123 y RB por acción de la irradiación con 1064 nm. El análisis se realizó por fluorescencia utilizando la tasa de ruptura del ácido fólico como indicador de la actividad del fotosensibilizador. Se evaluó la producción del ion radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ por análisis UV-Vis utilizando el indicador redox DCPIP. Se evaluó la captación celular de las R6G, R123 y RB por absorbancia UV-Vis y microscopia de fluorescencia. Se evaluó la citotoxicidad y producción de ROS a nivel *in vitro* de la R6G o R123 o RB inducida por irradiación con 1064 nm. En el presente trabajo se muestra que, a través de irradiación con luz láser de 1064 nm, los tres compuestos de rodamina estudiados (R6G, R123 y RB) presentan reacciones de transferencia de tipo I con

el ácido fólico en el siguiente orden: R6G> RB> R123. A nivel *in vitro*, la irradiación de las tres R produce un efecto negativo sobre la viabilidad celular, siendo R6G + 1064 nm la que mayor muerte celular induce. La producción de ROS en las células T47D fue mayor el núcleo celular cuando se trataron con R6G+1064 nm en comparación con R6G o 1064 nm. Este trabajo muestra que la fotoactivación de la R6G con 1064 nm representa una alternativa para ser utilizado en PDT de dos fotones.

INTRODUCCIÓN

La terapia fotodinámica, llamada también PDT (por sus siglas en inglés), es una modalidad de tratamiento que requiere la aplicación de un fotosensibilizador que reacciona a una longitud de onda específica para producir destrucción celular a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (1). Los ROS se producen por acción de reacciones de transferencia electrónica o protónica (tipo I) o transferencia de energía (tipo II) (2). Si bien la PDT es una técnica potencial para un nuevo tratamiento, puede presentar restricciones que limitan dicho potencial, como el uso de fuentes de luz externas (200 – 600 nm), pues la capacidad de penetración de estas fuentes no es la mejor para llegar a tejidos profundos (3)(4). Sin embargo, para compensar esta deficiencia se sugieren estrategias que hagan posible el acceso a los tejidos dañados profundos, tales como la absorción de dos fotones (5). En esta técnica se emplea luz láser de alta energía en el infrarrojo cercano (800-1100 nm), cuyo principio físico consiste en excitar a una molécula a través de la absorción simultánea de dos fotones de bajo nivel energético para así transferir energía a las biomoléculas cercanas (5).

El resultado de la PDT depende en gran medida de la localización subcelular del fotosensibilizador debido a la vida corta de los ROS generados después de su excitación. La localización del fotosensibilizador en los orgánulos es crítica para la eficacia de la PDT, ya que determina el mecanismo de muerte celular (6)(7)(8).

Las rodaminas son moléculas orgánicas altamente fluorescentes con baja toxicidad, alta fotoestabilidad, buena solubilidad en agua y capacidad de generar ROS. La naturaleza catiónica de las rodaminas a pH fisiológico facilita su acumulación en las mitocondrias de células de cáncer (9)(10)(11)(12)(13)(14). Recientemente, se reportó que la rodamina 6G foto-excitada a 532 nm produce daño a biomoléculas a través de reacciones de transferencia tipo I (15). Sin embargo, no se ha probado la ocurrencia de esta reacción con otros tipos de rodamina ni tampoco la excitación con 1064 nm; Así se abre la posibilidad de experimentar con otras rodaminas y usar excitación de 1064 nm. para llegar a una mayor profundidad dentro de los tejidos y no perder el potencial de los haces de luz en las capas superiores de la piel. Lo

anterior brinda la oportunidad de evaluar el potencial uso de diferentes rodaminas como fotosensibilizadores para inducir reacciones de transferencia tipo I y ampliar las posibilidades de la PDT en profundidad cuando se exciten con irradiación a 1064 nm. Por lo que, el objetivo de este trabajo fue comparar la ocurrencia de reacciones de transferencia tipo I al irradiar Rodamina 6G, Rodamina 123 y Rodamina B con 1064 nm y evaluar *in vitro* su potencial como fotosensibilizadores tipo I para terapia fotodinámica mediante excitación a 1064 nm.

MARCO TEÓRICO

Proceso de célula sana a célula de cáncer

Cuando se habla de neoplasias se debe saber que éstas se desarrollan como resultado de ciertas alteraciones genéticas que se van acumulando de forma continua y con progresión a formar un tumor. En el lapso comprendido entre los últimos 10 a 15 años se ha logrado un progreso relevante para la comprensión de las alteraciones genéticas en varios tipos y grados de malignidad de células dañadas (16).

Para entender un fundamento sobre lo que es el cáncer es necesario saber cómo es la progresión del ciclo celular. Este se encuentra regido por la activación secuencial de las quinasas dependientes de ciclina (CDK). Una vez que las CDK fueron activadas hacen una fosforilación, la RNA polimerasa II para asegurar la transcripción de las proteínas de la biosíntesis. Para esto se requiere un suministro de energía que es producido por la fosforilación oxidativa (OXPHOS) y/o la glucólisis. Por lo general, se sabe que las células de cáncer suelen tener una glucólisis aeróbica mejorada, es decir, una producción de lactato incluso cuando no existe la presencia de oxígeno, dicho mecanismo, es conocido como el efecto Warburg, siendo el que da origen a sus cualidades de proliferación y agresividad (17)(18)(19).

El efecto Warburg favorece la invasividad y la resistencia a la apoptosis. Dadas sus características puede ser considerado como un metabolismo de reprogramación promovido por la hipoxia y el factor HIF-1, el cMyc y otros oncogenes que promueven los fenotipos agresivos. Este efecto se relaciona con un cambio del metabolismo oxidativo, que además; se relaciona con la inhibición de la piruvato deshidrogenasa (PDH) y la inhibición del complejo IV de la cadena respiratoria celular (17)(18).

Como proceso irreversible, el ciclo celular sostiene una secuencia ordenada de tres fases controladas: la interfase (compuesto del segundo gap G1, la síntesis S y el segundo gap G2), la mitosis y la citocinesis. Para poder controlar este conjunto de

tres etapas, se necesitan mecanismos complejos que regulen este ciclo que fueron estudiados en otros mamíferos, identificando poco más veinte tipos de CDK, como la DCK1 a la DCK6 que tienen un papel en la progresión del ciclo celular, y que se encuentra interrumpido en células de cáncer. La activación de las CDK es dependiente de la degradación y síntesis de sus respectivas ciclinas reguladoras, después los dos factores de crecimiento inician la entrada en la fase G1 para inducir la activación de la ciclina D1, D2 y D3, para que interactúen con CDK4 o CDK6. Con el aumento en su interacción, estas últimas dan como resultado la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRB) y la inactivación del gen p53 (proteína supresora de tumores), entonces se induce la liberación de E2F del complejo pRB-E2F. Con esta vía se llega a la inactivación o restricción de la etapa G1 de la interfase, deteniéndose así el ciclo celular porque se detecta una disponibilidad de nutrientes baja. Posteriormente, la activación de la ciclina E-CDK2 permite la transcripción de los genes necesarios para poder entrar a la fase S. Del mismo modo la ciclina A-CDK2 impulsa la progresión en S y la ciclina A-CDK1 en la fase G2, mientras que la ciclina B-CDK1 regula la progresión desde la fase G2 tardía hasta la salida de la mitosis. Evidentemente la presencia de las quinasa A y B son críticas para la progresión a través de la mitosis, la segregación de cromosomas y la citocinesis (20)(21)(22).

Cuando el ciclo celular es alterado por el cáncer las células pierden la mayoría de sus controladores de inhibición por la mutación o inactivación de los genes supresores y por la sobreexpresión de los oncogenes. En su mayoría, estas alteraciones son resultado de una transcripción aberrante de la regulación positiva de ciclinas-CDK, lo que lleva a una progresión mala e incontrolada del ciclo celular y mitosis (17).

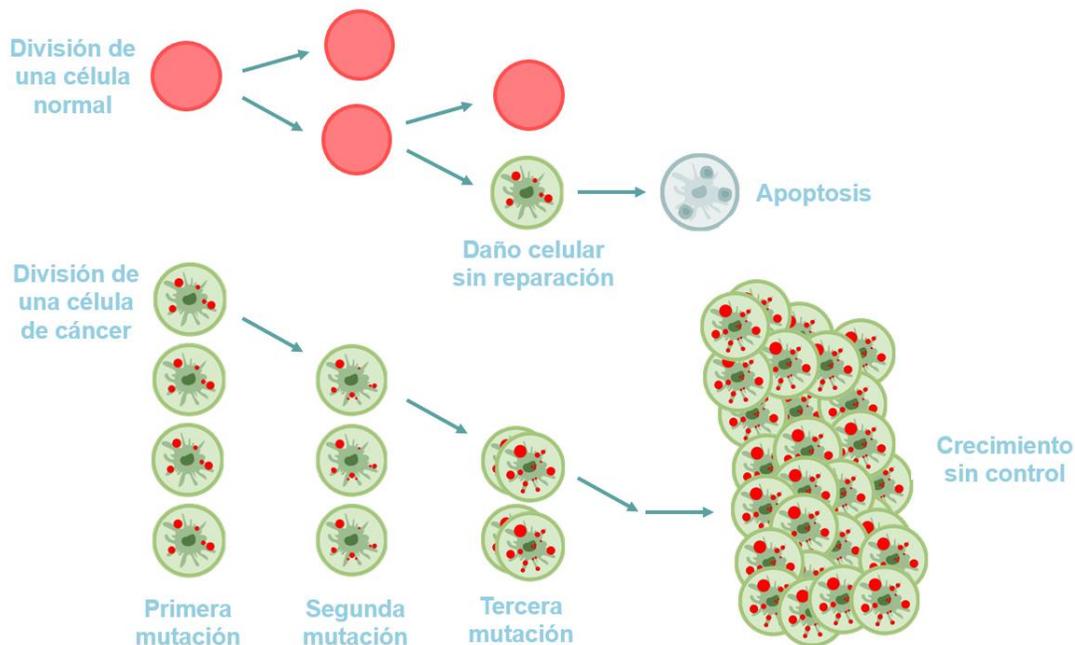


Fig. 1 La división celular a través de la mitosis es un proceso que tiene varios puntos de control para asegurar que la célula se reproduzca de manera correcta y sana. Sin embargo, el cáncer aparece cuando el material genético de la célula cambia de forma abrupta sin una razón aparente y los puntos de control en el ciclo celular dejan de funcionar adecuadamente, haciendo que la célula se comience a dividir de manera apresurada y que no mueran cuando deben de hacerlo, ocasionando que la población celular dañada crezca de manera exponencial y sin control.

La base del proceso del cáncer tiene principio en un daño genético no letal o mutación que puede adquirirse por diversas fuentes, por ejemplo la acción de agentes ambientales o bien puede ser hereditario de una línea germinal directa, otras pueden ser espontáneas y sin una razón aparente. De forma concreta un tumor se forma por la expansión clonal de una única célula precursora que presenta daño genético, es decir, células monoclonales (23).

Una vez que comenzó el proceso, las principales dianas del daño genético son cuatro clases de genes reguladores: primero los protooncogenes que son promotores para el crecimiento; segundo los genes supresores tumorales que son los encargados de inhibir el crecimiento; tercero los genes reguladores de la apoptosis y cuarto, los genes relacionados a la reparación del ADN. El resultado son los alelos mutantes, que son cada una de las formas alternativas que puede tener un mismo gen que se diferencian en su secuencia y que se puede manifestar

en modificaciones concretas de esos protooncogenes que se consideran dominantes, porque transforman a las células sin importar la presencia de su equivalente normal, para que el proceso se pueda dar. Típicamente se deben dañar ambos alelos normales de los genes supresores tumorales antes de que pueda producirse la transformación de las células. A pesar de esta regla, puede haber excepciones a la regla, pues en ocasiones, la pérdida de solo un alelo en un gen supresor tumoral reduce los niveles o actividad de la proteína para ya no tener ningún tipo de freno en la proliferación y la supervivencia celular. Este hecho indica que la dosis en la que se dé el gen depende del hecho de requerir dos copias para una función normal. De este modo, los genes que regulan la apoptosis pueden comportarse como protooncogenes o genes supresores tumorales. El proceso de las mutaciones en los genes de reparación del ADN no transforman directamente las células, entonces se afecta la proliferación o la apoptosis (23).

Finalmente, el proceso por el que se llega al cáncer, comenzando en una célula sana que mutó hasta la aglomeración para la formación de tumores e incluso de metástasis, es una serie de múltiples pasos, que involucran factores del fenotipo y del genotipo. Como se describe con anterioridad, las neoplasias malignas tienen varias cualidades fenotípicas, como su excesivo crecimiento, capacidad de formar la metástasis para invadir lugares distantes al tumor original o de invadir de forma local y concentrarse en una sola área. Sin mencionar, que se identificó la existencia de un fenómeno conocido como progresión tumoral que es un período de tiempo en el que los tumores se tornan más agresivos y adquieren un mayor potencial de malignidad (23).

Terapia fotodinámica

La terapia fotodinámica, llamada también PDT (por sus siglas en inglés), es una modalidad de tratamiento que requiere la aplicación de un fotosensibilizador que reacciona a una longitud de onda específica para producir destrucción celular a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Los ROS se producen por acción de reacciones de transferencia electrónica o protónica (tipo I) o transferencia de energía (tipo II) (1).

Antecedentes del uso de la FDT como tratamiento al cáncer

La luz ha sido utilizada desde hace miles de años para terapia, por ejemplo, en el antiguo Egipto, India y China, se utilizó para tratar una variedad de patologías, tales como el raquitismo, el vitíligo y la psoriasis. A finales del siglo XIX, Niels Finsen desarrolló una técnica para tratar algunas enfermedades cutáneas, partiendo del hecho de que la exposición a la luz roja evitaba la formación de pústulas asociadas a la viruela. También se usó la luz ultravioleta proveniente del sol con la intención de tratar los efectos de la tuberculosis cutánea (24).

Para 1990 comenzó una revolución en el campo de la física óptica, posterior al premio nobel que ganó Finsen por sus descubrimientos en dicha área, varios investigadores que se inspiraron en su trabajo experimentaron y observaron que el método de aplicar luz en combinación con determinados químicos inducía procesos de muerte celular y comenzó entonces, a utilizarse el concepto de terapia fotodinámica. Oscar Raab descubrió que las longitudes de onda de la luz eran un factor determinante en su efecto y que podía ser letal para determinados microorganismos, como el *Paramecium* (protozoo de forma ovalada que puede tener una longitud de 50 a 300 μm en función de la especie), en presencia de acridina. En 1975, Herman Von Tappeiner y Albert Jesionek se dedicaron a tratar tumores de piel con una combinación de luz blanca y eosina y otros reactivos, de esta manera se dio paso a las demostraciones modernas de lo que hoy entendemos como terapia fotodinámica (24).

Los actuales y conocidos métodos para el tratamiento de cáncer se han estancado en su metodología, desde que se desarrollaron años atrás, por lo que es importante hacer una mejora a dichas técnicas. En función de esta premisa, la investigación médica y científica ha buscado desarrollar alternativas a las modalidades establecidas, que sean costo-efectivas, potentes y seguras (3).

Pese a sus ventajas, la terapia fotodinámica no es cien por ciento funcional al presentar ciertas restricciones a su desempeño, tales como: la penetración de la luz en tejidos tumorales profundos, falta de un estándar para la dosimetría de luz ,

además de las dificultades en la formulación de un fotosensibilizador adecuado a cada tipo de cáncer y planificación y seguimiento del tratamiento (4).

A modo de explicación, el tratamiento con terapia fotodinámica para cáncer implica el uso de un fotosensibilizador que se excita con un haz de luz y transfiere energía al oxígeno molecular circundante para generar ROS citotóxicos tales como el oxígeno singlete (1O_2); el cual tiene la capacidad de realizar procesos oxidativos en las macromoléculas derivando en la destrucción de las células tumorales (3).

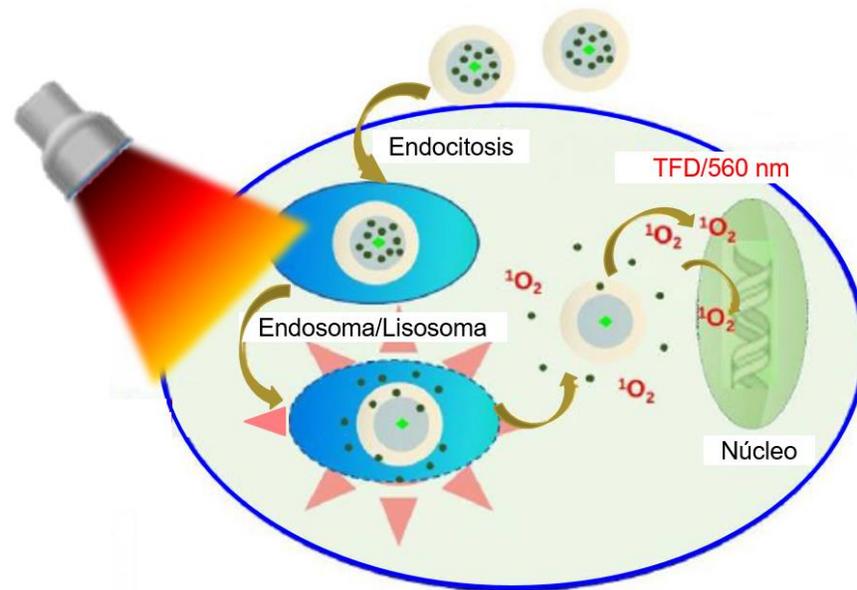


Fig. 2 Principio de funcionamiento de la terapia fotodinámica, el cual se basa en la aplicación de un fotosensibilizador que se asocia con los tejidos patológicos de interés para reaccionar con una longitud de onda, y así se desarrollan procesos de destrucción a través de la generación de especies reactivas de oxígeno como el 1O_2 singlete (4) - Modificada.

De acuerdo a la bibliografía es posible encontrar esfuerzos que se centran en la reposición de O_2 para los tumores, sin embargo, existen nuevos paradigmas que buscan lo contrario, es decir, disminuir la dependencia al O_2 (25). Resultado de esas investigaciones se tiene información acerca de un llamado tratamiento fraccional, o intermitente con luz que podría ser un método de orden superior con resultados como los de la terapia fotodinámica, pero más potentes en función de un consumo reducido de oxígeno durante el proceso que implica la terapia fotodinámica.

Otras ideas para mejorar esta terapia incluyen la elaboración de fotosensibilizadores con bases distintas, por ejemplo, los que son a base de boro incorporan compuestos que fomentan la formación de endoperóxido que reaccionan químicamente y ayudan a una recuperación reversible de $^1\text{O}_2$ con un rendimiento alto posterior a la irradiación de luminosa, para cuando se detiene la irradiación se libera el $^1\text{O}_2$ como resultado de una reversión térmica del endoperóxido. Los resultados de los experimentos in vitro indican que este nuevo enfoque para la terapia fotodinámica mejora significativamente la actividad fotocitotóxica en comparación con el uso tradicional de la terapia (25).

Procesos efectores de la terapia fotodinámica tipo I y II

El resultado de la PDT depende en gran medida de las características del fotosensibilizador tales como: tipo, localización (profundidad al momento de la irradiación) y concentración en el tumor. Otros factores que influyen la irradiación con la luz, la longitud de onda de la luz utilizada, el tipo de tumor y el nivel de hipoxia que posea (4)(26).

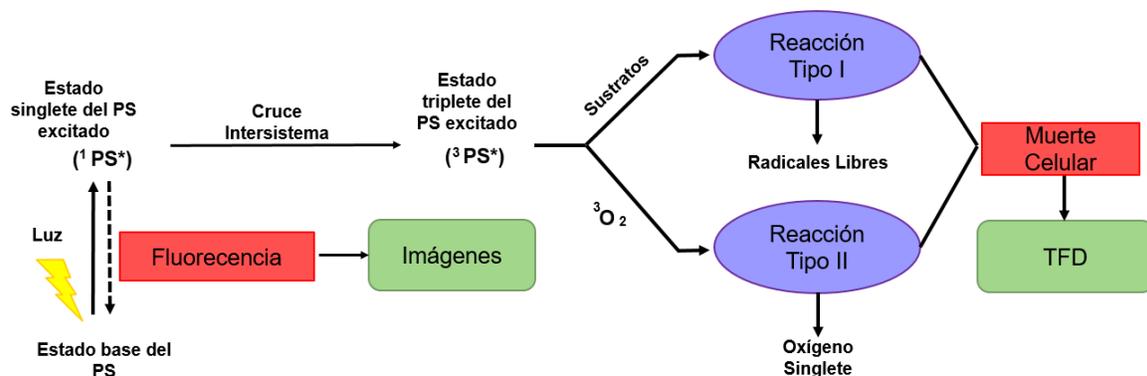


Fig.3 Reacciones de transferencia electrónica o protónica (reacciones tipo I) y transferencia de energía (reacciones tipo II) en terapia fotodinámica. Tomada y modificada de "Nanoparticles in Photodynamic Therapy" (4).

Tal como se ilustra en la figura 3, existe un camino común en el uso de PDT que diverge en dos tipos de reacciones de transferencia, tipo I y la tipo II, en ambos casos los productos resultantes son efectores de la muerte celular y que pueden

ocurrir de forma simultánea. Sin embargo, la relación de una contra la otra es dependiente del fotosensibilizador usado y de las concentraciones de oxígeno molecular. Generalmente, la reacción tipo II suele ser dominante sobre la tipo I en la PDT (26).

Una vez que el fotosensibilizador es activado por la luz y pasa a un estado excitado singlete de corta duración, puede regresar a su estado fundamental emitiendo fluorescencia, propiedad que se utiliza para la creación de imágenes. O bien puede pasar de su estado excitado a un estado triplete de larga duración e interactuar de forma directa con un sustrato al transferir un protón o un electrón para formar un anión o catión que reaccionan con el oxígeno circundante. Lo anterior produce radicales aniónicos superóxidos, peróxidos de hidrogeno y radicales hidroxilos: así se llega a los productos de la reacción tipo I. Por otro lado, la energía generada por el fotosensibilizador excitado puede transferirse al oxígeno molecular circundante de forma directa y modificarlo en $^1\text{O}_2$, una especie reactiva de oxígeno producto de la reacción tipo II (3)(26)(27).

Dentro de las dianas de la terapia fotodinámica se incluyen: células de cáncer tumorales y aglomeraciones de estas células con desarrollo de microvasculatura. Cuando comienza el proceso de interacción del fotosensibilizador con el haz de luz de la terapia, la generación subsecuente de ROS es clave para el daño a las células de cáncer tumorales y sus aglomeraciones, dicho daño viene de un gran número de respuestas inmunitarias e inflamatorias que en combinación muestra resultados de control tumoral a largo plazo, de este resultado de efecto en cascada se destacan tres mecanismo efectores principales (3):

Destrucción directa de las células tumorales por ROS citotóxicos

Cuando se aplica la terapia fotodinámica a las células de cáncer, se les somete a muerte celular mediante apoptosis o necrosis. La necrosis es un proceso de muerte celular, en el que las células son incapaces de reconfigurar su estado funcional normal después de haber detenido de forma prematura y no programada sus funciones a causa de una lesión muy grave, las células necróticas siguen un patrón

patológico que hace que se hinchan a sí mismas hasta que rompen su membrana plasmática liberando todos sus componentes intracelulares incluyendo las moléculas pro-inflamatorias que llevan a una reacción inflamatoria como lo sugiere su nombre (4)(28).

Tomando en cuenta que la apoptosis es un proceso más controlado y que además consume energía es importante considerar que cuando este proceso es inducido por la terapia fotodinámica, las células apoptóticas activan la endonucleasa, la cual se encarga de degradar el ADN en fragmentos que inducen a su vez las caspasas (enzimas que presentan un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas celulares) como mecanismo extrínseco de muerte celular (28).

Daño vascular al tumor por los ROS citotóxicos

De acuerdo a la longitud de onda de la luz láser utilizada para la irradiación del tumor, su interacción con el fotosensibilizador generan ciertas especies de oxígeno reactivo altamente citotóxico que dañan directamente la vascularización del tumor. De manera más detallada los ROS generan daños irreversibles a nivel endotelial y de la membrana basal vascular, esto da origen al colapso vascular y hemorragias tisulares que destruyen al tumor. Otros estudios han mostrado que el daño inducido en la vasculatura asociada a tumores evita la generación de nuevos vasos (4)(28).

Respuesta inflamatoria local

Los efectos de la terapia fotodinámica implicados en la destrucción de tumores y su vasculatura conllevan a una respuesta inflamatoria aguda produciendo de forma local citocinas/citoquinas pro-inflamatorias como las interleucinas (IL-1, IL-2, IL-6 e IL-8) (4)(29).

Características (calidades y ventajas)

La idea de potenciar a la terapia fotodinámica como un tratamiento alternativo, innovador y moderno viene principalmente de su mínima invasividad y de su posibilidad de ser llevado de manera paralela con otros tratamientos terapéuticos, por lo que es menos restrictivo (1).

Limitaciones y/o Consecuencias

Las limitaciones del método están relacionadas con la distribución del fotosensibilizador y la irradiación local y profunda del tejido. Las longitudes de onda de 200 a 600 nm no penetran lo suficiente dentro del tejido (aproximadamente un tercio de pulgada de tejido), por lo que son usadas con mayor eficiencia en tratamientos para piel. Al ser un tratamiento más local, por lo general, no se puede usar para tratar el cáncer con metástasis. Hasta la fecha, los fotosensibilizadores disponibles en el mercado tienen características específicas que pueden beneficiar a los pacientes, pero ninguno es totalmente satisfactorio (30). La exposición a la luz utilizada en la terapia fotodinámica puede provocar quemaduras, inflamación, dolor y cicatrización en tejido sano cercano (31).

Fotosensibilizadores

El tercero de los tres elementos esenciales para la terapia fotodinámica, aparte de la luz y el oxígeno, es un fotosensibilizador; se definen como sustancias en forma de colorantes que son capaces de absorber la luz con una longitud de onda específica para desencadenar reacciones de transferencia tipo I y tipo II (1).

Adicionalmente, se espera que un fotosensibilizador tenga una habilidad acumulativa en el tejido tumoral y que posterior a su uso se elimine de manera rápida del tejido normal y del organismo, debe tener una toxicidad despreciable y un rendimiento alto para la formación de estado triplete de oxígeno para generar suficientes ROS para que haya daño al tumor, un alto grado de pureza química, que sea anfipático o anfifílico son otras propiedades indispensables para un fotosensibilizador exitoso, pues cuando se administra dentro del cuerpo necesita viajar de forma sistémica y sin impedimentos hacia su diana, es decir, el tumor, por lo que requiere cierto grado de hidrofilia para llegar y cierto grado de lipofilia para unirse a su objetivo. Finalmente se busca que el fotosensibilizador pueda activarse con longitudes de onda superiores a los 700 nanómetros, de esta manera se

fomenta una penetración profunda en los tejidos con el haz de luz, además se evita también que moléculas endógenas como la hemoglobina absorban la luz (3).

Cumplir con todas las condiciones necesarias para tener un buen fotosensibilizador no es fácil, no obstante, la mayoría de los fotosensibilizadores que han sido probados clínicamente no cumplen en su totalidad con los requisitos y han mostrado buenos resultados. En la tabla 1 se muestran los principales fotosensibilizadores aprobados para uso clínico.

Tabla 1. Lista de Lista de los fotosensibilizadores de primera y segunda generación que están aprobados para uso clínico o están en ensayos clínicos. Tomada de "Nanoparticles in Photodynamic Therapy" (3).

	Clase	Sensibilizador	Nombre comercial	Comercializado por	Indicaciones potenciales	Estatuas actual	Formulación del exipiente/ Modo de aplicación	Típica absorción máxima (nm)	Coefficiente de excitación (M ⁻¹ cm ⁻¹)
Primera generación de Fotosensibilizadores	Hematoporfirina	HpD (Purificado parcialmente), porfirmero sódico	<i>Photofrin</i>	Axcan Pharma Inc. (QC, Canadá)	Cáncer de pulmón de células no pequeñas endobronquiales, cánceres de esófago, cáncer de vejiga, cáncer gástrico y cáncer cervical	Canadá (1993) Japón (1994) Aprobación en USA por la FDA (1995), ahora aprobado en 40 países	Dextrosa o inyección de NaCl	360	3 000
			<i>Photogem</i>	Moscow Reserach Oncological Intitute (Moscó, Rusia)					
Segunda generación de fotosensibilizadores	Profármaco base de protoporfirina	Ácido 5-aminolevulínico (5-ALA)	<i>Levulan</i>	DUSA Pharmaceutical Inc. (MA, USA)	Tratamiento de la queratosis actínica, el carcinoma de células basales, los tumores ginecológicos de cabeza y cuello, así como el diagnóstico de los tumores del cerebro, cabeza y cuello y vejiga.	Aprobación en USA por la FDA (1999), en Europa (2001)	Crema tópica	635	<10 000
		5-ALA-hexil éster / H-ALA	<i>Hervix</i>	PhotoCure ASA. (Oslo, Noruega)	Diagnóstico de tumores de vejiga.	Aprobación en USA por la FDA (2010)	Diluyente para instilación intravesical.	375-400	
			<i>Cysview</i>	Photocure Inc. (NJ, USA)					
		5-ALA-metil éster / M-ALA	<i>Metvixia</i>	Galderma Laboratories, L.P. (Texas, USA)	Queratosis actínica, enfermedad de Bowen y carcinoma baso-celular	Aprobación en USA por la FDA (2004) Nueva Zelanda (2002) Australia (2003)	Crema tópica (incluye alcohol cetosteárico y aceite de cacahuete)	635	
	5-ALA-bencilo éster	<i>Benzvix</i>	-	Cáncer gastrointestinal	No aprobada	-	635		
	Benzoporfirina s	Monoácido derivado de benzoporfirina, anillo A (BPD-MA) / Verteporfirina	<i>Visudyne</i>	Valeant Pharmaceuticals International Inc. (QC, Candá)	Tratamiento para la degeneración macular relacionada con la edad (DMAE), miopía patológica, histoplasmosis.	Aprobación de la FDA en USA (2000) Europa (2000) Canadá (2000)	Formulación liposomal.	689-693	35 000
	Clorinas		<i>Foscan</i>	Biolitec Pharma Ltd (Dublin, Irlanda)	Tumores de cabeza y cuello, próstata y páncreas.	Aprobado por la Unión Europea (2001)	Etanol / propilenglicol.	652	30 000
			<i>Aptocine</i>	Light Sciences (Washington DC, USA)	Cáncer de pulmón y tumores sólidos de diversos orígenes.	Aprobación en Japón (2003)	Inyección salina.	664	45 000
<i>Laserphyrin</i>			Meiji Seika Pharma Co, Ltd. (Japón)						
Flalocianina		<i>Photosens</i>	General Physics Intitute (Moscó, Rusia)	DMAE y varios tipos de cáncer.	Rusia (2001)	Inyección salina.	675	110 000	
		<i>Pc4</i>	Case Western Reserve University (Ohio, USA)	Queratosis actínica, enfermedad de Bowen, linfoma no hodgkin de células T y cáncer de piel.	Triada Clínica, fase I, USA	Tópico	670	40 000	
		<i>CGP55847</i>	Ciba-Geigy Ltd. (Basel, Suiza)	Queratosis actínica, enfermedad de Bowen, cáncer de piel; Carcinoma de células escamosas del tracto aero-digestivo superior.	Triada Clínica, fase I, USA	Formulación liposomal.	675	243 000	
<i>Texaftrins</i>		<i>Antrin</i>	Pharmacylics Inc. (California, USA)	Cáncer de próstata y foto-angioplastia.	Triada Clínica, fase II, USA	Manitol / administración intravenosa.	732	42 000	
Fetoribide-a		<i>Photochlor</i>	Roswell Park Cancer Institute (Nueva York, USA)	Cánceres esofágicos precoces, cáncer de pulmón de células no pequeñas.	Triada Clínica, fase I, USA	Inyección salina.	665	47 500	
		<i>Tookad (WST09)</i>	The Weizsmann Intitute of Science (Rehovot, Israel)	Cáncer de próstata recidivante.	Triada Clínica, fase III, Europa	Liofilizado / Inyección salina.	763	>100 000	
Purpurinas		<i>Photrex</i>	Miravant Medical Technologies Inc. (California, USA)	Cáncer de mama metastásico cutáneo, carcinoma de células basales, sarcoma de Kaposi y cáncer de próstata.	Triada Clínica, fase II, USA	Emulsión lipídica para administración intravenosa.	660	28 000	
Porphycenes		<i>ATMPn</i>	Glaxo Wellcom (Carolina del Norte, USA) y Cyropharm (California, USA)	Psoriasis y cáncer de piel no melanoma.	Aprobado en Alemania (1997)	Tópico	610-650	50 000	

Primera generación de fotosensibilizadores

Los fotosensibilizadores de primera generación fueron desarrollados entre 1970 y 1980 por el alemán Oscar Raab e incluían una base común de porfirina y de su derivado de hematoporfirina (HpD), el cual es una mezcla patentada de monómeros, dímeros y oligómeros o de porfina sódica que es la parte más activa del HpD (1)(3). Dadas sus propiedades, como baja toxicidad, formulación soluble en agua y administración intravenosa, fueron los primeros en usarse para la destrucción de tumores en ensayos clínicos. Sin embargo, estos fotosensibilizadores mostraron baja habilidad para absorber en el infrarrojo, limitando su activación en tejidos profundos (3).

Los fotosensibilizadores de primera generación tienen bajos coeficientes de extinción, pues continuamente requieren de una administración de gran cantidad de fotosensibilizador para obtener una buena fotorreacción, por lo que el DLI (Drug-Light Interval, por sus siglas en inglés: intervalo entre el suministro de la PS y la irradiación con la luz) suele ser un periodo de 48 a 72 horas, además se acumula fácilmente en el tejido durante un periodo más prolongado, por lo que; su efecto podía continuar después del tratamiento y el paciente debía evitar contacto con las fuentes de luz de cualquier tipo durante ese mismo periodo de tiempo o hasta por 6 semanas (3).

La falta de selectividad tumoral, biodisponibilidad deficiente y la biodistribución desfavorable, así como la fotosensibilidad prolongada fueron limitaciones importantes para los ensayos clínicos iniciales de esta primera generación de fotosensibilizadores (1).

Segunda generación de fotosensibilizadores

Los fotosensibilizadores comerciales de segunda generación son compuestos porfirinoides que comprenden estructuras microcicladadas a base de porfirina, como las clorinas, bacterioclorinas, flalocianinas o texafirinas (3) (1). En su mayoría fueron desarrollados a finales de 1980 con la intención de superar las deficiencias de los

fotosensibilizadores de la primera generación, usualmente los compuestos pertenecientes a la segunda generación se caracterizan por una absorción de luz con longitudes de onda máxima de 630 nanómetros y un alto coeficiente de extinción (3).

Otra mejora que tuvieron en esta generación fue el menor tiempo de acumulación en el tejido y la reducción de la ventana de fotosensibilidad cutánea a un plazo no mayor de 2 semanas, por lo que; el periodo de cuidados post-tratamiento se reducían y el tratamiento podría realizarse al instante de ser administrado. Con esto se dio la oportunidad de ofrecer la terapia fotodinámica como un procedimiento ambulatorio (3).

Es importante resaltar que el carácter hidrofílico e hidrofóbico del fotosensibilizador afecta de manera directa la ruta de diseminación una vez que es administrado, se hizo una demostración en la que los fotosensibilizadores con tendencias hidrofóbicas exhibieron un relación de conexión tumoral a tejido sano de 7:1 o de 8:1, mientras que los que presentan tendencias hidrofílicas tuvieron una relación menos selectiva siendo de 2:1. Por un lado, la característica hidrofóbica permitiría que el fotosensibilizador penetre en la membrana celular y se ubique en el compartimento subcelular fotosensible, mientras, del otro lado las características hidrofílicas, podría formar agregados en solución acuosa en los medios fisiológicos, afectando así sus propiedades fotofísicas (rendimiento de 1O_2) y de fotomataamiento debido a su farmacocinética inadecuada (3). En función de estas características, que el compuesto fotosensible tienda más hacia un lado o a otro dada su capacidad de convivencia al agua obstaculiza que se desempeñe bien y limita otras aplicaciones clínicas, por lo tanto, el fotosensibilizador clínicamente exitoso es equilibrado entre su grado hidrofílico e hidrofóbico con el fin de mejorar su solubilidad (1).

La posibilidad de modificar estos compuestos en función de su solubilidad, provienen de la estructura de la porfirina, la cual puede proporcionar innumerables derivados como ácido sulfónico, ácido carboxílico, hidroxilos, sales de amonio cuaternario, sustituyentes de piridinio, etc. (3).

De manera destacada sobresalen de esta generación: el aminolevulínico ácido (ALA), mono-L-aspartil clorina e6 (MACE), lutexafirina, AIPcS₄, tetrafenilporfina (TPPS₃, TPPS₄), que son relativamente hidrofílicos, la mayoría de estos compuestos, especialmente los que tienen por estructura un anillo de porfirina como Chlorin e6 (Ce6), el meta-tetrahidroxifenilclorina (mTHPP), bacteriocloropil-a, 2-[1-hexiloxietil]-2-devinilpirofeoforbida-a (HPPH), Tookad, SnET₂ y ftalocianinas que son altamente hidrofóbicas (1)(3)(6).

Tercera generación de fotosensibilizadores

El principio del desarrollo de fotosensibilizadores de tercera generación tienen base en la síntesis de sustancias que tengan afinidad con el tejido tumoral, de esta manera se reduce el posible daño al tejido sano que se encuentra cercano al tumoral (1). Gran parte de las investigaciones actuales para los fotosensibilizadores de tercera generación tienen como objetivo el desarrollo de compuestos que sean capaces de activarse con luz de longitud de onda mayor, para conseguir acceso profundo al tejido, menor fotosensibilidad a otros tejidos y lo que es más importante, una mejor especificidad tumoral (3).

Existen dos formas para el desarrollo de la tercera generación de fotosensibilizadores, la primera consiste en la modificación de los elementos con conjugados biológicos (péptidos, anticuerpos), la segunda es convertir a los fotosensibilizadores en encapsulados o conjuntos químicos que funcionen como vehículos transportadores (3).

Para ambos casos se busca que el sistema de administración del compuesto aumente su biodisponibilidad mediante las siguientes modificaciones específicas con la terapia fotodinámica:

- Combinaciones de fotosensibilizadores de segunda generación con moléculas biológicas dirigidas al receptor blanco (1).

- Combinaciones de fotosensibilizadores con lipoproteínas LDL, debido al hecho de que las células tumorales necesitan más colesterol para la síntesis de las paredes celulares (1).
- Uso de marcadores de superficie tumoral, como los receptores del factor de crecimiento, receptores de la transferrina u hormonas como la insulina (1).

En resumen, los fotosensibilizadores de tercera generación son la mejora de los compuestos actuales de segunda generación en términos de capacidades de entrega o de orientación. Sin embargo, muchos de los fotosensibilizadores de tercera generación han sido estudiados únicamente a nivel *in vitro*.

En la bibliografía aparece un experimento en el que se utilizó como fotosensibilizador rodamina 123 para sensibilizar un grupo de diez ratones con tumores intracerebrales trasplantados, según lo determinado en la metodología, el tinte se activó con un láser de argón, en las conclusiones sobre la respuesta y supervivencia del tumor se denota que el tratamiento no fue cien por ciento eficaz; de los diez ratones, en seis ratones ya no se observó tumor, tres semanas después se sacrificó a los animales para realizar una evaluación histológica y se encontró tejido tumoral residual en la periferia donde se encontraba el tumor original y se dedujo que dicho residuo era el producto del corto alcance del espectro seleccionado para el láser (32). Finalmente, se sugirió que es posible lograr un tratamiento selectivo específico para tumores cerebrales, como se demostró en los modelos con animales, sin embargo, la penetración de la luz es un factor limitante, una profundidad de cuatro a siete milímetros de efecto necrosante no es suficiente para destruir los posibles residuos de un tumor que en efecto puede deshacerse con éxito (32).

Absorción de dos fotones

El fenómeno de absorción de dos fotones (TPA) hace referencia a la excitación y absorción simultánea de dos fotones con la finalidad de alcanzar un estado excitado. Este se establece en la física clásica como un fenómeno poco común relacionado

con la óptica no lineal descrito en la ecuación (1). A nivel molecular, se define como el momento dipolar de una molécula (μ) que interactúa con una onda electromagnética (E) (6)(33)(34).

$$\mu = \mu^0 + \alpha E + \beta E^2 + \gamma E^3 \quad (1)$$

En esta ecuación, μ^0 se refiere al momento dipolar permanente de la molécula y α a la polarización de la molécula, ambos términos se encuentran en el dominio de la óptica lineal clásica, β es la hiperpolarización de la molécula, γ es una hiperpolarización de segundo orden, que trata sobre todo de la absorción de dos fotones y es el más importante porque está relacionado con la óptica no lineal de segundo orden (6)(33)(34).

Se ha determinado que la tasa de transición para obtener el efecto de la TPA es baja y proporcional al cuadrado de la intensidad de luz utilizada para la excitación de los fotones, como se define en la ecuación (2). Por lo tanto se requiere que se detecte una densidad alta de fotones, que es proporcionada por un láser pulsado (6)(33)(34).

$$R_{2P} \propto \sigma_2 I^2 \quad (2)$$

La sección transversal de TPA (σ_2) se expresa en Goeppert-Mayer (GM, 1 GM = 10^{-50} cm⁴ s fotón⁻¹ molécula⁻¹), como primer antecedente del efecto de TPA fue establecido en 1961 por Maria Göppert-Mayer, quien recibiera el premio nobel de física por su descubrimiento dos años después. Se describe que la mayoría de moléculas orgánicas cuentan valores denominados secciones transversales de TPA conformado por un sistema conjugado simétrico (D- π -D o A- π -A) o asimétrico (D- π -A) y brindan dicho valor de sección transversal (σ_2); El parámetro σ_2 en TPA representa el coeficiente de absorción molecular y la probabilidad de alcanzar el estado excitado después de la absorción de la luz, finalmente ocurre la TPA en un punto focal del rayo láser en un volumen restringido de alrededor de 1 μm^3 donde la densidad de fotones es máxima; (6)(33).

En ese sentido, retomando un concepto más sencillo, TPA es la absorción simultánea de dos fotones de idénticas o diferentes frecuencias para excitar

una molécula desde un estado fundamental a un estado electrónico de mayor energía; la diferencia de energía entre el primer y segundo estado energético de la molécula es igual a la suma de las energías de los dos fotones absorbidos; este proceso es de tercer orden y se destaca que el ratio de transición atómica depende del cuadrado de la intensidad de la luz y por lo tanto se considera un proceso de óptica no lineal (6)(34)(35).

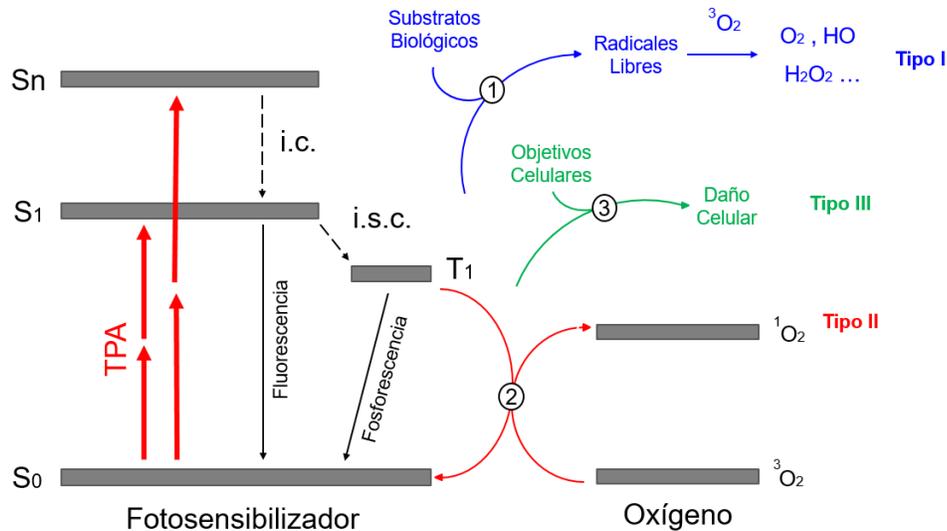


Fig. 4 Mecanismos citotóxicos derivados de la absorción de dos fotones (TPA): excitación de dos fotones al primer estado singlete excitado (S1) al superior (Sn); donde por sus siglas en inglés i.c.: es la conversión interna; i.s.c. : cruce de intersistemas; 1 es la transferencia de electrones o protones; 2 la transferencia de energía y 3 es la transferencia de electrones (6)-modificada.

Terapia Fotodinámica de dos fotones

De manera general los materiales con tendencia hacia el proceso de absorción de dos fotones y a la dependencia cuadrática de la intensidad de la luz incidente en el proceso de absorción energética para cambios de estado, han llamado la atención para aplicaciones como el almacenamiento óptico tridimensional y la PDT (6)(36).

Una vez más se reconoce la existencia de limitaciones y posibles daños al tejido sano producidos por la luz requerida para activar los PS necesarios en la PDT dentro del espectro óptico terapéutico (700-1500 nm), sin embargo, pueden superarse con el uso de PS con una disposición a fuentes de excitación distintas que estén comprendidas en la región cercana al espectro infrarrojo (NIR, por sus

siglas en ingles), la activación del PS es crucial en el resultado clínico exitosos de la PDT, por lo que se considera que también depende en gran medida de la distribución, profundidad y características ópticas que determinan la absorción, dispersión y reflexión de los tejidos donde se deposita con respecto a la longitud e intensidad de las luz lineal (6)(37).

A pesar de las numerosas rutas sintéticas para mejorar la eficiencia de TPA con diversos PS orgánicos mediante la extensión e introducción de grupos donantes y receptores en su estructura, la hidrofobicidad de sus moléculas sigue siendo el principal inconveniente para las aplicaciones biológicas. Además, las moléculas orgánicas tienen una tasa baja de creación de $^1\text{O}_2$ en la etapa del cruce de intersistemas y esta debe aumentarse para promover la generación de $^1\text{O}_2$ para su aplicación en PDT. Sin embargo, como se informa en la literatura, la generación moderada de $^1\text{O}_2$ con estructuras orgánicas puede compensarse con σ_2 altas para poder obtener efectos de TPA-PDT significativos (6)(38).

En diversas bibliografías se menciona el uso de porfirinas nanométricas simples con sistemas π conjugados como la tetrafenilporfirina (H₂TPP) y la zincocta etilporfirina (ZnOEP), que exhiben pequeños valores de σ_2 , sin embargo, estas porfirinas son eficientes generadoras de oxígeno singlete y algunas otras especies reactivas de oxígeno, haciendo este método viable para la activación de PDT, así se puede llegar a la idea de que al usar un PS con valores relativamente altos de σ_2 se podría permitir el tratamiento espacialmente selectivo de células de cáncer en sitios más profundos. Bajo esa premisa surgen trabajos en los que se utilizan estructuras orgánicas que exhiben una fuerte absorción de dos fotones y una fuerte fluorescencia subsecuente a irradiación (37)(39)(40).

A partir de este enfoque, un agente sensible a excitarse con dos fotones se activa mediante pulsos de láser cortos para transferir energía al fotosensibilizador, activarlo y llegar al estado singlete a partir del cual se produce la misma secuencia de transferencia de energía para producir el oxígeno singlete (34)(37)(41).

La absorción inicial de los dos fotones de las moléculas del tinte requieren pulsos de láser IR de alta intensidad. Estos pueden generarse a través de láseres de pulso

ultracorto incluso con una energía de pulso relativamente baja. Un ejemplo de un láser de este tipo es un láser Ti: Zafiro de modo bloqueado que puede producir pulsos de 4 nJ de aproximadamente 70 fs de duración. Esto corresponde a una potencia máxima de 5 MW/cm² en un haz de 2 mm de diámetro, con dichas características se dice que la energía de pulso es deseable al minimizar efectos secundarios térmicos, adicionalmente la dependencia cuadrática a la incidencia de la luz utilizada restringe el efecto fotodinámico a un área focal menor, dicha selectividad hace a la TPA, una alternativa ideal para la PDT y el tratamiento de tumores localizados (34)(36)(37)(42).

Radiación de Cerenkov y características

Se menciona de forma adicional a la radiación de Cerenkov como una segunda opción o alternativa de fotoactivación para la PDT. Se especula que la primera observación del fenómeno de Cerenkov fue del Dr. Curie hace más de un siglo, sin embargo, Pavel Cerenkov caracterizó el fenómeno como tal en 1958, lo que le valió parte del Premio Nobel de Física de ese año y nombrar con su apellido el fenómeno (43).

La radiación de Cerenkov (CR) es resultado de la energía que se produce dentro de la región visible del espectro ultravioleta (UV) electromagnético, éste ocurre cuando existen partículas cargadas que viajan más rápido que la velocidad de la luz dentro de un medio. Dada la alta velocidad a la que se mueven las partículas, se produce una polarización en las moléculas del medio, seguido de una des-excitación que libera energía en forma de radiación UV-visible, la polarización es continua con una distribución de intensidad que es inversamente proporcionalmente al cuadrado de la longitud de onda, resultando comúnmente con un resplandor azul (Fig. 5 A y B) (43)(2).

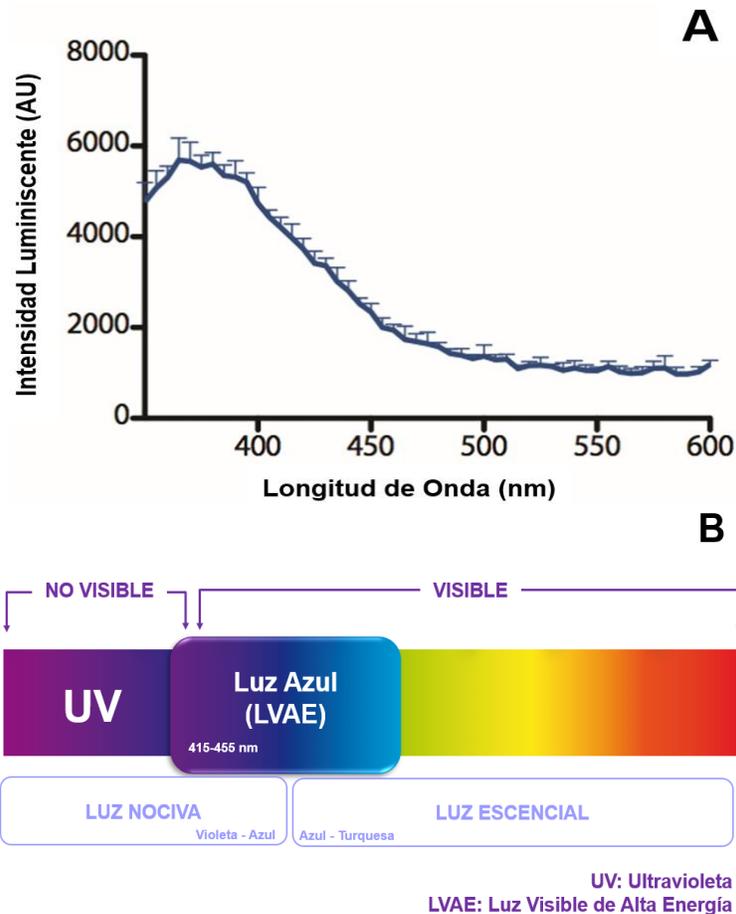


Fig 5 A) La CR es producida por una partícula cargada que viaja a través de un medio dieléctrico más rápido que la velocidad de la luz, luego es dividido por el índice de refracción de ese medio. La relajación de las moléculas polarizadas en el medio, produce luz visible ponderada hacia la energía más alta del espectro. B) El perfil del CR está centrado en el azul, conocida como luz UV visible (250-600 nm).

De manera más específica la generación de radiación Cerenkov se relaciona a la velocidad y energía de las partículas usadas, así como del índice de refracción del medio en el que se encuentran. Las partículas cargadas que se liberan tras la desintegración radiactiva incluyen electrones (partículas β^-), positrones (partículas β^+) y partículas α . Conforme estas partículas se desplazan en el medio, pierden energía a través de interacciones con materia circundante, en este caso biológico hablamos de agua o soluciones isotónicas. En condiciones “normales” si estas partículas viajan en el medio a velocidades inferiores a la luz, las moléculas del medio se alinean con el paso de la partícula cargada, después de que pasa la partícula, las moléculas alineadas se relajan y regresan a un estado de energía bajo, Pero cuando la partícula viaja en el medio a una velocidad mayor a la de la luz, las

moléculas se alinean, pero para relajarse, entran en una fase de decaimiento en la que liberan energía en forma de radiación en un espectro visible.

Existe un umbral que asegura la producción de radiación de Cerenkov, que tienen principio en la velocidad de fase, o velocidad de la luz en determinado medio (ecuación 3). Por lo general para explicarla se utilizan las partículas β en función de la energía y puede calcularse con la siguiente ecuación (donde c es la velocidad de la luz en el vacío, E es la energía de las partículas y E_0 es la masa de la partícula β en reposo, en las mismas unidades que E):

$$v = c \left(\frac{E_0^2}{(E+E_0)^2} \right)^{1/2} \quad (3)$$

El umbral de energía para producir CR con partículas β en agua está dado con un índice de refracción de 1.33, es un estándar de producción manejar un requerimiento mínimo de energía de 263 Kilo-electronvolt (keV). Existe el registro de que la mayoría de partículas β producidas por la descomposición del ^{18}F (del que se hablara con posterioridad) poseen una energía mayor a la que señala el umbral, por lo tanto se produce el efecto de CR con una energía de punto final de 633 keV y media de 250 keV, cabe señalar que dentro del modelo de trabajos anteriores con ^{18}F , la energía de las partículas por minuto (E_{min}) se reduce a un factor ≥ 219 KeV en tejidos, con un índice de refracción aproximado a 1.4. Como dato adicional se descarta el uso de las partículas α pues no tienen la energía suficiente para producir luminiscencia durante su decaimiento (43).

En la actualidad hablar de imágenes moleculares, es hablar de una contribución al desarrollo de fármacos nuevos más efectivos y seguros, modalidades mejoradas en tecnologías de imágenes para investigación y sistemas biomédicos poderosos, sensitivos y de alta resolución de imágenes. Trabajar con Imágenes por luminiscencia de Cerenkov en oncología no es un área tan explorada; existen trabajos de investigación en el que se menciona los tipos de cáncer más agresivos y como se caracterizan a través del uso de tomografía por emisión de positrones (PET) o imagen de resonancia magnética (MIR) dados sus excelentes resultados, sin embargo, son técnicas limitadas en rendimiento y alto costo; por lo tanto, el uso

de las imágenes por luminiscencia de Cerenkov se perfila como una herramienta alternativa que ofrece rapidez, rentabilidad y buenos resultados con la característica fuerza de las imágenes nucleares por las propiedades de desintegración radioactiva de los agentes utilizados por efecto del movimiento más rápido que la velocidad de la luz a través de un medio dieléctrico en el que se encuentra; la visualización de los radiomarcadores utilizados en estos sistemas presentan también varias ventajas, por ejemplo con CLI es posible obtener imágenes de hasta cinco muestras simultáneas, mientras que en equipos PET máximo se pueden analizar dos muestras pequeñas a la vez (44)(45)(46).

Usar al radiomarcador como fuente de luz interna es una gran ventaja porque reduce la señal de fondo no específica, permite una mayor autofluorescencia y una excitación homogénea en todo el volumen debido a las diferentes propiedades de absorción de los tejidos. Con las imágenes resultantes de estos compuestos es posible visualizar el tiempo de eliminación y acumulación específica de los agentes, su uso con nanopartículas es de gran interés desde la última década en la biomédica debido a que en conjunto tienen propiedades biológicas, químicas, físicas únicas y ajustables para la obtención de imágenes y mecanismos terapéuticos; por ejemplo, el uso de nanopartículas de óxido de hierro generan un contraste negativo en la resonancia magnética o su implementación con isótopos de yodo permite obtener imágenes de triple modalidad de tráfico de partículas (43)(44)(47).

Radionúclido emisor de positrones: ^{18}F

Los radionúclidos son la base de la medicina nuclear, esencialmente son un isótopo radiactivo que es incorporado a una molécula orgánica o inorgánica para que se dirija de forma selectiva a algún órgano o que se incorpore a un proceso metabólico o fisiológico en el organismo. Dado que un isótopo es un emisor gamma o de positrones, y pueden ser detectado a través de gammacámaras (dispositivo para captura de imágenes) que son utilizadas en medicina nuclear y equipos de PET para generar externamente imágenes in vivo de la morfología y funcionamiento de

los diversos órganos o sistemas que se estén analizando, para ser procesadas en sistemas de cómputo y se imprimen en placas radiográficas (48).

Si bien ya se mencionó el mecanismo de detección de la CR, es igualmente importante explicar las similitudes existentes en el mecanismo de acción y detección del ^{18}F como radionúclido en estudios de PET. En este caso los átomos radioactivos que se liberan chocan por atracción de cargas con electrones de orbitales de átomos cercanos resultando en un aniquilamiento resultante de ambas partículas, es decir, desaparece la masa y se crean dos fotones de energía que son proyectados en direcciones opuestas a 180° de diferencia uno del otro para ser detectados por los cristales de centelleo localizados alrededor del gantry del equipo PET, son necesarios millones de pares de fotones (aniquilaciones) para formar una imagen. Estos eventos de centelleo provienen de diferentes ángulos del cuerpo donde se encuentra el isótopo ^{18}F , y al sumar estos eventos, es posible reconstruirlos en tres dimensiones de cortes tomográficos (axial, coronal y sagital), vease la Fig. 6 (49)(50).

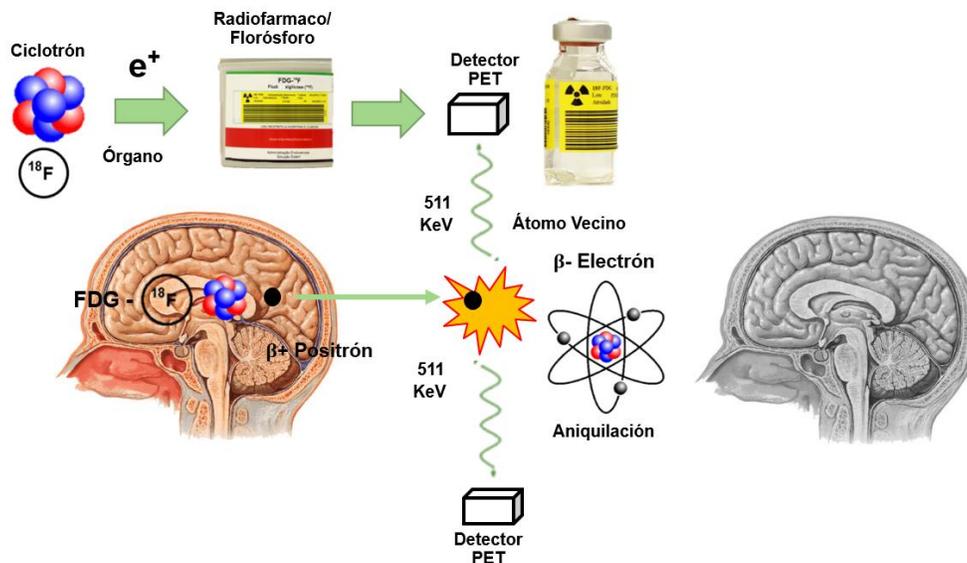


Fig. 6 En esta figura se muestra el principio físico descrito en el párrafo anterior, en como suceden los eventos de aniquilación de partículas por el choque de átomos con electrones orbitales, resultando en partículas β^+ que se asocian al isopo ^{18}F -FDG y es posible visulzarlos en una reconstrucción de equipo de PET.

Adicionalmente existe un estudio que usa la CR en conjunto con el ^{18}F para monitorear la respuesta de xenoinjertos de linfoma y un inhibidor enzimático

molecular para NEDD8 (cadena de aminoácidos específicos) que se encarga de prevenir la función del proteosoma celular, es decir la inducción de muerte celular en una variedad de líneas celulares de cáncer, obteniendo una correlación estadística significativa entre la absorción del ^{18}F -FGD y el éxito de los xenoinjertos, indicando además la eficacia de control de alto rendimiento y bajo costo de la inmunoterapia en conjunto con la CLI. (43)(50)(51).

Análogo de la glucosa: ^{18}F -FGD y su acumulación en las células de cáncer

La utilización de la fluoro desoxiglucosa (^{18}F), como un marcador metabólico se debe a sus cualidades análogas a la glucosa, se ha logrado con éxito el ingreso de esta molécula a células normales y tumorales a través de los diferentes receptores de membrana, que siguen la misma vía metabólica de la glucosa, es fosforilada como glucosa para la hexoquinasa (cuya isoforma mitocondrial se encuentra a elevadas concentraciones en tumores malignos de rápida evolución) y en presencia de glucosa-6-fosfatasa es convertida en ^{18}F -FGD, a partir de este punto deja de seguir la vía metabólica convencional de la glucosa y comienza a acumularse intracelularmente en grandes concentraciones en las células tumorales, como se ilustra en la Fig. 7. , dadas las condiciones de glucosa e hipoxia en las que se encuentran, durante el proceso de acumulación de esta molécula en las zonas reguladas y delineadas por proliferación e inflamación. Las dosis informadas de ^{18}F -FDG que se reportan en varios estudios en muestras celulares o animales pequeños son de aproximadamente 3.952 MBq/ 20 μCi , pero si hablamos de personas debería ser de 150 μCi por kilogramo de peso (52).

Dado que es un análogo de la molécula de la glucosa, la ^{18}F es incorporada de manera normal por células con tasas altas de consumo de glucosa, donde la fosforilación de la misma impide que sea liberada al medio. Se necesita una molécula de oxígeno en la glucosa para continuar el proceso glicolítico, por lo que la FDG no puede ser metabolizada en las células y por ello no entra en la ruta glicolítica antes de que decaiga su radiactividad y como resultado, la distribución

de ^{18}F -FDG es un buen reflejo de la distribución en el consumo y fosforilación de glucosa en las células del cuerpo (43)(50)(53).

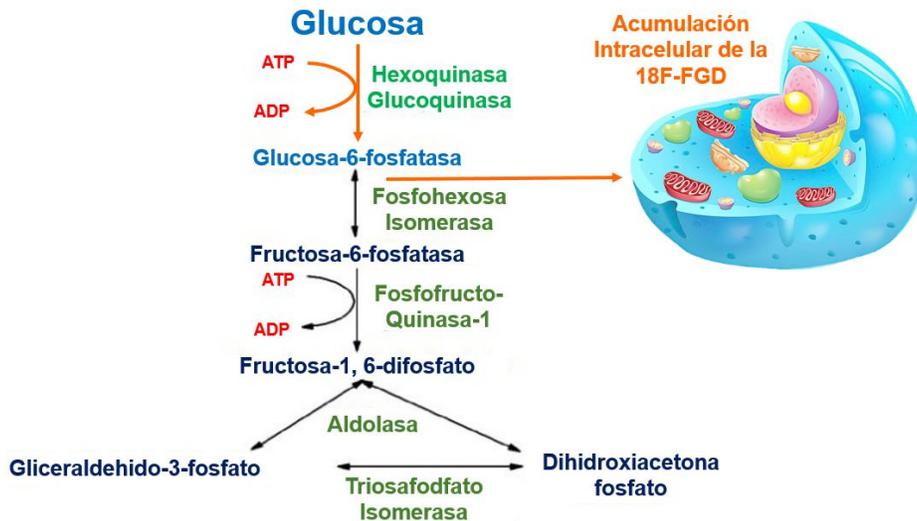


Fig. 7 Se observa completa la principal vía metabólica de la glucosa para resultar en gliceraldehído-3-fosfato o dihidroxiacetona fosfato, sin embargo, para los fines de este apartado nos enfocaremos en cómo la fluorodesoxiglucosa (^{18}F) llega como un análogo de la glucosa a esta vía a través de los diferentes receptores de membrana, una vez que comienza el proceso metabólico la ^{18}F es fosforilada para la hexoquinasa usando ATP, se libera ADP y en la siete etapa con la presencia de glucosa-6-fosfatasa la ^{18}F se convierte en ^{18}F -FGD, a partir de este punto se detiene en la vía metabólica (indicada con flechas color naranja) y comienza a acumularse en grandes concentraciones en el interior celular.

El ^{18}F -FGD se ha utilizado no solo como un detector tumoral, también se utiliza como con registrador en el control de enfermedades y la eficiencia de las terapias utilizadas: principalmente la tomografía por emisión de positrones (PET), también se demostró que en conjunto con la CR puede ser un indicador de eficiencia del mecanismo de acción de fármacos, este flurosforo tiene una vida media de 110 minutos, lo que representa un lapso de tiempo grande para poder realizar pruebas.

Cundo hay administración de ^{18}F -FDG en el cuerpo humano vía intravenosa para algún estudio de PET, el cerebro, corazón y tracto urinario son los sitios comunes de acumulación, así como cualquier otra célula con elevado consumo glucosídico, como las células de cáncer. Dado que el cerebro es el mayor usuario de glucosa, siempre tiene prioridad al resto del cuerpo, la sustancia gris supratentorial e infratentorial captan con eficiencia el ^{18}F -FDG. Su ruta de eliminación es urinaria, por lo que puede encontrarse concentrada también en la vejiga cuando no hay

factores adicionales como consumo de diuréticos, cateterización urinaria o una hidratación fuerte (50)(53).

Más allá de que el ^{18}F se usa comúnmente en investigación y tratamientos, cuando se encuentra en su forma ^{18}F -FDG presenta mejores características físicas (véase tabla 2) como: Mayor producción de partículas β^- , mejor luminiscencia, penetración en tejidos y células con baja o alta profundidad, visibilidad de fotones de rayos gamma de 511 KeV resultantes de la aniquilación de positrones en soluciones acuosas y cuando es mezclado en puntos cuánticos (QD) cambia de la región UV a un pico en la región del espectro rojo (54).

Tabla 2. Radionúclidos emisores de partículas β^- utilizados en aplicaciones biomédicas con radiación de Cerenkov (54).

Radionúclido	Vida Media ($t_{1/2}$)	Mecanismo de β decaimiento	β_{max} (KeV)[% de abundancia]	Rendimiento medio de fotones por desintegración (en medio con $n = 1.33$)	Nanopartículas Usadas in vivo
^{18}F	110 min.	β^+	633.9 [97%]	1.32	AuNP ²⁷ , QD ^{27,28} , EO ³⁰ , NaYF ₄ ³¹ , IONP ⁵⁶ , TiO ₂ ⁵⁷
^{64}Cu	12.7 hrs.	β^+ , β^-	653.1 [17.5%], 597.4 [38.5%]	0.557	QD ^{28,32,46,53,54} , porfirinfosfolípido NP ³⁵ , AuNP ^{50,52} , TiO ₂ ⁵⁷
^{68}Ga	68 minutos	β^+	1899.1 [88.9%]	33.9	IONP ⁴¹
^{89}Zr	78.4 minutos	β^+	902 [22.8%]	2.29	QD ²⁷ , SiO ₂ ⁵⁸
^{90}Y	78.4 horas	β^-	2278.7 [100%]	47.3	GdF ₃ :Y nanoplates ⁴⁸
^{124}I	4.18 días	β^+	1535 [11.7%], 2138 [10.8%]	8.97	AuNP ^{42,43} , liposoma ³³ , shell-cross-linked knedel-like NP ⁴⁵
^{177}Lu	6.71 días	β^-	0.498 [78.9%], 0.112 [10.8%], 0.048 [11.6%]	0.141	-
^{198}Au	2.69 días	β^-	961 [99%]	Sin reporte	AuNP ⁴⁹

QD: punto cuántico, en ingles quantum dot; AuNP: nanopartículas de oro; EO: nanopartículas de óxido de europio; NaYF₄: nanocristales de fluoruro de itrio; IONP: nanopartículas de óxido de hierro; TiO₂: nanopartícula de dióxido de titanio y SiO₂: nanopartículas de sílice.

Terapia fotodinámica inducida por radiación de Cerenkov

Para realizar fotoactivación de los fotosensibilizadores es necesaria su degradación, pasando de su estado basal a un estado activo, ya sea a través de un proceso químico, un proceso biológicos como acciones enzimáticas o bien procesos físicos como exposición a Rx o luz UV (43).

Por ejemplo, en el departamento de imagenología molecular del hospital escuela de Harvard en Massachusetts, se utilizó como metodología de activación, la degradación del PS DMNP-luciferina bajo exposición a radiación UV de 365 nm. (cambio de estado producto de un proceso físico) una vez activado, se libera el sustrato de luciferina puro, resultando en un efecto bioluminiscente; se reportó que la longitud de onda utilizada fue baja y no penetra del todo en los tejidos de estudio, este problema es resultado de la ineficiencia de utilizar iluminación externa; posteriormente como propuesta de solución, se utilizó nuevamente la DMNP-luciferina unida a 18F-FGD como un potenciador del efecto de bioluminiscencia (55).

El uso de aceleradores lineales para la generación externa de los haces de luz funcionar mediante la entrega de altas dosis de haces de electrones y fotones con suficiente energía, los electrones que inciden externamente son capaces de producir el efecto de Cerenkov a niveles de luz detectables en un espectro sólido de hasta 18 MeV con una tasa de fluencia aproximada de $1.1 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. Esta luz con sus características se utilizó para excitar protoporfirina IX, que es un análogo de primera generación a la rodamina en el área de fotosensibilizadores, ambos agentes fluorescentes con propiedades terapéuticas de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), de esto modo se comprueba la viabilidad del enfoque para la terapia dual con la fototerapia inducida por radiación localizada en el trayecto del haz propio (56).

Posteriormente, como segundo intento en éste mismo estudio, se usó circonio 89 (^{89}Zr) como fuente de emisión de CR porque es un mayor emisor de partículas β (909 keV), y como PS se usó clorina e6 (Ce6), se usaron nanopartículas de sílice huecas mesoporosas (HMSN) como un transportador que encapsulara las moléculas de Ce6 y el radionúclido de ^{89}Zr de manera simultáneamente, además

de una banda de absorción con un pico a 400 nm, de tal modo que resultó una mayor y mejor eficiencia de transferencia de energía en comparación con el primer experimento. Con el encapsulado conjunto de HMSN [⁸⁹Zr-Ce6] se llegó a resultados eficientes de destrucción de células tumorales in vitro e in vivo, de tal forma que la fuente emisora interna de CR, el isótopo de ⁸⁹Zr fue capaz de generar y transmitir suficiente energía para inducir el efecto de FDT y estimular el PS Ce6 que a su vez generó los ROS necesarios y causar daño a las células de tejidos tumorales, logrando una excelente eficiencia terapéutica véase Fig. 8 (57)(58)(59)(60).

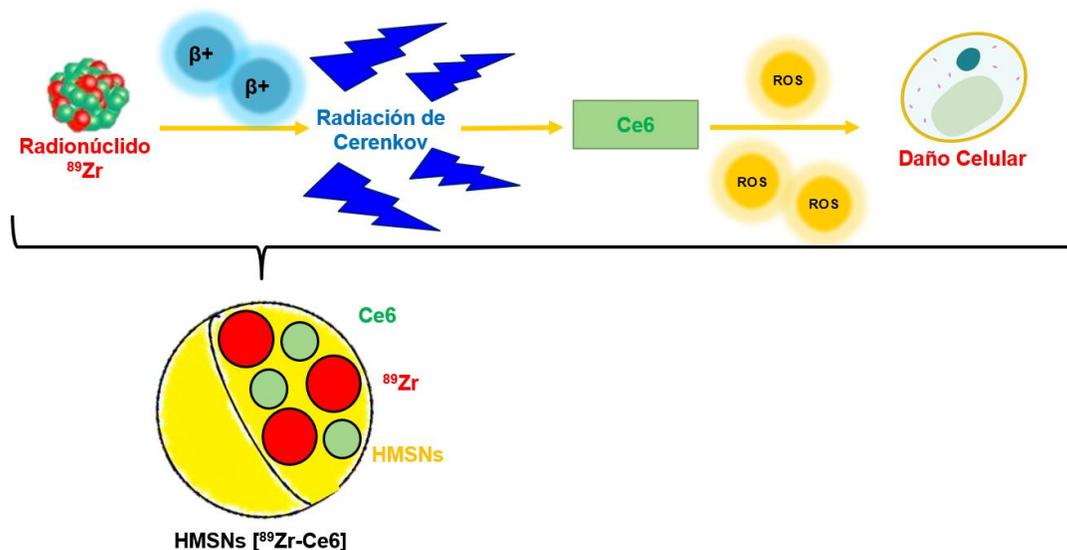


Fig. 8 Implementación de la CR como fuente de luz interna para FDT, donde se usa un encapsulado que contiene el radionúclido y el fotosensibilizador, una vez que el radionúclido alcanza la energía suficiente para genera luminiscencia y excitar el PS, este entra en acción en la liberación de ROS para producir daño celular localizado y específico.

De acuerdo a lo descrito en el trabajo anterior, la PDT como nuevo paradigma en la investigación biomédica, aún presenta algunos inconvenientes, como que al ser usada como tratamiento para células tumorales en disposición profunda no siempre es efectiva, porque las longitudes de onda de la luz utilizada oscilan entre los 400-800 nm, y se dispersa o absorbe por otros tejidos, atenuando su efecto. De este modo, se plantea el uso de la TPA como solución a esta problemática, bajo el

principio de un sistema luminiscente que active el PS de manera interna y no sea directamente dependiente de una fuente externa de irradiación (57)(61)(58).

Las imágenes resultantes en la PDT pueden proporcionar información útil sobre tamaño y ubicación de los tumores, con esos datos es posible optimizar la determinación de los intervalos de tiempo para la aplicación de PDT así como la eficacia terapéutica. Se plantea que el uso de radionúclidos comunes para la PET como técnica de imagen con penetración ilimitada en el tejido y en la técnica de CR se pueda lograr el uso de una fuente de luz interna e independiente que sustituya a la fuente externa convencional de la PDT. Existen antecedentes en el uso de CR como inductor de PDT de manera experimental, en dicho procedimiento se usaron en conjunto partículas de dióxido de titanio como PS y Cobre 64 (^{64}Cu) como radionúclido, sin embargo, al ser administrados por separado sin ser acoplados, se registró eficacia de baja medida (57)(58)(59)(60).

Rodamina (Rodamina 6G, Rodamina 123, Rodamina B)

Características

En las últimas décadas cinco décadas, el uso de sustancias fluorescentes orgánicos se han abierto paso en aplicaciones con la tecnología óptica; desde 1966 que se tuvo el primer registro del uso de láser con tintes orgánicos, la física óptica ha tenido avances importantes, siendo las principales su uso en técnicas de trazado de fluorescencia inducida por láser o los láser de colorante cuyas características de emisión espectral permiten un ajuste en la longitud de onda, generación de pulsos cortos o en onda continua, versatilidad de operaciones, energía escalable y la posibilidad de operaciones simultáneas con diferentes longitudes de onda. La rodamina es un compuesto químico que suele usarse como tinte, a menudo se usa como un colorante guía dentro del agua para determinar la velocidad y la dirección del flujo. Los colorantes de rodamina poseen una característica de fluorescencia y por lo tanto pueden ser detectados de manera fácil y relativamente económica, cobra

relevancia como un agente excepcional en las imágenes biomédicas, al ser detectable con instrumentos llamados fluorómetro (62)(63)(64).

La importancia de elegir adecuadamente de entre más de doscientos tintes bioluminiscentes, permite utilizar láseres configurables en el espectro de 320 a 1200 nm; la rodamina 6G, también conocida como rodamina 590, se utiliza ampliamente como medio láser y como trazador de fluorescencia. Para su uso en, es posible disolverla en metanol, etanol u otros disolventes orgánicos, incluso agua, sin embargo, en función del solvente, la concentración del tinte y del tipo de láser usados existen variaciones en el espectro de emisión resultante que varía de aproximadamente entre 510 nm a aproximadamente 710 nm con el pico a 550 nm, sin embargo, es posible obtener eficiencias de conversión de energía superiores al 50% si se selecciona la concentración óptima de disolvente y tinte (62)(65).

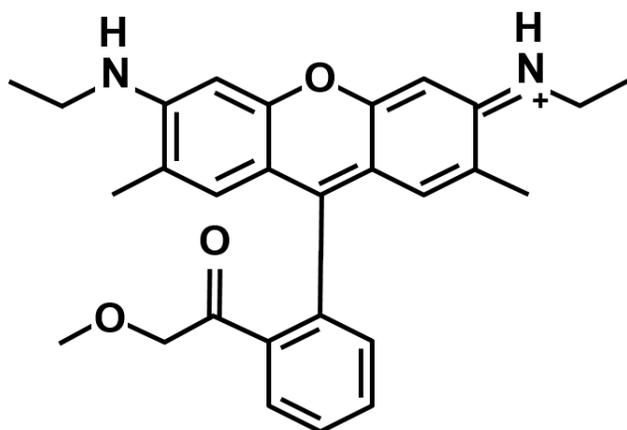


Fig. 9 Se muestra la estructura química de la rodamina 6G (R6G), también conocida como rodamina 590, es uno de los tintes más utilizados para su aplicación en láseres de tinción y como trazador de fluorescencia, por ejemplo, en el área de la hidráulica ambiental, este colorante se caracteriza por tener una fotoestabilidad muy alta y un rendimiento cuántico muy alto (0.95) (62).

Un compuesto de rodamina llamado rodamina 123 (R123) es una de las prueba más valiosas y conocidas para analizar mitocondrias vivas, en parte porque no es fuertemente fotosensibilizante y esa baja potencia puede explicarse por su rendimiento cuántico de fluorescencia muy alto (de $\phi_F \sim 0.9$) correspondiente a su bajo estado de triplete (de $\phi_T \sim 0.1$) y por su vida útil en estado de triplete relativamente corta (de más o menos 200 nanosegundos). Los datos obtenidos tras

la investigación confirmó que la R123 es una fototoxina relativamente débil en condiciones in vitro, sin embargo, los informes de fototoxicidad de la R123 a exposiciones radiantes son mucho menores y reflejan las condiciones del tratamiento con R123 para causar toxicidad significativa (66).

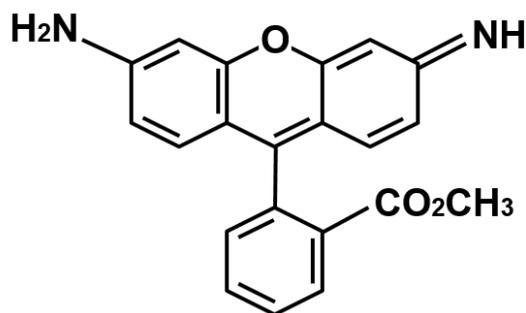


Fig. 9 Se presenta la estructura química de la rodamina 123, que es utilizada en una amplia gama de células, incluidas plantas y bacterias, es usada comúnmente para medir los potenciales de membrana mitocondriales de forma selectiva, es de uso sumamente viable para detección de células de cáncer a partir de su acople a dichas células, su fluorescencia está relacionada con las alteraciones en las distribución mitocondrial, sin mencionar que es ampliamente recomendada en densitometrías de flujo como un reportador funcional para glupoproteína de permeabilidad (Pgp).

Como las dos variantes anteriores, la rodamina B se utiliza ampliamente como medio activo en láseres de tinte pulsado y de onda continua, esta variante especialmente ha encontrado aplicación como sonda en sistemas de polielectrolitos biológicos y sintéticos; de forma adicional se encontró en la literatura la existencia de reportes donde el estado triplete de la rodamina B a veces ha estado implicado en procesos sin radiación, mientras que en otros trabajos se señala con rendimientos de estado triplete muy bajos en estado de excitación (62)(67).

Existen estudios en los que se utilizó rodamina B con un láser de tinte y disuelta en metanol de grado espectroscópico (BDH), etanol, glicerol para microscopía de fluorescencia, y mono-deuterometanol y D₂O (AAEC, 99-75% puro) tal como se suministraron; en la metodología se menciona que las soluciones se degradan con agua destilada y se usan de forma “fresca” para evitar adherencia del tinte a las paredes de los contenedores de vidrio, pues si se usa plástico, el tinte se adsorbe. Se utilizaron concentraciones de colorante de aproximadamente 10^{-6} mol dm⁻³ y

5×10^{-7} mol dm^{-3} para las mediciones de la vida útil de la fluorescencia y las determinaciones del rendimiento cuántico, respectivamente, se reporta que la rodamina B se puede ajustar a una longitud de onda en torno a 610 nm cuando se utiliza como láser de colorante y que su rendimiento cuántico de luminiscencia es de 0.65 en el etanol puro y 0.68 a 1.05 en etanol al 94%, sin embargo, peculiarmente en la rodamina B, dicho rendimiento también es dependiente de la temperatura (62)(65)(67).

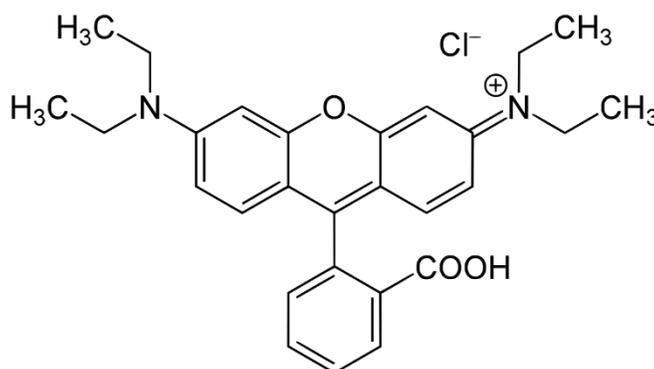


Fig. 10 Se muestra la estructura química de la rodamina B, de la que se destaca su solubilidad en agua de aproximadamente de 50 g/L. se detectó que con agua corriente, es decir, tratada con cloro descompone la rodamina B y pierde propiedades; cuando es disuelta en etanol tiene un rendimiento cuántico variable de 0.65 hasta 1.05 y es activado en con una longitud de onda en torno a 610 nm.

Usos

Por lo general los tintes de rodamina sensibles al potencial de membrana son utilizados para realizar mediciones dinámicas no invasivas del potencial de membrana mitocondrial, es un indicador clave de cómo es la energía mitocondrial, en sistemas in vitro como in vivo. De los compuestos existentes la rodamina 123 es la primera que demostró que las mitocondrias se teñían específicamente en respuesta a la cantidad de energía de las mitocondrias de las células cultivadas, y que existen químicos propios a las células que colapsan el potencial de la membrana y que impiden la captación de la R123 con las mitocondrias (64).

Se demostró que el espectro de fluorescencia de la rodamina 123 se desplaza con sentido a la respuesta de energización de las mitocondrias, y que existe una relación empírica lineal entre el cambio de intensidad de fluorescencia y el potencial de membrana celular(64).

Asociación en tratamientos con terapia fotodinámica

Existe una gran variedad de artículos referentes al uso de la rodamina como un tinte indicador fluorescente en experimentos para identificación de elementos celulares o de su actividad, a pesar de eso hablaremos únicamente de estudios que realizaron una comparación de efectividad entre dos derivados de rodamina, poniendo en contraste los resultados de la tetrabromo rodamina 123 (o TBR por sus siglas en inglés) y la rodamina 123, para obtener que la TBR es una fototixina con mayor potencia que la R123. Durante el ensayo con ambos colorantes se estudió la formación de colonias celulares que eran más sensibles a la microscopía de contraste o a la microscopía de fluorescencia, en función de los efectos citostáticos o citocidas, así como la expresión retardada de toxicidad. Se concluyó que la fototoxicidad de la R123 parece causar en gran parte efectos citostáticos, mientras que la TBR en gran parte citocidas; además de que esta cualidad de toxicidad aumenta los tiempos de radiación y exposición radiante para este último derivado. En el mismo estudio se muestra como hubo células que presentaron cierta integridad funcional de la membrana plasmática y otras en el resultado inverso, en el que las células habían perdido la mayoría de las funciones de la membrana y que mostraban cambios morfológicos extremos que indican necrosis. Con esos hallazgos se sugiere que con ambos tintes, la membrana plasmática no es el sitio de la lesión fototóxica primaria, sino que se ve afectada como un evento terminal en exposiciones de alta radiación y esta interpretación está respaldada por la falta de fluorescencia de los colorantes de rodamina detectable en la membrana plasmática de las células no irradiadas (64)(66).

Terapias Convencionales: Quimioterapia y Radioterapia

Quimioterapia

La quimioterapia es el uso de fármacos para destruir células de cáncer, su principal meta es evitar que crezcan y se multipliquen. Dado que estas células suelen crecer

y dividirse de manera más rápida que las células normales, la quimioterapia busca tener un efecto mayor en las células de cáncer, sin embargo, los fármacos utilizados para la quimioterapia son tan fuertes que dañan a las células sanas de todos modos. Por lo general la quimioterapia se clasifica en dos variantes: la estándar, que elimina tanto células de cáncer como células normales y la quimioterapia de tratamiento dirigido que trabaja en conjunto con la inmunoterapia enfocándose en objetivos moleculares específicos dentro o sobre las células de cáncer; en función de su localización el fármaco utilizado puede administrarse con inyecciones intramusculares, inyecciones subcutáneas, directamente en una arteria o vena a través de un catéter, inyecciones cefalorraquídeas e incluso con píldoras.

Funcionamiento de la quimioterapia

Al hablar de quimioterapia convencional hablamos de inducción de muerte celular por interferencia directa al DNA o dirigirse a proteínas clave de división celular, Se ha demostrado que la quimioterapia desempeña diferentes funciones en la inmunidad antitumoral; de forma fisiológica se desencadenan efectos cuando las células tumorales muertas inmunogénicas liberan antígenos asociados a tumores y patrones moleculares asociados con peligro, que reclutan células inmunes y hay señales fagocíticas; el taxano y la ciclofosfamida, reducen la inhibición de la actividad de las células T infiltradas en el tumor. Después están los mecanismos adicionales que pueden incluir el fortalecimiento de la actividad de las células T, la regulación negativa de los factores coinhibidores B7-H1, o la sensibilización de las células a la lisis mediada por células T (68)(69)(70).

Agentes quimioterapéuticos y su importancia

Los agentes quimioterapéuticos también conocidos como agentes citotóxicos, son el componente principal de la quimioterapia, de forma general estas sustancias radioactivas contienen en su estructura un radionúclido que es empleado para los radiofármacos y su forma química define su comportamiento en el organismo. Los radionúclidos utilizados deben reunir ciertas características, como una vida media física y biológica corta, para ser detectable en el organismo y no ocasionar irradiación excesiva, propiedades fisicoquímicas adecuadas para poder preparar el

radiofármaco en la forma farmacéutica requerida y en función de su uso es indispensable un aval de calidad en su síntesis, producción y manipulación que aseguren una aplicación eficaz. Igualmente se mencionan los 3 parámetros esenciales para el cumplimiento del propósito: (48).

1. Toxicidad selectiva e índice terapéutico: Se refiere al nivel en el que el agente se vuelve demasiado tóxico para el paciente, mientras se utiliza la cantidad de fármaco requerido para que el tratamiento clínico particular de cierta de una acción. Un agente terapéutico debe tener toxicidad selectiva, es decir, debe acabar o inhibir el patógeno específico mientras se daña al paciente lo menos posible y el índice terapéutico es la relación entre la dosis tóxica y la dosis terapéutica (71).
2. Efectos secundarios: Son efectos no deseados en el paciente, pueden ser de muchos tipos y pueden afectar a casi cualquier sistema de órganos, ocurren cuando el agente quimioterapéutico inhibe en mayor medida los procesos en las células sanas que en las células dañadas (71).
3. Rango de efectividad: La efectividad varía considerablemente en su rango de acción. Muchos son radiofármacos de espectro estrecho, es decir, son efectivos solo contra una variedad limitada de patógenos y otros son medicamentos de amplio espectro que atacan muchos tipos diferentes de patógenos (71).

Radioterapia

La radioterapia es un tratamiento contra el cáncer, su principio de funcionamiento es con el uso altas cantidades (dosis) de radiación, para destruir a las células de cáncer y evitar su propagación. La radiación utilizada es la misma que se usa para la obtención de imágenes, sin embargo, su cantidad es baja en forma de rayos X, por lo general se clasifica en 2 tipos, la externa que utiliza una máquina fuera del cuerpo que dirige la radiación a las células de cáncer y la interna, que es cuando la radiación se introduce al cuerpo, en las células de cáncer o cerca de ellas.

Funcionamiento de la radioterapia

Una de las características que distingue a la radioterapia es su capacidad para desencadenar respuestas antitumorales lejos del lugar irradiado (efecto abscopal). Cuando comienza un proceso de radioterapia, las células tumorales irradiadas que mueren por fagocitosis, a causa de la rotura de doble hebra (DSB) del DNA comienzan la activación de la ruta del estimulador de genes de interferón (STING), esta vía de detección del DNA mediada por STING demuestra en algunos estudios que la radioterapia tiene efectos positivos mediando los efectos antitumorales mediante la sinergia con el propio sistema inmunitario. En palabras más sencillas, el mecanismo de la radioterapia tienen base en radiaciones ionizantes que llevan a la muerte celular con las 5R de la radiobiología: reparación del daño por radiación, reproliferación acelerada después de la radiación, redistribución del ciclo celular, reoxigenación y radiosensibilidad (68)(72)(73).

Efectos positivos y negativos de la quimioterapia y radioterapia en el organismo

La sinergia de la quimioterapia, la radioterapia se ha utilizado ampliamente para práctica clínica porque tienen más efectos positivos en la inmunidad del tumor. Sin embargo, la activación de las respuestas antitumorales requiere la existencia de un cierto número de células inmunitarias funcionales, pero dado su efecto no dirigido, las células inmunitarias se agotan, aquí aparece un problema cuando el efecto no dura lo suficiente y para compensar su tiempo de vida se incrementa su dosis, sin tomar en cuenta la posible resistencia que pueda presentar el tumor al fármaco. Cuando se administran dosis bajas constantes se hace una acumulación que puede conducir al rebote del crecimiento tumoral. En series de experimentos de comparación en los que se usan dosis intermitentes de fármaco en la que hay respuestas antitumorales más fuertes in vivo como in vitro, la resistencia es aceptable. Cabe resaltar que sin importar la dosis y la cantidad de sesiones de terapia, el resultado final y los efectos que conlleve dependen en gran medida de la

función inmunológica de cada uno de los cuerpos y de las características biológicas del tumor en sí (68)(72).

A pesar de que estas terapias contra el cáncer tienen resultados exitosos, los efectos secundarios se hacen en cierta medida irrelevantes respecto a la terapia como tal, pues como se menciona brevemente en el párrafo anterior, la falta de respuesta o una reacción exagerada a la terapia depende del grado de avanzarse del cáncer y el estado de la persona. La mayoría de los efectos secundarios que se presentan en las personas suelen ser físicos y externos, como pérdida de cabello, debilitamiento físico y mental, disminución en el tono de la piel, etc. Además, tienen un impacto emocional muy grande derivado de la invasividad de estas técnicas que no tienen restricción de efectos para el área diana. Independientemente a esto, el tratamiento con quimioterapia y radioterapia pueden mejorar su eficacia reduciendo efectos desfavorables si se abordarán en conjunción con métodos modernos como el planteado en este proyecto. En el caso de la quimioterapia los fármacos viajan a través de la sangre hacia todo el cuerpo, no solo al área de interés, en consecuencia dañan o destruyen células normales. En concreto, los efectos secundarios de la radioterapia son muy similares a los de la quimioterapia pero dependen de la cantidad de dosis utilizada e incluyen la pérdida del cabello, ardor o enrojecimiento de la piel, adelgazamiento del tejido cutáneo e incluso el desprendimiento de la capa externa de la piel (68).

Uso de agentes quimioterapéuticos en terapia fotodinámica

Si bien no todos los elementos radiofarmacológicos siguientes han sido usados como fotosensibilizadores en la terapia fotodinámica, si han sido usados en el tratamiento de distintos tipos de cáncer demostrando resultados de utilidad para el presente trabajo, pues en sus propiedades se encuentran las necesarias para el tratamiento de células de cáncer con FDT porque participan de manera directa o indirecta en la producción de radicales libres o en el daño concreto al ADN de las células de cáncer, lo que constituye una posibilidad de uso para su implementación el método aquí planteado.

Las líneas de absorción de estos quimiofármacos se encuentran principalmente en el rango UV según los espectros UV-VIS. Por lo tanto con un láser de XeCl es posible provocar las transiciones deseada en los quimiofármacos de interés a 308 nm. Se muestra que los espectros de la fluorescencia inducida por láser (LIF) dependen en gran medida de la concentración de fluoróforo que da lugar al desplazamiento sensible al espectro rojo. Esto sucede cuando aparece una gran área de superposición entre los espectros de absorción y emisión en consecuencia. El desplazamiento al espectro rojo se tiene en cuenta como un parámetro característico de un determinado quimiofármaco. Los coeficientes de extinción de fluorescencia (α) y auto-quenching (k) se determinan con base al mejor ajuste de la ecuación de Lambert-Beer. El rendimiento cuántico de cada quimio-fármaco también se mide utilizando la linealidad de las tasas de absorción y emisión (74).

Metotrexato

El metotrexato (MTX) es una sustancia citotóxica, análogo del ácido fólico e interfiere directamente con el desarrollo de células de crecimiento rápido inhibiendo la acción de la dihidrofolato reductasa (DHFR) que juega un papel importante en el nucleósido de purina y en la síntesis de ADN, por lo que se usa para eliminar las células tumorales, también amortigua y reduce determinadas reacciones de defensa del organismo, que podrían resultar dañinas, como un efecto inmunosupresor, también presenta efectos antiinflamatorios (75)(76).

Para determinar sus espectros de absorción (espectrofotómetro UV-vis de Perkin Elmer), excitación y emisión (espectrofluorímetro Aminco Bowman) del MTX se utilizaron soluciones de agua salina natural e hidróxido de sodio a 10^{-4} - 10^{-5} M pH=8.4 para después exponer dichas soluciones a luz visible y casi ultravioleta emitida por lámparas de Xe y Hg, así como radiación láser pulsada de nitrógeno (láser N2) que emitiera pulsos de radiación coherente de 337.1 nm. Los espectros de absorción exhibieron bandas espectrales entre 225 nm y 450 nm. Los espectros de excitación de 200 nm - 500 nm se midieron con la emisión centrada en 470 nm;

se observó excitación de fluorescencia a 340 nm y 370 nm; Se detectó fluorescencia de emisión entre 400 nm y 600 nm, mostrando un máximo a 470 nm (76).

Doxorrubicina

La doxorrubicina (DOX) ha demostrado un gran potencial de tratamiento atitumoral ampliamente empleado en el tratamiento de cáncer, se sabe que cuando interactúa con otros antineoplásicos se potencia su toxicidad, entonces es considerado uno de los fármacos quimioterapéuticos más potentes aprobados por la FDA, por su capacidad de combatir células que se dividen rápidamente con progresión lenta, tiene una limitación solo por el grado de toxicidad en las células no cancerosas (77).

Es una antraciclina de clase I no selectiva, que posee características de un glucósido y se obtiene de *streptomyces peucetius*, no atraviesa la barrera hematoencefálica y se une a los tejidos en gran proporción, se metaboliza en forma rápida de 1 hora aproximadamente en el hígado para distribuirse a las dianas. La doxorrubicina actúa uniéndose a las enzimas asociadas al ADN de las células, puede intercalar los pares de bases de la doble hélice del ADN, al unirse a múltiples objetivos moleculares, como las enzimas topoisomerasa I y II, afecta la conjunción de la curcumina con una antiproliferación, lo que resulta en daño en el ADN. La vía apoptótica se desencadena cuando falla el intento de la célula por reparar las rupturas en su ADN y el crecimiento celular está inhibido en las fases G1 y G2. También se sabe que la doxorrubicina se intercala en el ADN, con la inhibición de la polimerasa de ADN y ARN, lo que resulta en el alto de la replicación del ADN y la transcripción del ARN. Este proceso ocurre cuando la doxorrubicina ingresa a la célula a través de la difusión utilizando su afinidad como análogo a glucosa para unirse al proteasoma del citoplasma (77)(78).

La DOX cuenta con buenas características de fluorescencia. Los espectros de dichas características se obtuvieron utilizando un láser modelo con resolución temporal femtosegundo a 800 nm; fue posible observar una dimerización que induce una reducción drástica del rendimiento cuántico asociado con un gran corrimiento espectral al rojo de 25 nm; se obtuvo que con una amplia banda de excitación

centrada en 480 nm: la línea de absorción máxima es de 292 nm, el ancho de banda de absorción de 50 nm, la longitud de onda emisiva de fluorescencia tiene un el pico en 591.48 nm, el ancho de banda emisivo de 150, y cambios espectrales de 12 nm (74).

La DOX podría fotoactivarse de forma interna mediante CR y, por tanto, potenciar su citotoxicidad para su uso con PDT. Existe un trabajo reciente en el que se utiliza 18F-FDG para evaluar el efecto de la radiación de Cerenkov sobre DOX y los resultados son puestos en comparación con la irradiación con un rayo láser de 450 nm, en términos de producción de ROS. En dicho trabajo la producción de especies reactivas de $^1\text{O}_2$ y O_2 , fueron detectadas indirectamente mediante blanqueamiento con ABMA y DCPIP, respectivamente durante la irradiación a la DOX y se evaluó el efecto citotóxico del sistema DOX/18F-FDG CR en la línea celular de cáncer de mama T47D. La irradiación de DOX produjo $^1\text{O}_2$ y O_2 en especies reactivas utilizando tanto 18F-FDG CR y un rayo láser de 450 nm. La mayoría de las especies reactivas producidas en ambos casos fue de $^1\text{O}_2$; un resultado favorable, dada la mayor citotoxicidad de esta especie la viabilidad de las células T47D en presencia de DOX (5 nM), 18F-FDG (37.5 μCi) y DOX (5nM)/18F-FDG (37.5 μCi) fue de (86 \pm 9)%, (84 \pm 8)% y (64 \pm 5)%, respectivamente; estos resultados sugieren un efecto citotóxico sinérgico derivado de la actividad citotóxica de DOX y su fotoactivación por 18F-FDG CR. Es importante señalar que el sistema podría optimizarse en términos de concentración de DOX y actividad de 18F-FDG para obtener mejores resultados. Debido al hecho de que la 18F-FDG se usa ampliamente en la obtención de imágenes nucleares, el sistema DOX/18F-FDG también posee características teragnósticas (79).

Bleomicina

La bleomicina es un derivado de *Streptomyces verticillus* y se ha utilizado en dentro de protocolos de quimioterapia desde hace más de 40 años, pertenece a una familia de antibióticos con estructura glucopéptida, los efectos tóxicos de la bleomicina se relacionan con su capacidad de mediar el daño en el ADN monocatenario y bacatenario, para esto se necesitan cofactores específicos: un metal de transición

reducido (Fe^{2+} o Cu), O_2 y un reductor de electrones, que en conjunto hacen una activación de la bleomicina, así esta química es capaz de hidrolizar enlaces proteicos, oxidar lípidos o escisión de moléculas de RNA o DNA, a través de la producción de radicales libres. Los tipos de daño en células de mamíferos inducido por bleomicina, sugieren que hay daños en la base, roturas de las cadenas sencillas y dobles y sitios apurínicos y apirimidínicos en las moléculas de DNA, siendo estas lesiones críticas del efecto citotóxico de la bleomicina. La bleomicina puede ser inactivada metabólicamente en tejidos normales y tumorales por una enzima llamada bleomicina-hidrolasa (80)(81)(82).

La bleomicina cuenta con buenas características de fluorescencia. Los espectros de dichas características se obtuvieron utilizando un láser modelo con resolución temporal femto segundo a 800 nm. Fue posible observar una dimerización que induce una reducción drástica del rendimiento cuántico asociado con un gran corrimiento espectral al rojo de 25 nm; se obtuvo que con una línea de excitación selectiva de 308 nm: la línea de absorción máxima es de 304 nm, el ancho de banda de absorción de 75 nm, la longitud de onda emisiva de fluorescencia tiene un el pico en 445.03 nm y ancho de banda emisivo de 250 (74).

Sí bien la bleomicina es efectiva en el tratamiento de cánceres de cabeza y cuello, renal, cervical, laríngeo, testicular, pulmonar y linfomas de Hodgkin entre otros; su uso deriva en algunos efectos secundarios que son dependientes de la dosis administrada, de los cuales la fibrosis pulmonar el más grave, sin mencionar el desarrollo de resistencia al mismo, sin embargo, su valor terapéutico puede mejorarse de convertirse en un profármaco, bajo la premisa de administrar un fármaco inactivo que posteriormente puede producir niveles terapéuticos activos que no lleguen a la toxicidad (81)(82).

Paclitaxel

Al igual que los fármacos anteriores, el paclitaxel es utilizado para el tratamiento del cáncer. Fue descubierto y aislado en 1968 como compuesto de la corteza de un árbol llamado "*Taxus brevifolia*" (83).

De la misma manera, el paclitaxel cuenta con características de fluorescencia. Los espectros de estas características se observaron utilizando un láser modelo con resolución temporal femtosegundo a 800 nm; se obtuvo que con una línea de excitación selectiva de 308 nm: la línea de absorción máxima es de 286 nm, el ancho de banda de absorción de 40 nm, la longitud de onda emisiva de fluorescencia tiene un el pico en 551.86 nm, ancho de banda emisivo de 35nm y cambios espectrales de 7 nm (74).

Es un fármaco que interviene de forma directa con la subunidad beta de la tubulina, esto hace que las células sufran una disfunción en su proceso de polimerización (ensamblaje) de los microtúbulos, segregación cromosómica y división celular. La cancelación en el proceso de polimerización es sumamente particular, porque a diferencia de otros radiofármacos, éste no daña la estructura, el paclitaxel rodea y estabiliza al microtúbulo de tal forma que simplemente bloquea o aísla de la acción de ensamble. De este modo, los cromosomas no podrán alcanzar la configuración necesaria para la metafase, así se bloquea la mitosis y prolonga la activación de los puntos de control de la mitosis, induciendo la apoptosis o bien revirtiendo el ciclo celular a la fase G, donde ya no habría cabida a la división celular (83)(84).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La terapia fotodinámica es una prometedora y poco invasiva modalidad de terapia para células de cáncer basada en el uso de fuentes de luz que excitan moléculas fotosensibles y como resultado producen especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante reacciones tipo I y tipo II. En gran medida la efectividad de la terapia fotodinámica depende de la capacidad de penetración de la luz de excitación y de la aglomeración del fotosensibilizador en los puntos diana; estas características suelen ser las principales limitantes en su aplicación clínica, por lo que en este trabajo el uso de distintas fuentes de excitación, como la absorción de dos fotones, favorecería en mayor medida la excitación de los fotosensibilizadores y posterior producción de ROS en células de cáncer, no únicamente las ubicadas en las capas superiores de la piel, igualmente las que se encuentran profundamente en el tejido. También el uso de rodaminas como fotosensibilizadores dadas sus características como moléculas catiónicas en un pH fisiológico con tendencia a aglomerarse en las mitocondrias de células de cáncer, como la rodamina 6G que específicamente puede producir ROS por reacción tipo I, usar otros tipos de rodamina brindan la oportunidad de evaluarlos como fotosensibilizadores para inducir reacciones de transferencia tipo I y así aumentar las posibilidades de la terapia fotodinámica a una mayor profundidad de tejido con excitación láser con longitud de onda a 1064 nm.

JUSTIFICACION

El cáncer es la segunda patología más letal en los últimos años, pues su amplia gama de variedades pueden afectar de distinta forma a las personas. Según la *WHO* el cáncer ha ocasionado 9.6 millones de muertes mundiales, pudiendo aumentar un 27% para 2030. En México se diagnostican aproximadamente alrededor de 195 mil casos nuevos cáncer malignos por año y derivan en 80 mil fallecimientos. Dada esta prevalencia es de suma importancia encontrar opciones terapéuticas más eficientes, eficaces y asequibles, pues las terapias convencionales se asocian a menudo con efectos secundarios sistémicos o limitadas por dosis de acumulada de radiación.

En este sentido la terapia fotodinámica es una modalidad terapéutica que usa fuentes de luz para excitar moléculas fotosensibles y producir especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de reacciones tipo I y tipo II. La terapia fotodinámica tiene méritos propios que la destacan en comparación con las terapias convencionales, que impactarían de forma directa a las personas que se sometan a esta variante de terapia en el futuro por sus características de mínima invasión y limitada toxicidad.

La efectividad de la terapia fotodinámica depende en gran medida de la capacidad de penetración de la fuente de luz de excitación y la acumulación del fotosensibilizador en el sitio diana, en ocasiones, estas características presentan limitantes para su aplicación en la clínica. La bioingeniería médica como un campo de convergencia de distintas áreas puede implicarse en el uso de las fuentes de excitación, y uso de efectos foto-físicos como la absorción de dos fotones, que ha favorecido la fotoactivación de fotosensibilizadores y producción de ROS en células de cáncer; en la selección de las rodaminas que se comportan como moléculas catiónicas en un pH fisiológico con tendencia a acumularse en las mitocondrias de células de cáncer, en particular la rodamina 6G capaz de producir ROS a través de reacciones tipo I, y evaluar con otros tipos de rodaminas la posibilidad de utilizarlas como fotosensibilizadores y evaluar sus reacciones de transferencia para ampliar aún más las posibilidades de la terapia fotodinámica no solo sobre tejidos

superficiales, también en tejidos profundos con la ayuda de fuentes de excitación en orden de longitudes de onda a 1064 nm.

HIPÓTESIS

Las rodaminas 6G, 123 y B se fotoactivan cuando se irradian con 1064 nm y podrán tener una aplicación potencial para terapia fotodinámica de células de cáncer.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la fotoactivación de rodaminas por absorción de 1064 nm por su potencial aplicación en terapia fotodinámica de células de cáncer

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar la ocurrencia de reacciones de transferencia tipo I en rodamina 6G, rodamina 123 y rodamina B inducidas por irradiación con 1064 nm.
- Evaluar la viabilidad celular inducida por irradiación de las rodaminas 6G, 123 o B con luz láser de 1064 nm.
- Evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducidas por la irradiación de las rodaminas 6G, 123 o B con luz láser de 1064 nm.

MÉTODOLOGÍA

Estudios químicos

1. Estimación de la ocurrencia de reacciones de transferencia tipo I en RG6 o R123 o RB inducidas por irradiación con 1064 nm

Para estimar la ocurrencia de reacciones de transferencia tipo I en las rodaminas RG6 o R123 o RB se utilizó el ácido fólico como indicador de la actividad del fotosensibilizador. En este procedimiento, se preparó una solución de rodamina 33 μM (R6G o R123 o RB) y ácido fólico 17 μM , la cual se irradió con un láser de 1064 nm durante 60 min a intervalos de 10 min cada irradiación. Cada experimento se repitió 3 veces con la finalidad de obtener promedios y desviación estándar de los datos recolectados. Se determinó el espectro de emisión y excitación con el espectrofluorímetro Horiba Jobin (Fluoromax-3). Los espectros de emisión se registraron a una longitud de onda de excitación (λ_{exc}) de 350 nm con resolución de 2 nm, tiempo de integración de 0.5 s y slit de 2 nm. Los espectros de excitación de las rodaminas se registraron a una longitud de onda de emisión (λ_{emi}) de 560 nm, con barrido de 250 nm a 550 nm. El espectro de excitación del ácido fólico se registró a una longitud de onda de emisión (λ_{emi}) de 450 nm con un barrido de 250 nm a 400 nm. Todos los espectros de excitación se obtuvieron con una resolución de 2 nm y tiempo de integración de 0.5 s. Se utilizó una cubeta de cuarzo, de 4 caras transparentes, 1 cm de paso óptico y 3 mL de volumen (85).

Para el conjunto de los espectros de emisión rodamina: ácido fólico, los valores de fluorescencia correspondientes al máximo de emisión de cada rodamina y del ácido fólico se normalizaron tomando como 100% la señal a $t = 0$ min. Con los valores promedios correspondientes a la emisión del ácido fólico (448 nm) se construyó una gráfica de *Intensidad de fluorescencia normalizada vs tiempo*, cuya pendiente representa la tasa de ruptura del ácido fólico debido a reacciones de transferencia tipo I en presencia de rodamina (R6G o R123 o RB) (85).

Con fines de comparación, se evaluó la estabilidad de las soluciones de rodamina (33 μM):ácido fólico (17 μM) sin irradiar. Los espectros de emisión se registraron a 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50, y 60 min utilizando una $\lambda_{\text{exc}}= 350 \text{ nm}$. Se utilizó como control, el espectro de emisión de fluorescencia de una solución de ácido fólico 17 μM ($\lambda_{\text{exc}} 350 \text{ nm}$) irradiada a 1064 nm durante 60 min a intervalos de 10 min cada irradiación (85).

Estudios *in vitro*

1. Cultivo celular

La línea celular de cáncer de mama T47D de sigma-Aldrich, se cultivó a 37 °C en una atmósfera de 5 % de dióxido de carbono (CO_2) y 80 % de humedad, en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Sigma-Adrich Co) suplementado con suero fetal bovino al 10%, anfotericina B y antibióticos (estreptomina y penicilina) al 1%.

2. Evaluación de la viabilidad y citotoxicidad celular

Para evaluar el número de células viables y citotoxicidad celular, después de la irradiación de las rodaminas con luz láser de 1064 nm, se utilizó el ensayo de proliferación celular XTT (cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio). Para este ensayo se utilizó una placa de 96 pozos (1×10^4 células por pozo). La placa se incubó por una hora con el tratamiento. Posteriormente, se colocó el reactivo XTT dejando incubar por 24 horas. Después del tiempo de incubación se leyó la placa en un espectrofotómetro Epoch. Los valores de absorbancia fueron normalizados con la absorbancia de un grupo control. Como grupo control se utilizó células sin tratamiento, células con sólo el agente quimioterapéutico y células irradiadas 1064 nm (85).

3. Evaluación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) por microscopia de fluorescencia

Para evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno se colocaron 2×10^4 células en una caja de 96 pozos y se dejaron incubar por 24 h para alcanzar una

confluencia mayor al 85%. Posteriormente, las células se incubaron por 45 min con la rodamina 6G o 123 o B y se irradiaron a 1064 nm por 15 min. Se agregó el reactivo CellRox a una concentración de 5 μ M y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, se removió el medio y se lavó tres veces con PBS. Se fijaron las muestras en portaobjetos con formaldehído al 3.7% fijando con esmalte transparente y se dejaron a temperatura ambiente durante 24 horas. Las muestras se analizaron en el microscopio de fluorescencia y las imágenes obtenidas se evaluaron en Image J como complemento descriptivo a los datos brutos (85).

4. Análisis estadísticos

Se realizó un análisis estadístico de ANOVAS univariados para los estudios de viabilidad celular (dada la cantidad de datos, en este caso 3, no se puede usar normalidad, sin embargo, se consideró que la prueba era normal porque se hizo sobre muestras de miles de células, con tal cantidad, los tres datos de toxicidad se consideran normales y entran en homogeneidad de varianza para justificar el uso de ANOVAS). La variable evaluada (dependiente) fue la viabilidad celular a diferentes tiempos post-irradiación con 1064 nm. La viabilidad del grupo control se consideró 100% en los 3 tiempos. La irradiación con 1064 nm se realizó durante 5 min y este valor fue constante en todos grupos irradiados. Se realizaron 9 ANOVAS univariados considerando lo siguiente: tres variables independientes (1 h, 4h y 24 h) y 4 niveles de cada variable independiente (control, 1064 nm, R-X y R-X+1064 nm); siendo R-X: R6G, R123 y RB. También se realizó un análisis de medias mediante la prueba de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La formación de ROS durante la terapia fotodinámica se lleva a cabo mediante dos mecanismos principales, conocidos como reacciones de transferencia tipo I y tipo II. La identificación y cuantificación de ROS es parte fundamental para determinar la ocurrencia de las reacciones tipo I o II durante la irradiación de un fotosensibilizador. Particularmente, el rompimiento del ácido fólico (FA) se ha utilizado como indicador de la ocurrencia de reacciones de transferencia tipo I (86)(87)(88). Para conocer el efecto del láser de 1064 nm sobre la emisión del FA, se irradió a diferentes tiempos (de 0 a 10 min). Como se observa en la Figura 11A, antes y después de la irradiación, el máximo de emisión del FA se centró a 442 nm con una mínima variación en la intensidad de fluorescencia. A los 2 min de irradiación, la intensidad de fluorescencia en 442 nm disminuyó un 3%, mientras que, de los 4 a 10 min de irradiación, la intensidad de fluorescencia varió solo en un 2% (Figura 11B). Lo anterior muestra que la luz láser de 1064 nm no genera rompimiento del FA, por lo que; un incremento en la señal de emisión del FA después de irradiar soluciones de rodamina + FA con 1064 nm indicaría rompimiento del FA debido a reacciones de transferencia tipo I.

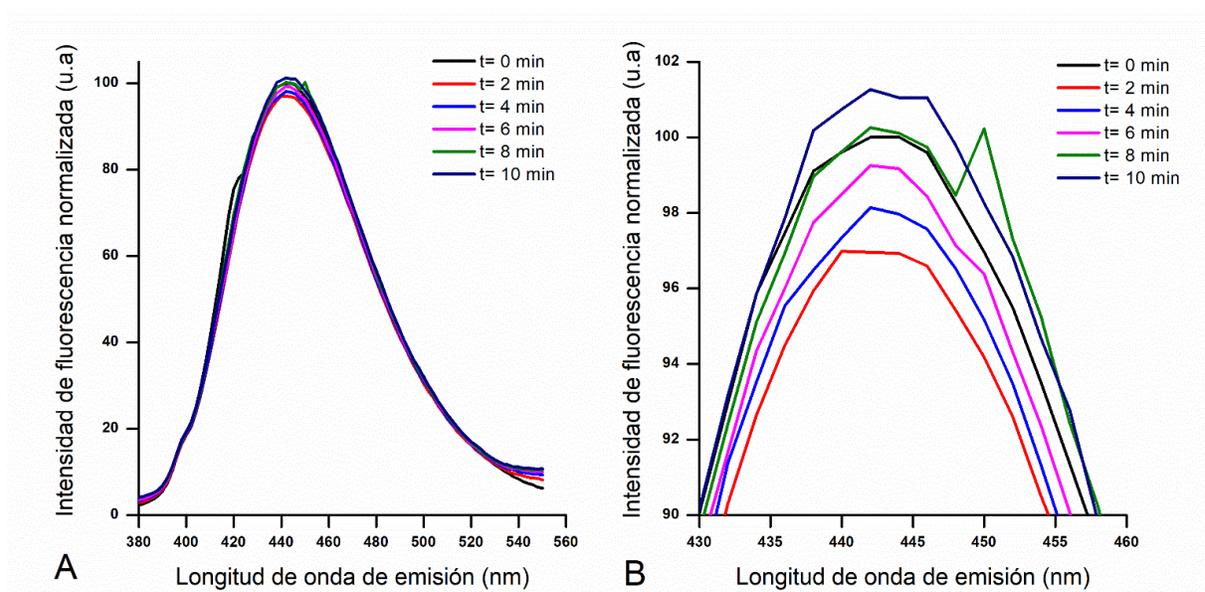


Figura 11 A) Espectro de emisión del ácido fólico ($\lambda_{exc} = 350 \text{ nm}$) y B) comportamiento del máximo de emisión ($\lambda_{max} = 442 \text{ nm}$) del ácido fólico después de la irradiación con 1064 nm en diferentes tiempos.

La Figura 12 muestra los espectros de emisión de fluorescencia de la solución R6G (33 μM): FA (17 μM) después de la irradiación con 1064 nm a diferentes tiempos. Se observó que el máximo de emisión de la R6G se mantiene en 562 nm durante el período de irradiación (Figura 2 A y B). Sin embargo, el máximo de emisión disminuyó de 100% ($t = 0$ min) a 92.01% ($t = 10$ min). Esta variación se considera moderada en las condiciones del estudio (85). Para el FA, la máxima emisión se centró en 434 nm ($t = 0$ min, 100%) con un aumento significativo al final de la irradiación ($t = 10$ min, 127%). Este comportamiento sugiere la ocurrencia de reacciones de transferencia entre la R6G y el FA durante la irradiación con 1064 nm.

La Figura 13 muestra los espectros de emisión de fluorescencia de la solución R123 (33 μM): FA (17 μM) tras la irradiación con 1064 nm a diferentes tiempos. El máximo de emisión de la R123 se mantuvo en 525 nm durante el período de irradiación, pero la intensidad disminuyó de 100% ($t = 0$ min) a 97.5% ($t = 10$ min). Dicha variación se considera moderada en las condiciones del estudio. Para el FA, la máxima emisión se centró a 438 nm ($t = 0$ min) y tras la irradiación, el máximo de emisión tuvo un ligero aumento (103%). Lo anterior indica la ocurrencia de reacciones de transferencia entre R123 y FA a 1064 nm durante la irradiación con 1064 nm.

La Figura 14 muestra el comportamiento del espectro de fluorescencia de la RB (33 μM): FA (17 μM) tras la irradiación con 1064 nm a diferentes tiempos. La emisión máxima de la RB se mantuvo en 588 nm durante el estudio. Tras 10 min de irradiación, la intensidad disminuyó hasta un 56.2%. Esta variación sugiere que la RB sufrió una mayor fotodegradación en comparación con los compuestos de R6G y R123. El máximo de emisión de FA se mantuvo a 440 nm durante toda la irradiación. La intensidad de la señal fluorescente de FA aumentó un 27% al final del experimento, lo que sugiere igualmente la producción de reacciones de transferencia entre RB y FA a 1064 nm.

De acuerdo con las pendientes de las ecuaciones de la tabla 3, todas son diferentes de cero. La interpretación indica que las tres rodaminas 6G, 123 y B se excitaron y

reaccionaron en presencia del FA durante la irradiación con 1064 nm. Las pendientes positivas distintas de cero indican fotodegradación del FA mediante reacciones de transferencia tipo I y, cuya ocurrencia fue: R6G ($m= 2.91$) > RB ($m= 2.73$) > R123 ($m= 0.412$). Recientemente, Jiménez-Mancilla et al. (2020) evaluó la ocurrencia de reacciones de transferencia tipo I, a través de la degradación del FA, al irradiar R6G, R123 y RB con un láser de 432 nm. La tendencia de las reacciones tipo 1 fueron: R123 ($m=1.622$) > R6G ($m=0.949$) > RB ($m=0.740$). Al comparar las pendientes correspondientes a la irradiación con 1064 nm y 532 nm, se puede observar que ocurre una mayor fotodegradación del FA (de hasta 3 veces más) al irradiar R6G o RB con 1064 nm. Estos resultados sugieren que la fotoactivación de R6G y RB con 1064 nm tiene mayor probabilidad de ocurrencia en comparación con 532 nm. Esto último tiene relación con la literatura, ya que se reporta que la absorción de 2 fotones ocurre cuadráticamente, mientras que la absorción de 1 fotón es lineal (Fischer et al., 1995).

Diferentes autores han sugerido que la irradiación del FA con luz UV o con 432 nm produce fotodegradación del FA en grupos pteridina, los cuales tienen mayor intensidad de fluorescencia que el FA (85)(89). En congruencia con dichos autores, la fotodegradación del FA durante la irradiación con 1064 nm de las tres rodaminas igualmente sugiere la formación de grupos pteridina. Las tres variantes de rodamina pasaron por un fotoblanqueo, el cual se describe con las pendientes negativas de las ecuaciones de la Tabla 3, y cuya ocurrencia es: RB (-4.26) > R6G (-0.76) > R123 (-0.21).

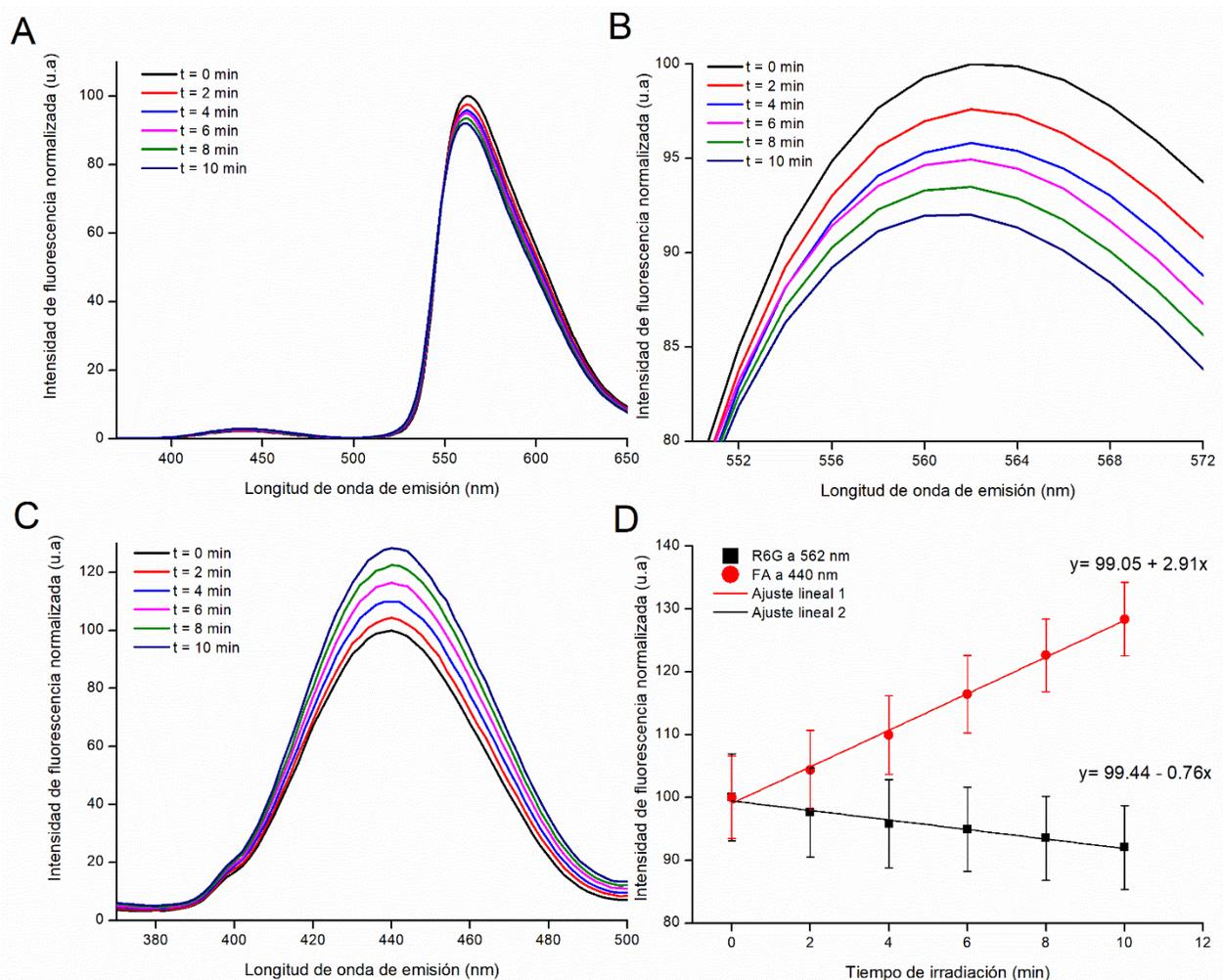


Figura 12 A) Espectros de emisión de R6G: FA después de la irradiación con 1064 nm en diferentes tiempos. B) Comportamiento de R6G en su máxima intensidad. C) Comportamiento de FA en su máxima intensidad. D) Comportamiento matemático de R6G y FA en sus máximos de fluorescencia tras irradiación con 1064 nm en diferentes tiempos.

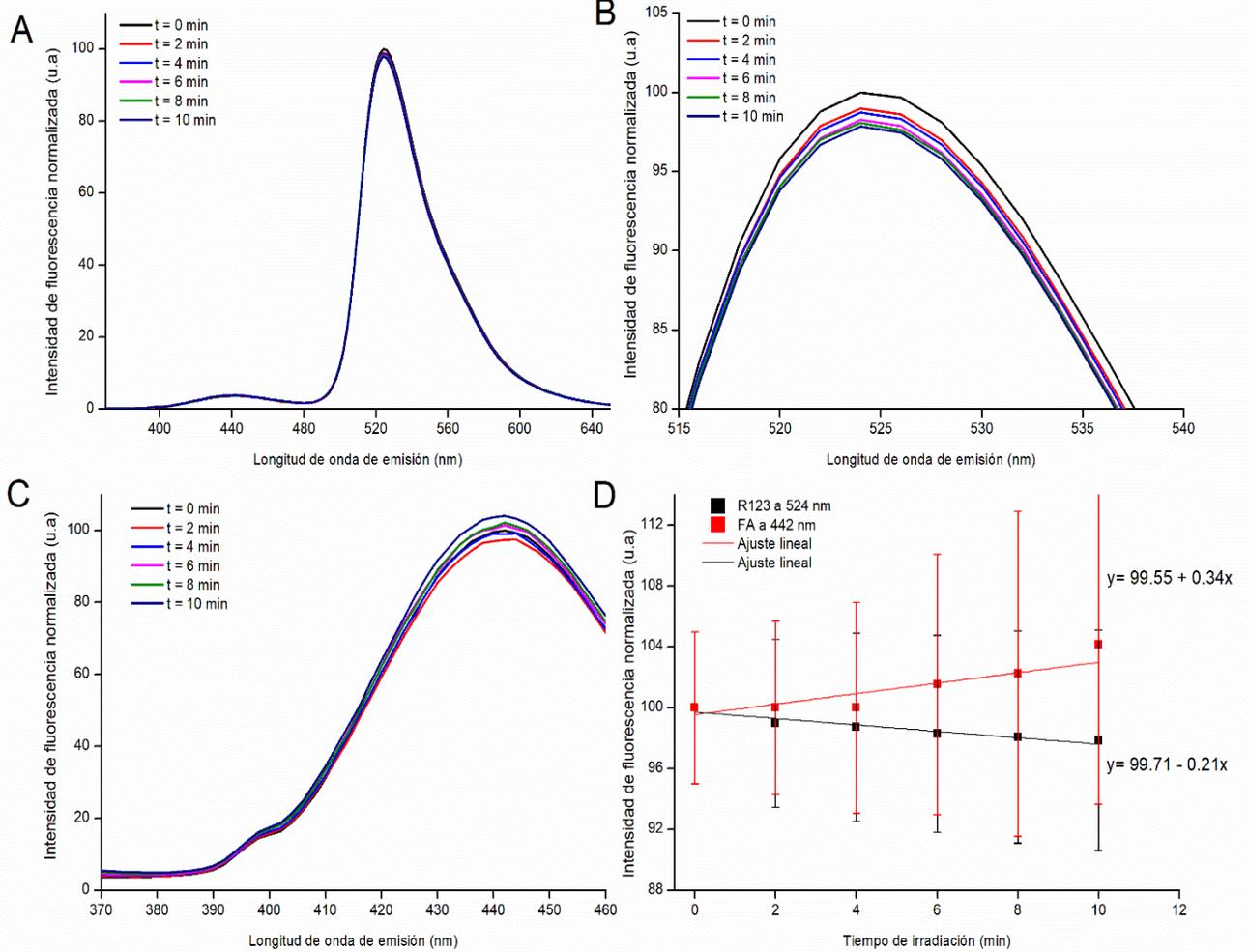


Figura 13 A) Espectros de emisión de R123 : FA tras irradiación con 1064 nm en diferentes tiempos. B) Comportamiento de la R123 en su máxima intensidad. C) Comportamiento de FA en su máxima intensidad. D) Comportamiento matemático de R123 y FA en sus máximos de fluorescencia tras irradiación con 1064 nm en diferentes tiempos.

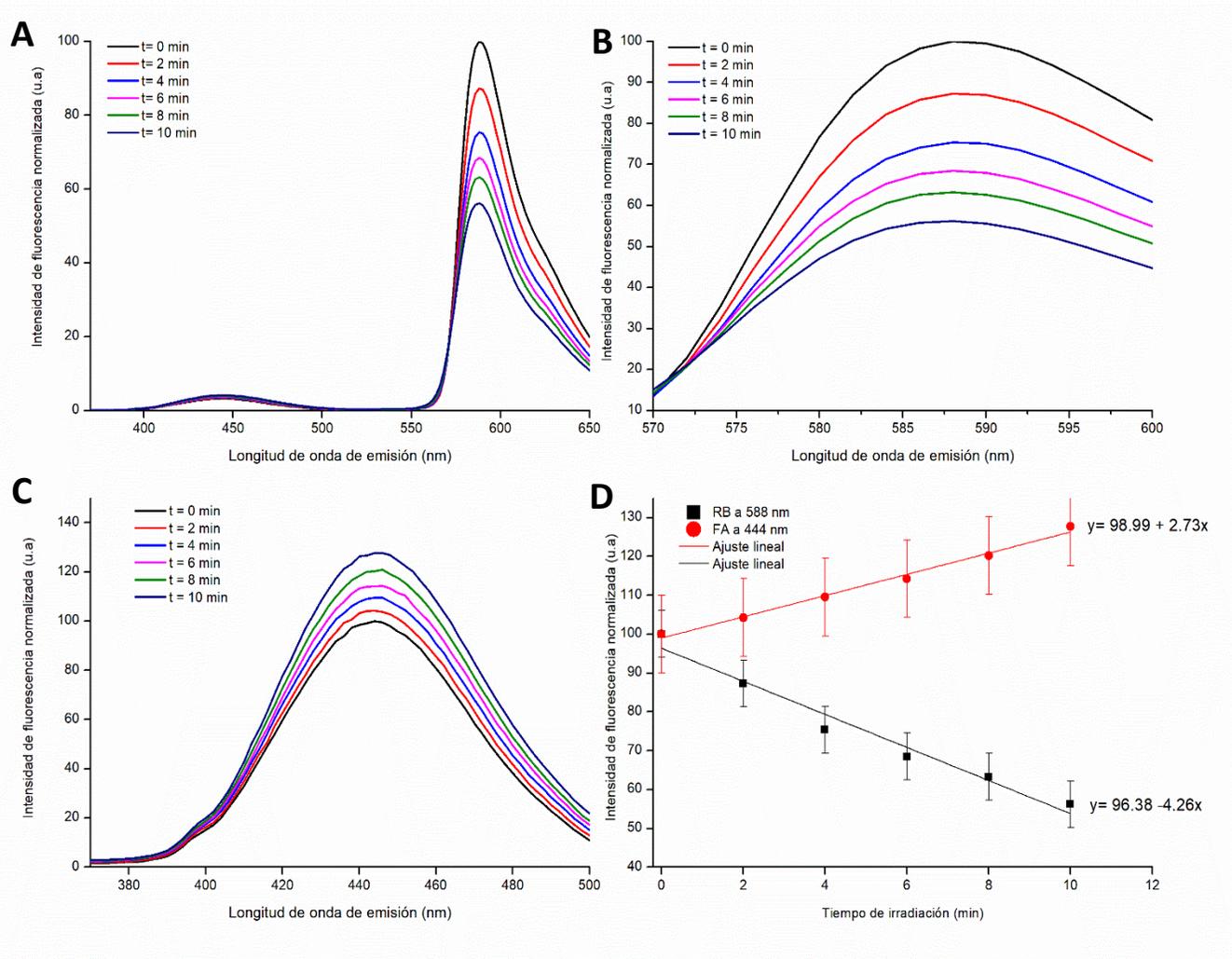


Figura 14 A) Espectros de emisión de RB: FA tras irradiación con 1064 nm en diferentes tiempos. B) Comportamiento de RB en su máxima intensidad. C) Comportamiento de FA en su máxima intensidad. D) Comportamiento matemático de RB y FA en sus máximos de fluorescencia tras irradiación con 1064 nm en diferentes tiempos.

Tabla 3 Comportamiento matemático de las pendientes de la emisión de fluorescencia y / o absorción de UV / Vis máximos de R, FA y DCPIP durante la irradiación a 532 nm en diferentes momentos.

Método	Sistema	FA	R 6G	R 123	R B
Fluorescencia	R6G: FA	$y = 99.05 + 2.91x$ $R^2 = 0.996$	$y = 99.44 - 0.76x$ $R^2 = 0.976$		
	R123 : FA	$y = 99.55 + 0.34x$ $R^2 = 0.726$		$y = 99.71 - 0.21x$ $R^2 = 0.877$	
	RB : FA	$y = 98.99 + 2.73x$ $R^2 = 0.989$			$y = 96.38 - 4.26x$ $R^2 = 0.960$

La Figura 15 muestra la viabilidad de las células de cáncer T47D tratadas con rodamina 6G, 123 y B e irradiadas con 1064 nm a 1, 4 y 24 h. Se puede observar que, tras aplicar sólo la irradiación con 1064 nm, la viabilidad se mantuvo entre 100% y 115%. También se observa que, la concentración de 200 nM de R6G, R123, RB tuvo un impacto moderado sobre la viabilidad en los primeros tiempos evaluados mientras que, a las 24 h sólo la R6G mantuvo el efecto moderado. La exposición de las células a la combinación de R6G e irradiación con 1064 nm mostró la existencia de un mayor efecto citotóxico, ya que produjo una disminución sobre la viabilidad del 6%, 19% y 43% a la 1, 4 y 24 h respectivamente. Mientras que, la irradiación con 1064 nm de R123 y RB no mostraron un efecto significativo sobre la viabilidad.

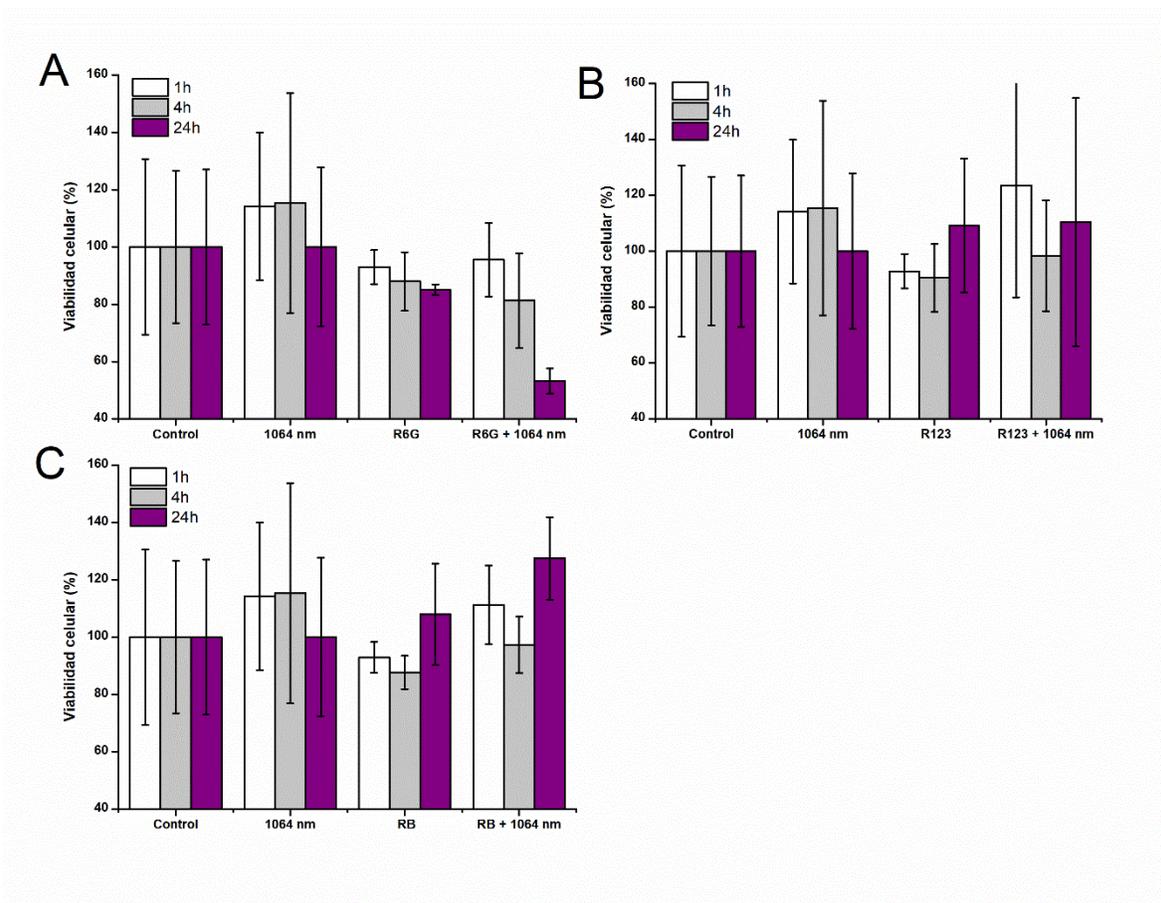


Figura 15. Viabilidad de células T47D tratadas con R6G (A) o R123 (B) o RB (C) e irradiación con 1064 nm a diferentes tiempos.

Para el análisis estadístico (Figura 15) se consideró como variable dependiente a la viabilidad celular a diferentes tiempos posterior a la irradiación con 1064 nm. La viabilidad de las células control se consideró 100% en los 3 tiempos. La irradiación con 1064 nm se realizó durante 5 min y este valor fue constante en todos grupos irradiados. Se realizaron 9 ANOVAS univariados considerando lo siguiente: tres variables independientes (1h, 4h y 24h) y 4 niveles de cada variable independiente (control, 1064 nm, R-X y R-X+1064 nm); siendo R-X: R6G, R123 y RB.

De los 9 ANOVAs univariados realizados (3 por cada gráfica), solamente el que corresponde a la variable independiente 24 h y niveles control, 1064 nm, R6G y R6G+1064 nm resultó tener diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). El análisis de medias mediante la prueba de Tukey indicó que la única media estadísticamente diferente (menor) ($p < 0.05$) es la viabilidad celular 24 h post-irradiación. Por lo tanto, solamente existe efecto citotóxico al combinar R6G con 1064 nm. Este efecto citotóxico es fotodinámico, ya que la muerte celular ocurrió en presencia de ambos y no con cada uno de ellos por separado. Los tiempos de 1h y 4h para esta rodamina no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$), lo que indica que el efecto fotodinámico requiere de un tiempo para evidenciarse.

Los 8 ANOVAs restantes no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) indicando que, ni la irradiación de las células con 1064 nm ni la exposición de las células a las 3 diferentes rodaminas (sin irradiación) resultaron tóxicas. Tampoco hubo efecto fotodinámico al combinar las rodaminas 123 o B con 1064 nm. La muerte celular de la combinación R6G+1064nm se debe a la absorción multifotónica de la R6G, la cual es más probable con esta rodamina que con la R123 o RB.

La Figura 16 muestra la producción de ROS usando el reactivo CellROX Green, que funciona como una sonda de fluorescencia cuando está reducido y se torna verde brillante tras la oxidación por ROS (90). El CellROX Green se une al ADN y por tanto, su señal se localiza en el núcleo y mitocondria. Cualitativamente, en las células T47D tratadas con R6G e irradiadas con 1064 nm se muestra una alta señal

de fluorescencia en el núcleo celular en comparación con la intensidad producida con R6G o 1064 nm. Dicha intensidad se relaciona con la producción de ROS, siendo cualitativamente mayor en el grupo de R6G+1064 nm. Estos resultados se relacionan con la disminución de viabilidad de células de cáncer al irradiar R6G con 1064 nm.

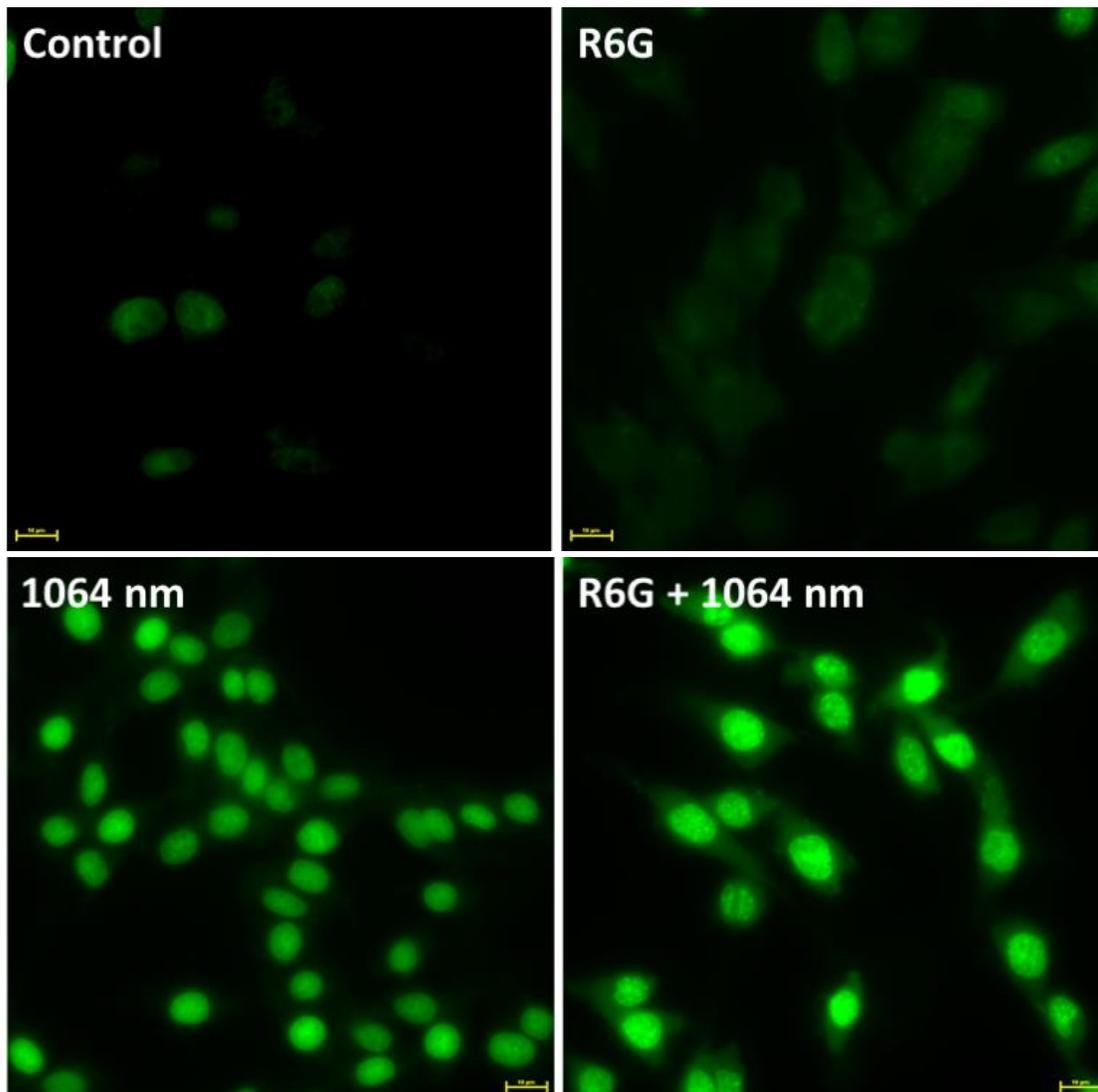


Figura 16. Detección de especies reactivas de ROS en células T47D tratadas con R6G e irradiación con 1064 nm, la mayor fluorescencia es visible en los núcleos celulares correspondientes al grupo R6G + 1064 nm.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se muestra que, a través de irradiación con luz láser de 1064 nm, los tres compuestos de rodamina estudiados (R6G, R123 y RB) presentan reacciones de transferencia de tipo I con el ácido fólico en el siguiente orden: R6G> RB> R123. A nivel *in vitro*, la irradiación de las tres R produce un efecto negativo sobre la viabilidad celular, siendo R6G + 1064 nm la que mayor muerte celular induce. La producción de ROS en las células T47D fue mayor el núcleo celular cuando se trataron con R6G+1064 nm en comparación con R6G o 1064 nm. Este trabajo muestra que la fotoactivación de la R6G con 1064 nm representa una alternativa para ser utilizado en PDT de dos fotones.

IMPLICACIONES ÉTICAS

En el presente trabajo no se trabajó directamente con seres humanos o animales, por lo que no hay mayor problema relacionado a las implicaciones éticas, pues nos apegamos a las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana de bioseguridad NOM-087-ECOL-SSA1-2002 que señala la clasificación de los residuos peligrosos biológico-infecciosos así como las especificaciones para su manejo. Esta norma es de observancia obligatoria para los establecimientos que generen residuos peligrosos biológico-infecciosos y los prestadores de servicios a terceros que tengan relación directa con los mismos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, Saczko J, Kędzierska E, Knap-Czop K, et al. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed Pharmacother*. 2018;106(June):1098–107.
2. Jiménez-mancilla NP, Isaac-olivé K, Torres-garcía E, Camacho-lópez MA, Ramírez-nava GJ, Mendoza-nava HJ, et al. Theoretical and experimental characterization of emission and transmission spectra of Cerenkov radiation generated by ¹⁷⁷Lu in tissue. 2019;24(7).
3. Lucky SS, Soo KC, Zhang Y. Nanoparticles in Photodynamic Therapy. *Chem Rev*. 2015;115(4):1990–2042.
4. Hwang HS, Shin H, Han J, Na K. Combination of photodynamic therapy (PDT) and anti-tumor immunity in cancer therapy. *J Pharm Investig [Internet]*. 2018;48(2):143–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s40005-017-0377-x>
5. Ogawa K, Dy J, Kobuke Y. Substituent effect on two-photon absorption properties of conjugated porphyrins. *J Porphyr Phthalocyanines [Internet]*. 2006;9(2):735–44. Available from: <https://doi.org/10.1142/S1088424605000848>
6. Bolze F, Jenni S, Sour A, Heitz V. Molecular photosensitisers for two-photon photodynamic therapy. *Chem Commun [Internet]*. 2017;53:12857–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C7CC06133A>
7. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy : part two — cellular signaling , cell metabolism and modes of cell death. 2005;1000.
8. Robertson CA, Evans DH, Abrahamse H. Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J Photochem Photobiol B Biol [Internet]*. 2009;96(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.04.001>
9. Baracca A, Sgarbi G, Solaini G, Lenaz G. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential : evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis. 2003;1606:137–46.
10. Belostotsky I, Silva SM, Paez MG, Indig GL. Mitochondrial targeting for photochemotherapy . Can selective tumor cell killing be predicted based on n-octanol / water distribution coefficients ? 2011;86(5):302–14.
11. Davies KS, Linder MK, Kryman MW, Detty MR. Bioorganic & Medicinal Chemistry Extended rhodamine photosensitizers for photodynamic therapy of cancer cells. *Bioorg Med Chem [Internet]*. 2016;24(17):3908–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2016.05.033>

12. Hill JE, Linder MK, Davies KS, Sawada GA, Morgan J, Ohulchanskyy TY, et al. Selenorhodamine Photosensitizers for Photodynamic Therapy of P - Glycoprotein-Expressing Cancer Cells. 2014;(3).
13. Liu C, Zhou L, Wei F, Li L, Zhao S, Gong P, et al. Versatile Strategy To Generate a Rhodamine Triplet State as Mitochondria-Targeting Visible-Light Photosensitizers for Efficient Photodynamic Therapy. ACS Appl Mater Interfaces. 2019;11:8797–806.
14. Liulin W, Wei D, Zhangjun H, Kajsa U, Lin L, Huang W. Hybrid Rhodamine Fluorophores in the Visible–NIR Region for Biological Imaging. J Gesellschaft Dtsch Chem Angew Chemie [Internet]. 2019;1–22. Available from: www.angewandte.org
15. Hirakawa K, Ota K, Hirayama J, Oikawa S, Kawanishi S. Nile Blue Can Photosensitize DNA Damage through Electron Transfer. Chem Res Toxicol [Internet]. 2014;1–7. Available from: pubs.acs.org/crt
16. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. Am J Pathol [Internet]. 2007;170(5):1445–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2007.070011>
17. Icard P, Fournel L, Wu Z, Alifano M, Lincet H. Interconnection between Metabolism and Cell Cycle in Cancer. Trends Biochem Sci [Internet]. 2019;xx:1–12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.12.007>
18. Shulman S, Steyaert J-M, Farhat D, Icard P, Lincet H, Alifano M. How the Warburg effect supports aggressiveness and drug resistance of cancer cells? Drug Resist Updat [Internet]. 2018;38(March):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.drug.2018.03.001>
19. Vander Heiden MG, DeBerardinis RJ. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. Cell [Internet]. 2017;168(4):657–69. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.039>
20. Malumbres M. Cyclin-dependent kinases. Genome Biol [Internet]. 2014;15(6):122. Available from: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb4184>
21. Moncada S, Higgs EA, Colombo SL. Fulfilling the metabolic requirements for cell proliferation. Biochem J. 2012;446(1):1–7.
22. Aarts M, Linardopoulos S, Turner NC. Tumour selective targeting of cell cycle kinases for cancer treatment. Curr Opin Pharmacol [Internet]. 2013;13(4):529–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2013.03.012>
23. Kumar V, Abbas AK, C. AJ. Robbins and Cotran Pathologib Basis of Disease. In ESPAÑA: S.A. ELSEVIER; 2010. p. 1475.
24. Felsher DW. Cancer revoked: Oncogenes as therapeutic targets. Nat Rev Cancer. 2003;3(5):375–80.

25. Guo T, Yoon J, Li X, Kwon N, Liu Z. Innovative Strategies for Hypoxic-Tumor Photodynamic Therapy. *Angew Chemie Int Ed*. 2018;57(36):11522–31.
26. Ding H, Yu H, Dong Y, Tian R, Huang G, Boothman DA, et al. Photoactivation switch from type II to type I reactions by electron-rich micelles for improved photodynamic therapy of cancer cells under hypoxia. *J Control Release* [Internet]. 2011;156(3):276–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.08.019>
27. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one — photosensitizers , photochemistry and cellular localization. 2005;1000(2004).
28. Hiroyuki T, Hingo M, Makoto H, Shu T, Shizuo A, Setsuro K, et al. CCAAT/Enhancer-binding Protein beta Promotes Osteoblast Differentiation by Enhancing Runx2 Activity with ATF4. *Mol Biol Cell*. 2008;19(12):5373–86.
29. Gollnick SO, Owczarczak B, Maier P. Photodynamic therapy and anti-tumor immunity. *Lasers Surg Med*. 2006;38(5):509–15.
30. Victoria G, Eva R. Uso de nanopartículas (NP) en la terapia fotodinámica (photodynamic therapy [PDT]) contra el cáncer. 2015;1–6.
31. Capella MAM, Capella LS. A light in multidrug resistance: Photodynamic treatment of multidrug-resistant tumors. *J Biomed Sci*. 2003;10(4):361–6.
32. Noske DP, Wolbers JG. Review article Photodynamic therapy of malignant glioma. *Neurosurgery*. 1991;93:293–307.
33. Helmchen F, Denk W. Deep tissue two-photon microscopy. 2005;2(12). Available from: http://www.hifo.uzh.ch/research/helmchen/publication/helmchen2005_natmet.pdf
34. Mayer A, Thomas HP, Vogel H, Steitz TA, Engelman DM, McKay DB, et al. Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy. *Sci J* [Internet]. 1990;248(4951):73–6. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/248/4951/73>
35. TKACHENKO N V. Two photon absorption. In: *Optical Spectroscopy Methods and Instrumentations* [Internet]. Tampere, Finland: Elsevier Science; 2006. p. 293–4. Available from: <https://www.sciencedirect.com/book/9780444521262/optical-spectroscopy#book-description>
36. Review I, Diaspro A, Robello M. imaging of biological structures. *J Photochemistry Photobiol* [Internet]. 2000;55(1):1–8. Available from: <https://europepmc.org/article/MED/10877060>
37. Liebert MA, Ph D, Kumar ND, Ph D, Zhao C, Ph D, et al. Photodynami. *J Clin Laser Med Surg* [Internet]. 1997;15(5):201–4. Available from: <https://sci-hub.scihubtw.tw/10.1089/clm.1997.15.201>

38. Liu J, Zhao YW, Zhao JQ, Xia AD, Jiang LJ, Wu S, et al. Two-photon excitation studies of hypocrellins for photodynamic therapy. *J Photochemistry Photobiol* [Internet]. 2002;68:156–64. Available from: [https://scihub.scihubtw.tw/10.1016/s1011-1344\(02\)00379-2](https://scihub.scihubtw.tw/10.1016/s1011-1344(02)00379-2)
39. Ogawa K, Makiuchi N, Kobuke Y. Synthesis and Self-Organization of Fluorene-Conjugated Bisimidazolylporphyrin and Its Optical Properties. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2013;14:322–31. Available from: <https://scihub.scihubtw.tw/10.3390/ijms14010322>
40. Achelle S, Saettel N, Baldeck P. Bisporphyrin connected by pyrimidine: synthesis and photo physical properties. *J Porphyr Phthalocyanines* [Internet]. 2010;14:877–84. Available from: <http://www.worldscinet.com/jpp/>
41. Xueqin SUN, Xian Z, Shulan Z, Baidong LI, Xiufeng C. Effects of the structure of the branches on the two-photon absorption properties for the multi-branched molecules with nitrogen (N) as coupling center. *Sci China Ser B Chemistry* [Internet]. 2008;51(1):92–6. Available from: <http://www.springerlink.com>
42. He H, Ma E, Cui Y, Yu J, Yang Y, Song T, et al. Polarized three-photon-pumped laser in a single MOF microcrystal. *Nat Commun* [Internet]. 2016;7(11087):1–7. Available from: <https://www.nature.com/ncomms/>
43. Thorek DLJ, Robertson R, Bacchus WA, Hahn J, Rothberg J, Bradley J. Cerenkov imaging - a new modality for molecular imaging. 2012;2(2):163–73.
44. Thorek DLJ, Riedl CC, Grimm J. Clinical Cerenkov Luminescence Imaging of. 2014;95–8.
45. Desvaux E, Courteau A, Bellaye P, Guillemain M, Drouet C, Walker P, et al. Cerenkov luminescence imaging is a fast and relevant preclinical tool to assess tumour hypoxia in vivo. 2018;4–9.
46. Lohrmann C, Zhang H, Thorek DLJ, Desai P, Zanzonico PB, Donoghue JO, et al. Cerenkov Luminescence Imaging for Radiation Dose Calculation of a 90 Y-Labeled Gastrin-Releasing Peptide Receptor Antagonist. :805–12.
47. Madru R, Tran TA, Axelsson J, Ingvar C, Bibic A, Ståhlberg F. Ga-labeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) for multi-modality PET / MR / Cerenkov luminescence imaging of sentinel lymph nodes. 2014;4(1):60–9.
48. Valdivia AO, López JL, Vargas-rodríguez YM. ARTICLE IN PRESS Q uímica educación. *Educ Química* [Internet]. 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eq.2016.04.005>
49. Schomburg A, Bended H, Reichel C, Sommer T, Ruhlmann J, Kozak B, et al. Short communication Standardized uptake values of fluorine-18 fluorodeoxyglucose: the value of different normalization procedures. 1996;571–4.

50. Roldán-valadez E, Vega-gonzález I, Valdivieso-cárdenas G, Rumoroso-garcía A, Osorio-cardiel OML, Ct UPET, et al. Conceptos básicos del 18 F-FDG PET/CT. Definición y variantes normales. 2008;144(2):137–46.
51. Xu Y, Liu H, Cheng Z. Harnessing the Power of Radionuclides for Optical Imaging : Cerenkov Luminescence Imaging. 2015;2009–19.
52. D-galactose LD, Bustamante E, Pedersen PL. High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: Role of mitochondrial hexokinase. 1977;74(9):3735–9.
53. Fowler JS, Ido T. Initial and Subsequent Approach for the Synthesis of 18FDG. 2002;XXXII(1):6–12.
54. Shaffer TM, Pratt EC, Grimm J. nanotechnology. 2017;(February).
55. Ran C, Zhang Z, Hooker J, Moore A. In Vivo Photoactivation Without “ Light ”: Use of Cherenkov Radiation to Overcome the Penetration Limit of Light. 2012;(May 2011):156–62.
56. Axelsson J, Davis SC, Gladstone DJ, Pogue BW, Axelsson J, Davis SC, et al. fluorescence Cerenkov emission induced by external beam radiation stimulates molecular fluorescence. 2013;4127(2011).
57. Kamkaew A, Cheng L, Goel S, Hector F. Cerenkov Radiation Induced Photodynamic Therapy Using Chlorin e6-Loaded Hollow Mesoporous Silica Nanoparticles. 2016;
58. Kavadiya S, Biswas P. TiO 2 Nanoparticles and Reactive Oxygen Species Generation. 2019;60(5):702–10.
59. Wang C, Cheng L, Liu Y, Wang X, Ma X, Deng Z. Imaging-Guided pH-Sensitive Photodynamic Therapy Using Charge Reversible Upconversion Nanoparticles under Near-Infrared Light. 2013;1–10.
60. Li Z, Wang C, Cheng L, Gong H, Yin S, Gong Q, et al. Biomaterials PEG-functionalized iron oxide nanoclusters loaded with chlorin e6 for targeted , NIR light induced , photodynamic therapy. Biomaterials [Internet]. 2013; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.08.041>
61. Magalh CM, Esteves CG, Pinto L. Chemiluminescence and Bioluminescence as an Excitation Source in the Photodynamic Therapy of Cancer : A Critical Review. 2016;2286–94.
62. Zehentbauer FM, Moretto C, Stephen R, Thevar T, Gilchrist JR, Pokrajac D, et al. Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy Fluorescence spectroscopy of Rhodamine 6G : Concentration and solvent effects. Spectrochim ACTA PART A Mol Biomol Spectrosc [Internet]. 2014;121:147–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2013.10.062>
63. Diaspro A, Chirico G, Collini M. Two-photon fluorescence excitation and related techniques in biological microscopy. Q Rev Biophys [Internet].

- 2006;2(32):97–166. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16478566/>
64. Camara AKS, Beard DA, Qi F, Huang M, Stowe DF. Mitochondrial Inner Membrane Electrophysiology Assessed by Rhodamine-123 Transport and Fluorescence. *Ann Biomed Eng.* 2007;35(7):1276–85.
 65. Ivanova; NNKOVBMZTY. An R-matrix calculation of the electron impact excitation of the fine-structure levels in neon-like selenium (Se xxv). *Sov J Quantum Electron* [Internet]. 1986;10(16):133. Available from: https://www.researchgate.net/publication/231126649_Electron-beam_and_optical_strength_of_semiconductors_subjected_to_pulsed_excitation_by_a_high-intensity_electron_beam
 66. C.R. S, N. C, J. W, T. H. Rhodamine dyes as potential agents for photochemotherapy of cancer in human bladder carcinoma cells. *Cancer Res* [Internet]. 1989;49(14):3961–5. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L19197428>
 67. Snare MJ, Ghiggino KP, Thistlethwaite PJ. The Photophysics of Rhodamine B. *J Photochem* [Internet]. 1982;18:335–46. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0047267082870238>
 68. Yu W-D, Sun G, Li J, Xu J, Wang X. Mechanisms and therapeutic potentials of cancer immunotherapy in combination with radiotherapy and/or chemotherapy. *Cancer Lett* [Internet]. 2019; Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030438351930134X?dgcid=rss_sd_all
 69. Bracci L, Schiavoni G, Sistigu A, Belardelli F. Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: Implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer. *Cell Death Differ* [Internet]. 2014;21(1):15–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2013.67>
 70. Obeid M, Tufi R, Endert P Van, Apetoh L, Zitvogel L, Kroemer G. Ectocalreticulin in immunogenic chemotherapy. *Immunol Rev* [Internet]. 2007;22–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/pubmed>
 71. Garg M. Chemotherapeutic Agents: Meaning, Characteristics and Factors [Internet]. *Biology Discussion.* 2013 [cited 2019 Oct 10]. p. 1. Available from: <http://www.biologydiscussion.com/medical-microbiology/chemotherapeutic-agents-meaning-characteristics-and-factors/55882>
 72. Radiobiological C, Energy A. Whole body irradiation — radio biology or medicine? *. 1948;XXVI(305):234–41. Available from: <https://www.birpublications.org/doi/10.1259/0007-1285-26-305-234>
 73. Demaria S, Kawashima N, Yang AM, Devitt ML, Babb JS, Allison JP, et al. Immune-mediated inhibition of metastases after treatment with local radiation and CTLA-4 blockade in a mouse model of breast cancer. *Clin Cancer Res*

- [Internet]. 2005;11(2):728–34. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/11/2/728>
74. Sadat N, Motlagh H, Parvin P, Ghasemi F, Atyabi F. Fluorescence properties of several chemotherapy drugs: doxorubicin, paclitaxel and bleomycin. *Biomed Opt Express* [Internet]. 2016;7(6):2400–6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4918592/>
 75. Salazar N, Mascaraque M. Resistencias al tratamiento no quirúrgico en cáncer cutáneo no melanoma. Parte II: terapia fotodinámica, vismodegib, cetuximab, metotrexato intralesional. 2016;(xx):1–11.
 76. Pascu ML, Staicu A, Voicu L, Brezeanu M. Methotrexate as a Photosensitizer. *Anticancer Res* [Internet]. 2004;24(5A):2925–30. Available from: <http://ar.iijournals.org/content/24/5A/2925.long>
 77. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action. 2013;157–70.
 78. Hilmer SN, Cogger VC, Muller M, Couteur DG Le. The hepatic pharmacokinetics of doxorubicin and liposomal Doxorubicin. 2004;32(8):794–9.
 79. Quintos-meneses HA, Aranda-lara L, Torres-garcía E, Camacho- MÁ, Sánchez-holguín M, Luna-gutiérrez MA. In vitro irradiation of doxorubicin with 18F-FDG Cerenkov radiation and its potential application as a theragnostic system. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2020;210:1–39. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111961>
 80. Bolzán AD, Bianchi MS. Mutation Research-Reviews in Mutation Research DNA and chromosome damage induced by bleomycin in mammalian cells: An update. *Mutat Res Mutat Res* [Internet]. 2018;775(February):51–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2018.02.003>
 81. Cooper I, Atrakchi D, Walker MD, Horovitz A, Fridkin M, Joseph T, et al. Converting bleomycin into a prodrug that undergoes spontaneous reactivation under physiological conditions. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2019;384(July):114782. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114782>
 82. Chen J, Stubbe J. BLEOMYCINS: TOWARDS BETTER THERAPEUTICS. 2005;5(February):102–12.
 83. Heldman AW, Cheng L, Jenkins GM, Heller PF, Kim D, Ware M, et al. Paclitaxel Stent Coating Inhibits Neointimal Hyperplasia at 4 Weeks in a Porcine Model of Coronary Restenosis. 2001;
 84. Cai JIE, Zheng T, Masood R, Smith DL, Hinton DR, Kim CNAE, et al. Paclitaxel induces apoptosis in AIDS-related Kaposi's sarcoma cells. 2000;
 85. Jimenez-Mancilla NP, Aranda-Lara L, Morales-Avila E, Camacho-López MA, Ocampo-García BE, Torres-García E, Estrada-Guadarrama A, Santos-cuevas

CL, Isaac-Olivé K. *Journal of Photochemistry & Photobiology , A : Chemistry* Electron transfer reactions in rhodamine : Potential use in photodynamic therapy. 2021;409(January).

86. Hirakawa K. *Fluorometry of hydrogen peroxide using oxidative decomposition of folic acid.* 2006;244–8.
87. Hirakawa K. *Fluorometry of singlet oxygen generated via a photosensitized reaction using folic acid and methotrexate.* 2009;2:999–1005.
88. Hirakawa K, Morimoto S. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry* Electron transfer mediated decomposition of folic acid by photoexcited dimethoxophosphorus (V) porphyrin. "Journal Photochem Photobiol A Chem [Internet]. 2016;318:1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotochem.2015.11.028>
89. Off MK, Steindal AE, Porojnicu AC, Juzeniene A, Vorobey A, Johnsson A, Moan J. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Ultraviolet photodegradation of folic acid,* 2005; 80: 47–55. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2005.03.001>.
89. Silva E, Helena A, Oliveira S, Agnez-lima LF, Melo JTA, Rafaela A, et al. *Mutation Research / Reviews in Mutation Research* DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. 2012;751:15–28.