

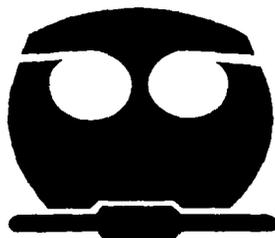


Universidad Nacional Autónoma de
México

Facultad de Química

Estudio de Fluorescencia inducida por
láser en líneas celulares humanas de
cáncer cérvico-uterino para posibles
aplicaciones en Terapia Fotodinámica

TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
PRESENTA
RODRIGO GALINDO MURILLO



MÉXICO, D. F.



2002

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE:

RODRIGO GALINDO MURILLO

FECHA:

02 DE 2002

FIRMA:

[Firma]

Jurado asignado:

Presidente: Francisco Rojo Callejas

Vocal: José Sulivan López González

Secretario: Roberto Ortega Martínez

1er. Suplente: Patricia Elvira Berrón Ruiz

2do. Suplente: Ma. Guadalupe Reyes García

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Óptica Aplicada

Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico

Bioterio

Facultad de Química, Edificio E

Ciudad Universitaria, UNAM

Asesor del tema.

[Firma]

Dr. Roberto Ortega Martínez

Supervisor técnico.

ISABEL GRACIA MORA

Dra. Isabel Gracia Mora

Sustentante.

[Firma]

Rodrigo Galindo Murillo

```
<? php
```

```
$quote = "And in the end, on dreams we  
will depend, because that's what love is  
made of...";
```

```
$agradecimiento = "Thank you, world";
```

```
$motivo = $quote . $agradecimiento;
```

```
echo $motivo;
```

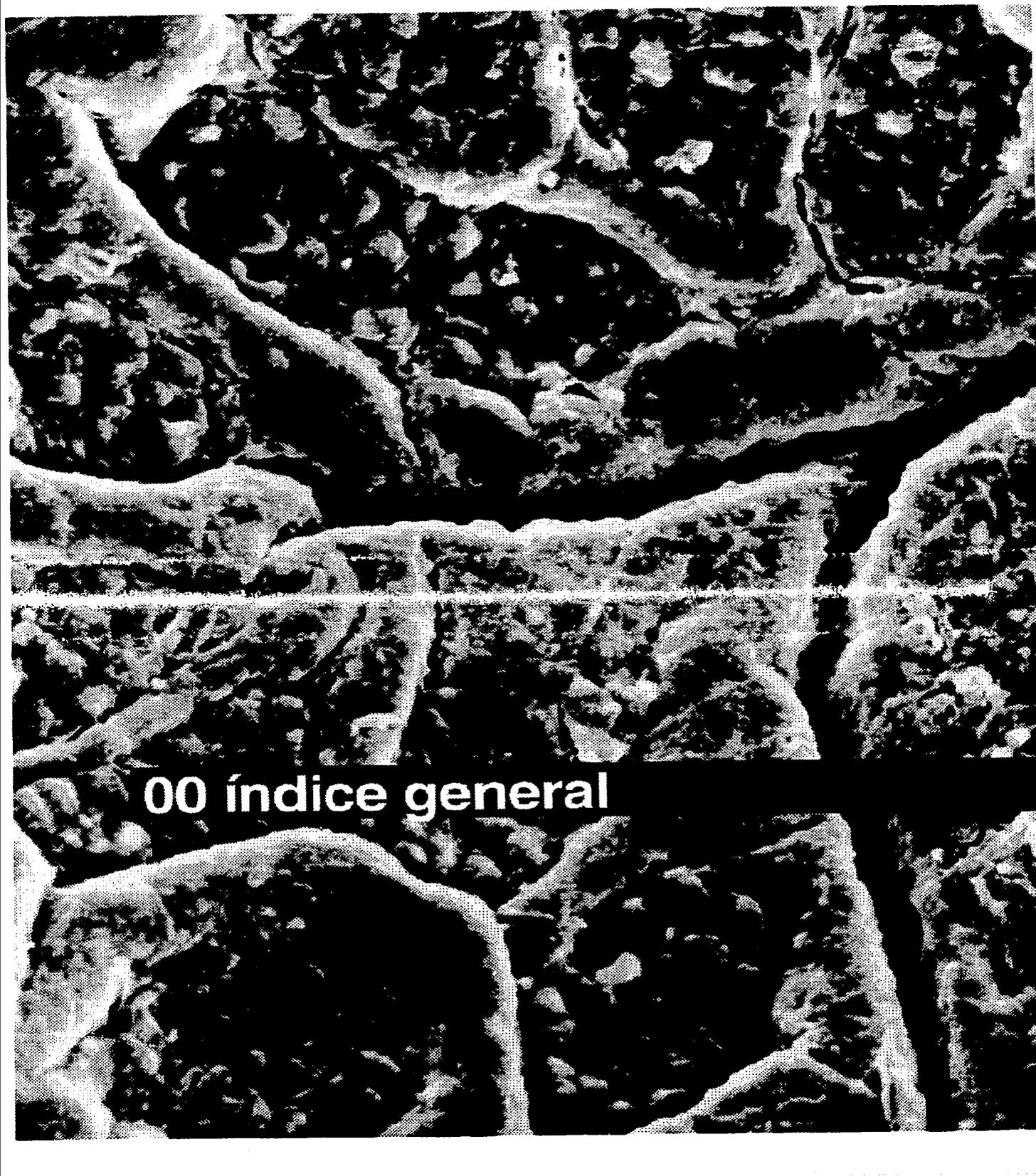
```
?>
```

Agradecimientos y dedicatorias:

Agradezco al **Dr. Roberto Ortega** y al grupo de trabajo del laboratorio de Espectroscopia Óptica del Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico (Centro de Instrumentos). Un gran asesor y maestro convencido de la belleza de la óptica, la física y las ciencias. **Dr. Jesús Gracia** y **Dra. Josefa Bernad**, por sus continuos cuestionamientos acerca de mi interés por la Química, su amistad, consejos y sus enseñanzas. **Dra. Isabel Gracia** (sí, doctora) por brindarme las facilidades para realizar éste trabajo así como compartirme sus conocimientos. Todo el personal del **Bioterio** de la Facultad de Química, Edificio E, **Lucía** y **Celedonio** por enseñarme el arte que es el cultivo celular. A cada uno de mis **profesores** de la carrera de QFB y la **Generación 96**, a mi segundo hogar por 5 años, la **Faculta de Química** de Ciudad Universitaria y al **Departamento de Programas Audiovisuales** (DePA). Agradezco la amistad y apoyo de mis amigos qfos de la generación 96: **Erika Guajardo, Mony y Puca, Begoña, David, Fernando Calderón, Christian Miguez, Edith, Gerardo, Sandra, Carol, Natalia, Pamela, Aleph, Mirén, Andrea, Mary, Alejandro Ortiz** y el laboratorio de **Farmacología Experimental, Miriam Ruiz**, todos ellos, y todos los que me faltaron. **Cristina Cortés** por su amistad y cariño. Amigos de DePA que me enseñaron lo útil y fascinante que es la multimedia: **Chucho, Bote, Iván, Toño Morales, Fabian, Mauro, Jesús (tocayo), Luisa, Janete, Alan, los gemelos Poncho y Mauro, Claudia (cartoon)** y los que estuvieron un día o

dos. Agradezco eternamente a **Jorge Alberto Vieyra (el_oso)** por enseñarme día a día, sin darse cuenta y sin pedir nada a cambio, por ser un gran amigo y por mostrarme como aún cuando todo esta bien, hay algo mal. Así como a **Francisco Bustamante (bit)** por inculcarme el arte de RTFM, explicarme como los procesadores tienen burbujas en el pipeline, mostrarme pacientemente el arte de la programación y por ser un excelente amigo. Amigos de **chunchenet** y a cada uno de los honorables miembros del **octagono: Atan-dûr, Simbiom, Thaldric, Inomoloss, Arklon, Bolek, Kep y Gomur** (los enanos al final). A Blizzard Entertainment por crear Starcraft. A los **"Tiny Toons"** del **Cedros**, en especial a **Gonzalo Benítez (Benito, Hortalano, Mastropiero y Rojo)** por ser el mejor amigo que todos esperan encontrar. Siempre has estado ahí, Hort. **Beto Humke, Luis Alfredo Pérez y Ricardo de la Cruz**, personas y amigos especiales. Agradezco a los que laboramos en **ciacomm servicios creativos**, y a **Jorge Flores** por inculcarme la sed de conocimiento. Agradezco a **Carlos Alba**, por ser también un hermano. A mis hermanas **Ana Laura y Alejandra** por todos los momentos de alegría vividos y su interés por ayudarme y enseñarme. A mi hermano **Enrique**, por mostrarme que al mundo venimos solo a una cosa... A mis **padres**, por el apoyo, los consejos y el cariño que siempre me han dado. A **Sandra Ramírez**, con todo mi amor; agradecido de poder soñar día a día junto a ti.

A **Dios**.



00 índice general

Índice General

Resumen.

Hipótesis y Objetivos. _____ 6

1. Capítulo I. Cáncer. _____ 8

- 1.1. Introducción
- 1.2. Generalidades del Cáncer
 - 1.2.1. Clasificación del cáncer
 - 1.2.2. Metástasis
 - 1.2.3. Factores que originan el cáncer
- 1.3. Epidemiología del cáncer Cérvico-Uterino en México
- 1.4. Carcinoma Cérvico-Uterino (CaCU)
 - 1.4.1. Generalidades
 - 1.4.2. Historia natural y rutas de esparcimiento
 - 1.4.3. Características patológicas
 - 1.4.4. Estadios Clínicos
- 1.5. Tratamiento del cáncer

2. Capítulo II. Terapia Fotodinámica. _____ 23

- 2.1. Historia y antecedentes
- 2.2. Terapia Fotodinámica del Cáncer
 - 2.2.1. El Láser y su importancia en la medicina
 - 2.2.2. Interacción Luz-tejido
- 2.3. Mecanismos de acción
 - 2.3.1. Tipo I
 - 2.3.2. Tipo II
- 2.4. Usos actuales de la Terapia Fotodinámica

3. Capítulo III. Metodología Experimental. _____ 45

- 3.1. Cultivo de líneas celulares tumorales in vitro
 - 3.1.1. Generalidades de cada línea celular utilizada
- 3.2. Reactivos y materiales
 - 3.2.1. Materiales
 - 3.2.2. Equipo
 - 3.2.3. Reactivos
- 3.3. Fotosensibilizadores
- 3.4. Metodología para el manejo de las líneas celulares.
 - 3.4.1. Des-congelamiento de células
 - 3.4.2. Obtención del cultivo de abastecimiento (stock) a confluencia
 - 3.4.3. Tripsinización
 - 3.4.4. Cuantificación de células
- 3.5. Arreglo óptico y preparación del láser de Argón y el láser de Colorante
- 3.6. Ensayo de inhibición e irradiación con láser
 - 3.6.1. Tinción con sulforrodamina-B y lectura
- 3.7. Determinación de la eficiencia de la Terapia Fotodinámica

4. Capítulo IV. Resultados Experimentales. _____ 59

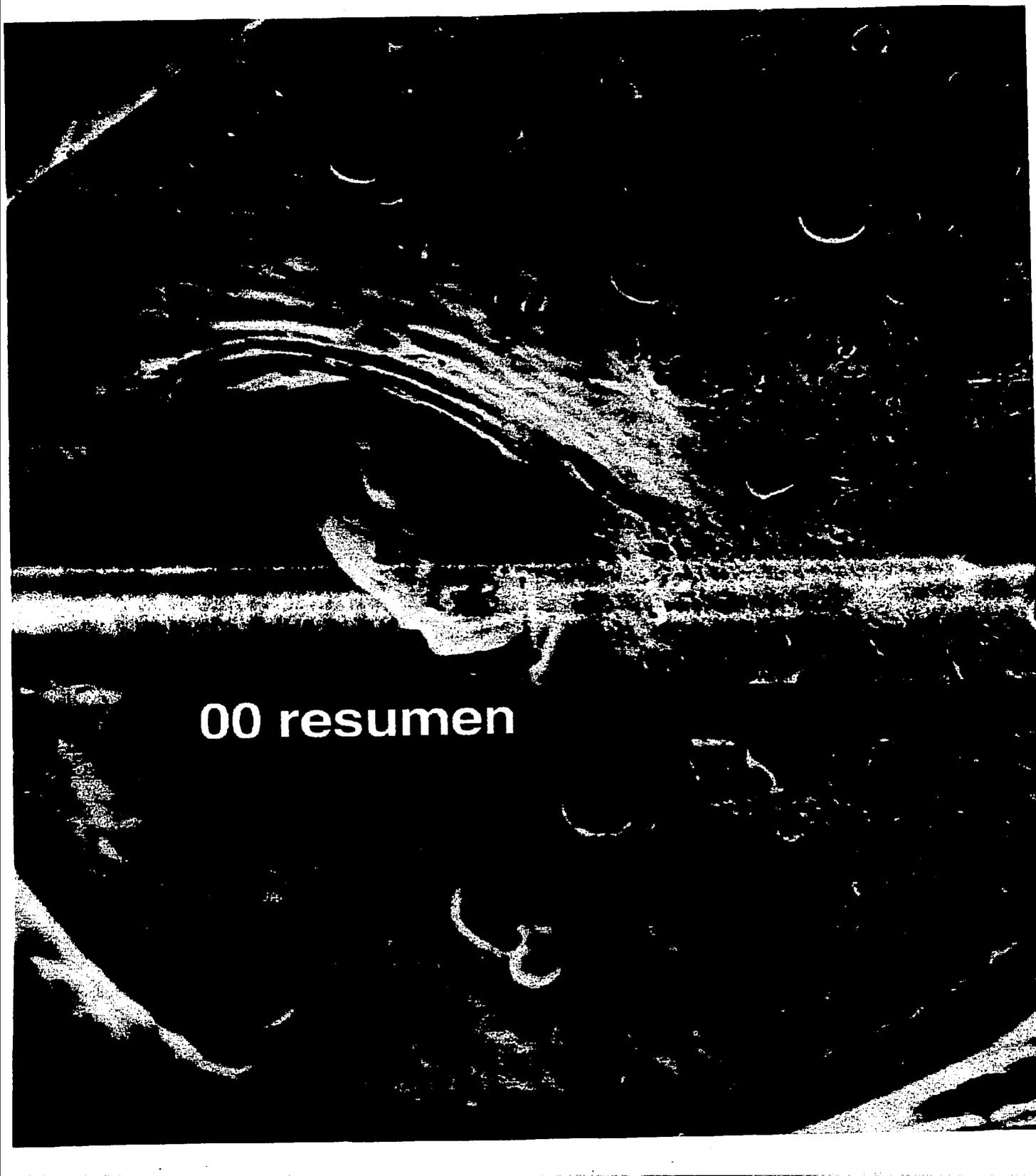
- 4.1. Fluorescencia del fotosensibilizador en los cultivos in-vitro del carcinoma cérvico-uterino.
- 4.2. Actividad antineoplásica de la Terapia Fotodinámica
- 4.3. Discusión de resultados

5. Conclusiones. _____ 66

6. Anexos. _____ 68

- A. Preparación de soluciones
- B. Espectros

7. Bibliografía. _____ 76



00 resumen

Resumen

El cáncer es un problema grave y multifactorial que abarca al ámbito de la biología, química, medicina, física y epidemiología. Todavía no se dispone de los conocimientos suficientes sobre la biología del cáncer en la cual fundamentar una actuación médica de eficacia máxima. Por ello, el cáncer es todavía una amenaza para la humanidad y ésta debe organizar su defensa.

El cáncer o neoplasia maligna, constituye un grupo de enfermedades relacionadas que se caracterizan por una multiplicación desordenada de células anormales y poco diferenciadas que no son susceptibles a las señales de control de las demás células del organismo. Este crecimiento incontrolado sin restricciones como la diferenciación, limitación del órgano, etc., permite que las células invadan tejidos adyacentes y frecuentemente sean capaces de inducir metástasis, lo cual provoca, en la mayoría de los casos, la muerte del paciente con cáncer.

La principal causa de muerte en México son las enfermedades cerebro-vasculares y las enfermedades isquémicas del corazón. La segunda, es la muerte causada por tumores malignos, responsable del 10 por ciento de las defunciones por patologías. Entre 1985 y 1994 se registraron 405 mil 841 muertes por cáncer; un análisis de las tendencias de este mal crónico degenerativo, con frecuencia incurable, reporta que la mayor incidencia afecta a las mujeres siendo las más comunes, el cáncer cérvico-uterino y el de glándulas mamarias. [2]

Existen muchos tratamientos que se utilizan para combatir el cáncer, y generalmente estos métodos exponen al paciente a un sin número de riesgos que contradicen la lucha por la enfermedad, causando más daño. Se requieren técnicas que generen poco o nada de dolor y que además sean efectivas eliminando el cáncer del paciente. Esto obliga a recordar la principal solución a las enfermedades de neoplasia maligna: la prevención. Sin embargo, la prevención y la atención temprana no se puede dar sin diagnósticos oportunos y adecuados para detectar e impedir que los tumores se desarrollen, maduren y se compliquen durante el tiempo.

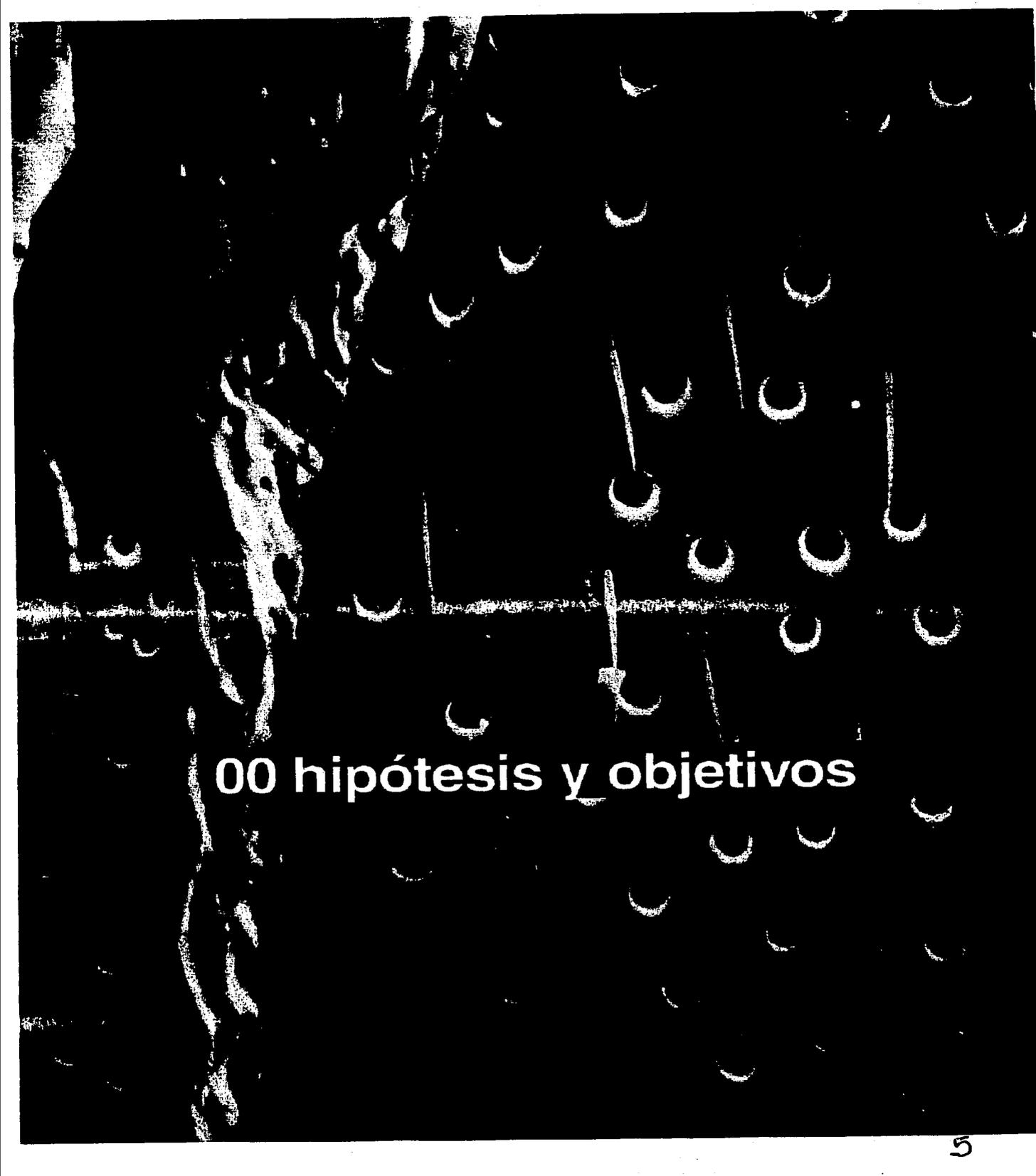
Con la Terapia Fotodinámica (PDT) se propone encontrar una solución para estos dos requerimientos que se mencionan anteriormente.

Por un lado, se probará la eficiencia de esta terapia para evitar el crecimiento *in-vitro* de diferentes líneas celulares de cáncer cérvico-uterino. Se tienen muchas referencias donde se comprueba el uso exitoso de la TFD sobre células de pulmón, piel, esófago, etc., pero no se cuenta con mucha información acerca del uso de ésta terapia cuando se utiliza en cáncer cérvico-uterino, y siendo el principal problema en la mujer en México, se considera entonces como una alternativa de diagnóstico y posible tratamiento.

Por otro lado, se elaborarán experimentos que podrían originar las bases para un sistema de detección temprana *in-situ* de éste tipo de neoplasias. En el mismo sistema elaborado para llevar a cabo la Terapia Fotodinámica, se acopló un detector de emisión de fluorescencia, donde se colecta esta información para tratar de reconocer las líneas espectrales reproducidas por las líneas celulares trabajadas. La correcta identificación de estas líneas, permite al método funcionar como un detector de neoplasias, sin tener que invadir al paciente con operaciones destinadas a extraer segmentos de tejido para su posterior análisis. Células de cáncer cérvico-uterino de la

línea HeLa y SiHa fueron puestas en contacto con un Fotosensibilizador y posteriormente irradiadas con un láser de Argón y un láser de colorante.

Del haz de luz del láser de Argón se escoge la longitud de onda adecuada por medio de la dispersión de un prisma y el haz de colorante se escoge por medio de su filtro birrefringente. Ambos láseres se modulan mecánicamente con la ayuda de un "chopper" y son dirigidos a uno de los pozos, para irradiar alternativamente, con el cultivo celular. La fluorescencia producida por el Fotosensibilizador es guiada por una fibra óptica a un monocromador para su análisis.

A high-contrast, black and white image of a tree trunk on the left side, with a grid of white crescent shapes overlaid on the right side. The crescent shapes are arranged in a regular pattern, resembling a grid. The text "00 hipótesis y objetivos" is centered in the lower half of the image.

00 hipótesis y objetivos

Hipótesis y Objetivos.

Hipótesis

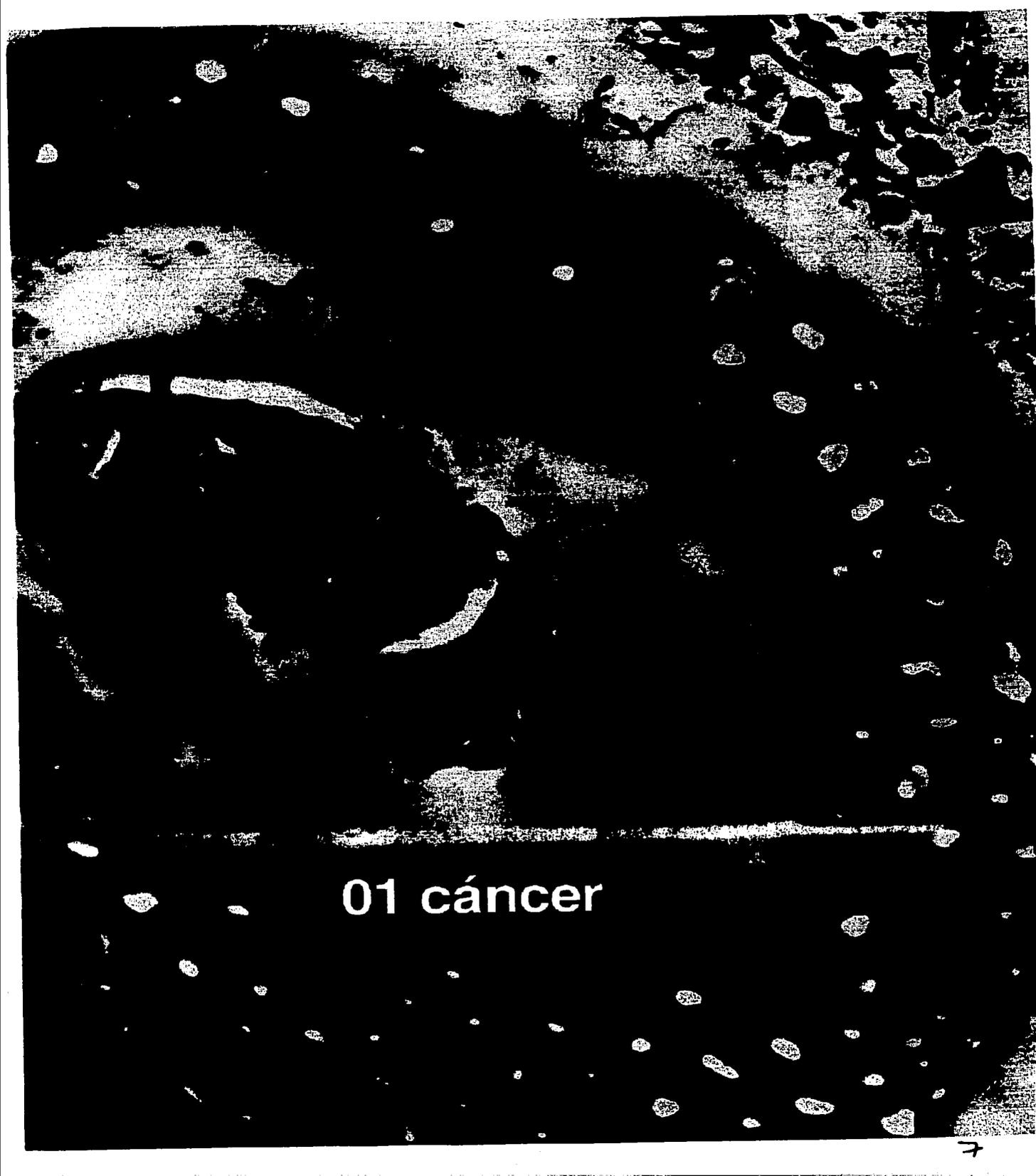
La combinación del fotosensibilizador y la luz, serán capaces de inhibir la proliferación celular en al menos una de las líneas celulares de carcinoma cérvico-uterino y la radiación fluorescente emitida por el fotosensibilizador en los cultivos de células de carcinoma cérvico-uterino podrá ser detectada como posible método de diagnóstico temprano.

Objetivos Generales

Determinar la actividad antineoplásica de la Terapia Fotodinámica sobre líneas tumorales humanas de carcinoma cérvico-uterino, obteniendo así datos útiles para establecer una efectividad de la combinación del fotosensibilizador empleado.
Determinar la fluorescencia del fotosensibilizador en líneas tumorales humanas de carcinoma cérvico-uterino, como método de diagnóstico temprano.

Objetivos Particulares

- Establecer un método sencillo y confiable para la determinación *in vitro* de la fotocitotoxicidad inducida por la Terapia fotodinámica.
- Determinar la actividad de la Terapia fotodinámica en las líneas celulares empleadas.
- Elaborar un sistema óptico de experimentación adecuado para la ejecución de la Terapia fotodinámica.
- De acuerdo a las bandas de absorción detectadas en los espectros de fluorescencia del Fotosensibilizador, elaborar el sistema óptico adecuado para irradiar en aquellas longitudes de onda, donde el Fotosensibilizador presente una mayor actividad.
- Elaborar y acoplar un sistema de detección de fluorescencia para la medición de ésta, producida por el fotosensibilizador en las líneas celulares empleadas.
- Análisis de los espectros de fluorescencia obtenidos.
- Redacta el estudio realizado como parte de la tesis de licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo.
- Hacer la defensa del presente trabajo como parte del trámite del examen profesional.



01 cáncer

1. Capítulo I Cáncer

1.1. Introducción

No existe todavía una sola cura completamente efectiva para el cáncer, pero para las personas tocadas por esta enfermedad, el conocimiento moderno está pagando con mejores tratamientos, mejores formas de prevención y la esperanza de llevar una vida normal.

1.2. Generalidades del Cáncer

El cáncer o neoplasia maligna no es una sola enfermedad sino un grupo de más de 200 enfermedades distintas en las que se produce una multiplicación desordenada de células anormales y poco diferenciadas que no son susceptibles a las señales de control de las demás células del organismo. Estas células crecen sin control hasta convertirse en masas de tejidos llamados tumores. (Fig. 1)

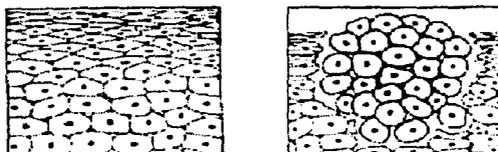


Fig. No. 1 Células normales y células formando un tumor.

Hay dos tipos de tumores: benignos o no cancerosos y malignos o cancerosos.

Los tumores benignos tienen seis características principales:

- Sólo crecen hasta un determinado tamaño.
- Normalmente no crecen muy rápido.
- No destruyen células normales.
- No se propagan al tejido que les rodea.
- Normalmente no producen efectos secundarios graves.
- Por lo general crecen de una manera ordenada.

Los tumores malignos se conocen por su capacidad para invadir y destruir tejidos y órganos, tanto los que están cerca como los que están lejos del tumor original. La muerte se produce cuando la propagación del cáncer daña los tejidos y los órganos vitales, de tal manera que no pueden funcionar. Las células del cáncer atacan el tejido sano y posiblemente no dejan de multiplicarse. Más diferencias de tumores benignos y malignos en la Tabla No. 1.

El cáncer tiene un comportamiento distinto en cada persona, según su tipo. Puede darse a cualquier edad, pero es más probable que afecte a personas de edad avanzada; por lo general a partir de los 55 años. El cáncer también puede presentarse en niños, y de hecho, es la segunda causa de muerte en niños de edades comprendidas entre 1 y 15 años.

Características	Tumor Benigno	Tumor Maligno
Estructura y diferenciación	Frecuentemente típica del tejido de origen	Frecuentemente atípica, es decir, poco diferenciado
Modo de Crecimiento	Expansivo, con formación de cápsula	Infiltrativo no encapsulado
Velocidad de crecimiento	Generalmente lento: pocas mitosis normales	Generalmente rápido: muchas mitosis anormales
Progresión del crecimiento	Lento y progresivo, puede detenerse o regresar	Raramente cesa, casi siempre es rápido y progresivo hasta la muerte
Metástasis	Ausentes	Generalmente presente
Recurrencia después de la extirpación	Rara	Frecuente
Cromatina nuclear	Normal	Aumentada
Invasión a vasos	No	Frecuente
Divisiones Nucleares	Pocas y la mayoría normales	Muchas divisiones
Cromosomas anormales	Pocos	Muchos

Tabla No. 1 Diferencias entre tumores benignos y malignos. [3]

El cáncer puede ser causado por causas externas al cuerpo, o por causas internas [3-5]. Los factores externos que pueden causar el cáncer incluyen el estar expuesto a determinados productos químicos como el benceno y el asbesto (amianto). Los pintores, los fabricantes de neumáticos, los destiladores y los fabricantes de zapatos, están expuestos a menudo al benceno. Los trabajadores de minas, aislamiento y astilleros están expuestos a menudo al asbesto. Otros factores ambientales que causan cáncer incluyen:

- Exposición a agentes contaminantes ambientales, como los gases del escape del automóvil.
- Exposición a las radiaciones del sol.
- Exposición a niveles altos de rayos X.
- Exposición a radiaciones electromagnéticas
- Dieta con gran cantidad de grasas y poca fibra.
- Consumo de tabaco.
- Abuso de las bebidas alcohólicas o de determinadas drogas.

Los factores internos que pueden causar cáncer incluyen la obesidad, las infecciones causadas por virus, como la hepatitis B crónica y un historial familiar en el que exista el cáncer.

Las posibilidades de supervivencia al cáncer dependen del lugar del cuerpo en que se encuentre el cáncer y de las clases de tratamiento utilizadas. Hay cinco formas principales de tratar el cáncer:

- Cirugía
- Radioterapia
- Quimioterapia
- Terapia hormonal
- Terapia biológica.

Para el tratamiento del cáncer, el médico puede utilizar un solo método o una combinación de ellos.

Todavía no se dispone de los conocimientos suficientes sobre la biología del cáncer en los cuales fundamentar una terapia médica de máxima eficiencia. Por ello, el cáncer es todavía una amenaza para la humanidad y ésta debe organizar su defensa.

El proceso de carcinogénesis es un proceso complejo que transcurre a lo largo del tiempo y a través de por lo menos tres diferentes etapas:

1. *Iniciación*: es un daño permanente y transmisible en el ADN de una célula que, si no se repara, se fija como mutación quedando la célula iniciada. Los agentes iniciadores son por definición compuestos genotóxicos, es decir, compuestos que pueden interactuar con el ADN y dañarlo.
2. *Promoción*: en esta etapa ocurre una expansión clonal, que puede ser reversible (hiperplasia) a partir de la célula que se inició. Se requiere de la presencia continua del nivel umbral del agente promotor, que es un compuesto químico, físico o biológico que es necesario para la formación de determinados tumores.
3. *Progresión*: es la adquisición por la neoplasia del carácter maligno. Hay aparición secuencial de subpoblaciones cada vez más aberradas genéticamente, lo que les confiere una des-diferenciación o una diferenciación aberrante lo que da la característica de poder escapar, invadir y colonizar o metastatizar a órganos distantes. [3, 6]

1.2.1. Clasificación del cáncer

Los diferentes tipos de cáncer se clasifican principalmente por el órgano en que se han originado y por la clase de células (Tabla No. 2). Un ejemplo serían los tumores que se originan a partir de tejido mesenquimal y son llamados sarcomas, las neoplasias originadas de músculo liso se denominan Leiomioma, tumores malignos de músculo esquelético se llaman Rbdomiosarcoma. [3, 5]

Tejidos de Origen	Benigno	Maligno
Epitelio		
De revestimiento Granular Trofoblasto	Papiloma Adenoma Mola hidatídica	Carcinoma Adenocarcinoma Coriocarcinoma
Tejido conjuntivo		
Fibroso Adiposo Muscular liso Muscular estriado Cartilaginoso Óseo Linfático Sanguíneo Linfoideo Mesotelio (peritoneo, pleura) Médula ósea Sinovial	Fibroma Lipoma Leiomioma Rabdomiona Condroma Osteoma Linfangioma Hemangioma Mesotelioma Sinoviomias	Fibrosacroma Liposarcoma Leiomiosarcoma Rabdomiosarcoma Condrosarcoma Osteosarcoma Linfangiosarcoma Hemangiosarcoma Linfoma Mesotelioma maligno Leucemias Sinovioma maligno
Tejido nervioso		
Nervios Vaina nerviosa Células simpáticas Glia	Neuroma Neurofibromas Neurilemonas Gangliioneuromas Glioma	 Schawanoma maligno Neuroblastomas glima
Otros tejidos		
Células pigmentadas Médula suprarrenal Células comafines Células APUD Embrionarios Timo	Nevo Feocromocitoma Carcinoides Apudoma Quistes dermoides Teratomas Timomas	Melanoma Feocromocitoma Carcinoides maligno Apudomas malignos Teratomas malignos Timoma maligno

Tabla No. 2 Clasificación de los tumores. [3]

Las neoplasias malignas originadas de células epiteliales y derivadas de cualquiera de las tres capas germinales, se llaman Carcinomas. Cuando tienen origen de glándulas se denominan Adenocarcinomas. A los carcinomas originados de cualquier epitelio plano estratificado se denomina Carcinoma epidermoides. [3]

De ésta forma se cuenta con una gran cantidad de variedades de la enfermedad lo que hace más difícil su control y tratamiento.

1.2.2. Metástasis

La proliferación incontrolada es un hecho importante en la cascada oncogénica, no sólo aumenta la posibilidad de un mayor grado de alteración genética, sino que también es esencial para la expansión de una sub-clona agresiva de células. Sin embargo el aumento de la proliferación no es suficiente por sí misma para dar origen a la diseminación del tumor a tejidos distantes (metástasis).

El comportamiento de las células metastásicas se puede definir como la tendencia a traspasar los límites del comportamiento tisular y a entremezclarse con diferentes tipos celulares. [7]

El proceso de metástasis implica una cascada de pasos secuenciales ligados, dentro de los cuales se llevan a cabo múltiples interacciones huésped-tumor. Una célula o grupo de células debe ser capaz de abandonar el tumor primario, invadir el tejido local del huésped, atravesar la membrana basal del tejido al cual pertenecen, entrar en circulación ya sea en los vasos sanguíneos o linfáticos y trasladarse a través de ellos a regiones distintas, atravesar nuevamente los vasos y la nueva membrana basal, extravasarse en el tejido intersticial y parenquimatoso del órgano blanco y proliferar como una clona secundaria en un nuevo órgano, reproduciéndose activamente en él y originando nuevas formaciones tumorales, con células cada vez más autónomas y agresivas.

No todos los tumores invasivos tiene rápido crecimiento; algunos tumores crecen lentamente, a pesar de que se sabe que las células malignas suelen tener considerable motilidad. Al parece, en la invasión de tejido normal por las células malignas hay una activa participación de diversas enzimas hidrolíticas u otras que destruyen el tejido y ayudan a la metástasis. [3-5]

1.2.3. Factores que originan el cáncer

Los factores que originan el cáncer se dividen en dos grandes grupos:

- Los factores *exógenos* que constituyen de un 80-90% de los casos y,
- Los factores *endógenos* que forman el 10-20% restante.

En el caso de los factores sociales se han demostrado que causan inmunodepresión lo que deriva en la falta de reconocimiento de las células malignas por el sistema inmunológico y permite su proliferación y propagación.

Los factores exógenos constituyen compuestos químicos, factores físicos como las radiaciones y las lesiones recurrentes, los factores biológicos como virus, hongos y bacterias y los factores sociales como el estrés y las depresiones profundas.

Existen una gran variedad de agentes físicos y químicos que se encuentran en los lugares comunes de trabajos que forman un importante grupo de factores exógenos carcinogénicos. (Tabla No. 3)

Agentes físicos/químicos	Tipo de cáncer	Exposición a la comunidad	Lugares de exposición
Arsénico	Pulmón, piel	Raro	Insecticidas y herbicidas Trabajadores en refinerías
Asbestos	Pulmón, Mesotelioma	Poco común	Soldadores, demolidores Fundidores y acereras
Benceno	Leucemias	Común	Pintores, destilerías y refinerías petroquímicas Solventes y barnices
Diesel	Pulmón	Común	Choferes y mecánicos, operadores de camiones y grúas
Formaldehído	Nariz, nasofaringe	Poco común	Hospitales y laboratorios clínicos y de investigación. Manufactura de productos de madera, papel, textiles y metal
Fibras minerales sintéticas	Pulmón	Poco común	Aisladores de paredes y tuberías
Tintes para el cabello	Vejiga	Poco común	Peluquerías y salones de belleza
Radiación ionizante	Médula y otros más	Común	Materiales nucleares, productos médicos y procedimientos de radioterapia
Aceites minerales	Piel	Común	Construcción de maquinaria pesada
Pesticidas sin arsénico	Pulmón	Común	Agricultores, pesticidas
Materiales de pintura	Pulmón	Poco común	Pintores profesionales
Materiales poli- clorados	Hígado, piel	Poco común	Líquidos para frenos e intercambiadores de calor, lubricantes, tintas, adhesivos e insecticidas
Radón (partículas alfa)	Pulmón	Poco común	Estructuras bajo tierra, minas

Tabla No. 3 Carcinógenos en los lugares de trabajo. [8]

Los factores endógenos constituyen un menor porcentaje de los casos de cáncer humano y estos pueden ser por mutaciones espontáneas en el ADN. Generalmente mutaciones puntuales o bien por herencia. [9, 10]

Algunas causas de mutaciones puntuales son:

- Error en las polimerasas del ADN.
- Depuración espontánea.
- Daño oxidativo causado por radicales libres generados por diferentes procesos biológicos.

- Elementos móviles (retrovirus endógenos presentes en el 5% de la población).
- Deaminación espontánea de la 5-metil citosina a timina (mutación poco reparable).

1.3. Epidemiología del cáncer Cérvico-Uterino en México

El cáncer constituye un problema de salud pública en nuestro país. Ésta enfermedad fue la segunda causa de muerte en el año de 1995 con 48, 222 decesos, el 11.2% del total de muertes. Hasta las cifras del año 2000 publicadas por la Secretaría de Salud, dentro de las Principales causas de mortalidad en mujeres, el cáncer cérvico-uterino se encuentra en 10° lugar con el 2.5% por cada 100, 000 mujeres. Dentro de las muertes causadas por cáncer en México, el cáncer cérvico-uterino está en primer lugar:

1. el cuello del útero, 2.4 %
2. glándula mamaria, 1.8 %
3. hígado, 1.2 %
4. estómago, 3.9% y
5. traquea, bronquios y pulmón, 0.9 %.

El perfil de mortalidad de los mexicanos indica los variados retos de las instituciones de salud, y en general, de las políticas públicas por disminuir y erradicar las muertes evitables, por ejemplo, las infantiles infectocontagiosas, el cáncer y las maternas. En particular, los datos de mortalidad por causas muestran tanto el carácter transaccional de la salud en el país, como las necesidades emergentes para atender las principales patologías. (Tabla No. 4).

La distribución por edad de acuerdo al sexo muestra para el masculino el primer lugar en el grupo de 75 años y más con el 20%, seguido por el de 60 a 64 con el 11.8%. En las mujeres también fue el grupo de 75 años y mayores, el más elevado con el 11.5% seguido por el grupo de 45 a 49 años con el 11.2% y después el grupo de 40 a 44 años con el 10%. [11]

En los últimos 10 años, el cáncer cérvico-uterino se ha mantenido como la segunda neoplasia en orden de frecuencia en la población derechohabiente del Instituto Mexicano del Seguro Social; sin embargo para la población femenina se ha ubicado en el primer lugar. En relación a la mortalidad general, se encuentra dentro de las 10 principales causas de defunción, y en el grupo de 30 a 44 años es la tercera causa de muerte, y una de las primeras 10 en todos los grupos de edad hasta los 64 años. Después de esta edad es desplazada del décimo sitio por otras causas competitivas de defunción. En los últimos 15 años la tendencia de la mortalidad por cáncer cérvico-uterino se ha mantenido estable, con un rango de 3.3 a 4.5 defunciones por 100 000 derechohabientes del Seguro Social.

Principales causas de mortalidad en mujeres. Nacional				
Orden	Causa	Defunciones	Tasa ¹	%
	Total	192 593	383.5	100.0
1	Diabetes mellitus	25 717	51.2	13.4
2	Enfermedades isquémicas del corazón	19 908	39.6	10.3
3	Enfermedad cerebro vascular	13 383	26.6	6.9
4	Ciertas afecciones originadas en el período perinatal	8 104	16.1	4.2
5	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	6 750	13.4	3.5
6	Infecciones respiratorias agudas bajas	6 585	13.1	3.4
7	Enfermedades hipertensivas	5 916	11.8	3.1
8	Cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado	5 819	11.6	3.0
9	Nefritis y nefrosis	4 761	9.5	2.5
10	Tumor maligno del cuello del útero	4 604	9.2	2.4
11	Desnutrición calórico protéica	4 513	9.0	2.3
12	Tumor maligno de la mama	3 432	6.8	1.8
13	Accidentes de tráfico de vehículo de motor	2 917	5.8	1.5
14	Enfermedades infecciosas intestinales	2 566	5.1	1.3
15	Tumor maligno del hígado	2 267	4.5	1.2
16	Tumor maligno del estómago	2 238	4.5	1.2
17	Tumor maligno de tráquea, bronquios y pulmón	1 994	4.0	1.0
18	Anemia	1 679	3.3	0.9
19	Malformaciones congénitas del corazón	1 641	3.3	0.9
20	Leucemia	1 559	3.1	0.8
	Causas mal definidas	4 329	8.6	2.2
	Las demás	61 911	123.3	32.1

Tabla No. 4 Principales causas de mortalidad en mujeres a nivel nacional.

- ¹ Tasa por 100 000 mujeres.
- Los totales no incluyen 660 defunciones de mexicanas que residían en el extranjero.
- Fuente: Elaborado a partir de la base de datos de defunciones INEGI/SSA. Dirección General de Información y Evaluación del Desempeño. www.ssa.gob.mx

1.4. Carcinoma Cérvico-Uterino (CaCU)

El cáncer cérvico-uterino, una clase común de cáncer en la mujer, es una enfermedad en la cual se encuentra células cancerosas (malignas) en los tejidos del cuello uterino. El cuello uterino es la abertura del útero, el órgano hueco en forma de pera donde se desarrolla el feto, y lo conecta con la vagina (canal de nacimiento).

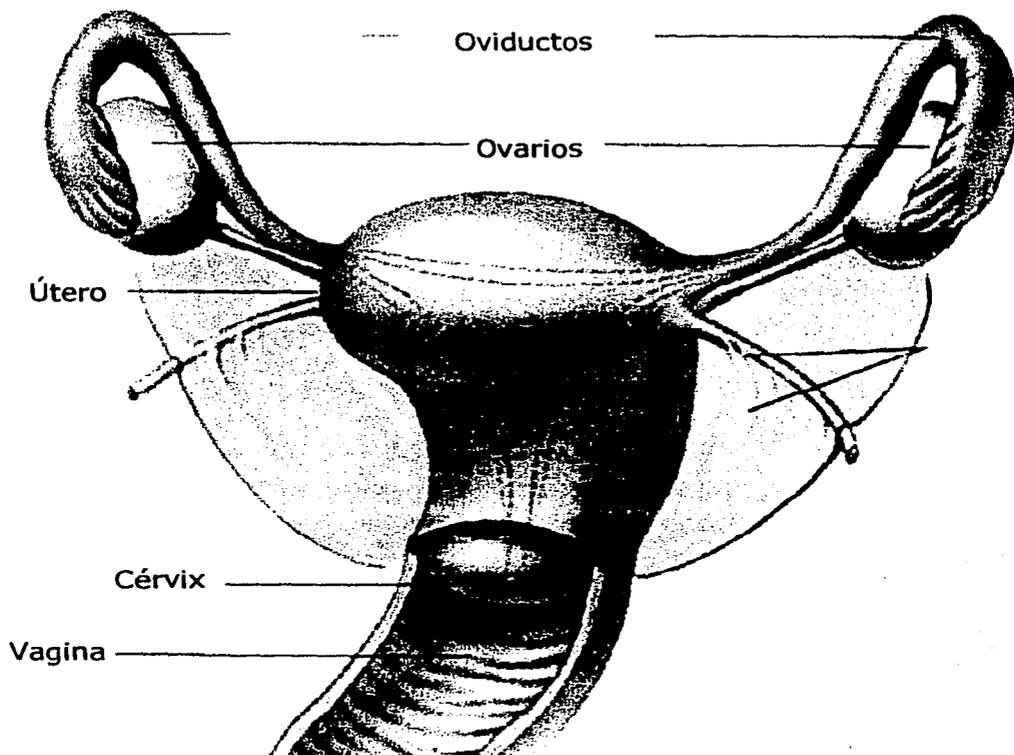


Figura No. 2 Diagrama de localización del cérvix.

El cáncer cérvico uterino es el cáncer del cuello de la matriz; constituye el tipo más frecuente de cáncer en las mujeres mexicanas y la primera causa de muerte por ésta enfermedad en el sexo femenino en nuestro país a pesar de ser totalmente prevenible si es detectado a tiempo. El cáncer cérvico-uterino suele crecer lentamente por un período de tiempo. Antes de que se encuentre células cancerosas en el cuello uterino, sus tejidos experimentan cambios y empiezan a aparecer células anormales (proceso conocido como displasia). La mayoría de los casos de cáncer cervical es producido por algunas cepas del Virus del Papilloma Humano. La prueba de Papanicolaou, la cual es el análisis de una muestra de secreción del cuello de la matriz, generalmente encuentra estas células. Posteriormente, las células cancerosas comienzan a crecer y se diseminan con mayor profundidad en el cuello uterino y en las áreas circundantes. [12]

1.4.1.Generalidades

Los tumores ginecológicos malignos son comunes, de ellos los tumores cérvico-uterinos representan el 6% [13]. El presente trabajo se enfoca en el efecto de una nueva forma de terapia antineoplásica sobre líneas tumorales de carcinoma cérvico-uterino, por lo que es necesario hacer referencia a lo que concierne a este tipo de tumores malignos y a su clasificación.

Como ya se hizo referencia anteriormente el carcinoma es un tipo de cáncer de origen epitelial, capas de células que recubren la superficie del cuerpo y tapizan las diferentes glándulas (Tabla No. 2), en el caso del cáncer cérvico-uterino, las células malignas se encuentran en el recubrimiento del cuello uterino (Figura No. 2) [14].

El cáncer cérvico-uterino es una de las principales causas de mortalidad como se ha mencionado anteriormente. La edad más frecuente de presentación de esta neoplasia es de 35 a 59 años [13].

No se conoce la causa del cáncer cérvico-uterino, pero su desarrollo parece estar relacionado a múltiples agresiones y lesiones sobre el cerviz, estudios han mostrado que esposos de mujeres con ésta neoplasia reportan más compañeras sexuales y mayor historia de varias condiciones genitales como condilomas, gonorrea y herpes genital. Además de que hay otros factores que se han relacionado a este padecimiento, como son:

- edad de inicio de actividad sexual
- multiparidad
- número de parejas sexuales
- tabaquismo,
- el virus del Herpes,
- el virus del Papiloma Humano (HPV), del cual se han asociado 20 serotipos a lesiones anogenitales, la gran mayoría de las células infectadas no desarrollan un tumor maligno, lo que indica que por sí sola la infección por éste virus no es suficiente para causar cáncer, sino que se requieren además de cofactores como los mencionados en ésta lista para que se pueda desarrollar la neoplasia. [15].
- El virus de Inmunodeficiencia Humana (HIV), donde Maiman reporta que mujeres con HIV y cáncer cérvico-uterino tienen estadíos más avanzados y grados histológicos más altos. El pronóstico es peor y las muertes se asocian más al cáncer que al SIDA [16].

El origen histológico del cáncer cérvico-uterino es de tipo epidermoide en el 85 a 90 por ciento de los casos y usualmente aparece en la unión del canal cervical y el ectocérvix (Figura No. 4). En esta área el epitelio columnar es reemplazado por el epitelio escamoso. La aparición de procesos neoplásicos localizados en el cérvix uterino presenta una evolución de displasia a cáncer *in situ*.

La mayor parte de las displasias son diagnosticadas en la mujer después de los 20 años de edad. El cáncer *in situ* se presenta de manera significativa entre los 30 a 39 años de edad y el carcinoma invasor después de los 40 años.

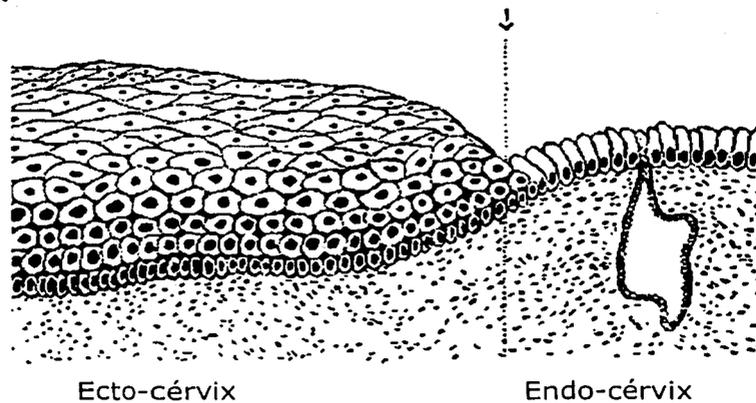


Figura No. 4 Ubicación mas frecuente del cáncer cervico-uterino.

1.4.2. Historia natural y rutas de esparcimiento

En general, el Cáncer cervico-uterino tiene su origen en la unión escamoso-columnar del canal endocervico o el portio del cérvix. La lesión está frecuentemente asociada con una historia crónica de cervicitis, displasia severa y carcinoma *in situ*. Esta progresión a invasión toma de 10 a 20 años. [14]

El proceso maligno traspasa la membrana basal del epitelio e invade el estroma cervical. Si la lesión es menor a 3 mm sin invasión vascular o proyecciones confluentes, la lesión es clasificada como microinvasiva o superficialmente invasiva, y la probabilidad de metástasis al nodo linfático es aproximadamente del 1%. La invasión puede progresar, pero si el tumor no es gruesamente visible y la profundidad de penetración es menor a 5 mm, el tumor es clasificado como carcinoma invasivo oculto. [3, 5, 12, 15]

1.4.3. Características patológicas

Más del 90% de los tumores invasivos son de tipo de células escamosas. Aproximadamente el 5% son clasificados como adenocarcinomas y del 1-2% son células claras, tipo mesonéfrico. Mentz y Reagan [16], han dividido al carcinoma de células escamosas en tres tipos:

1. Queratinizante.
2. No queratinizante.
3. Tipo células pequeñas.

El carcinoma epidermoide invasivo está compuesto de núcleos y nidos de células epiteliales, ordenadas al azar y formando arborescencias múltiples de diferentes tamaños y configuraciones. Las células queratinizantes muestran un foco de queratinización con perlas arrinconadas. Las células no queratinizantes tienen tumores estromales con bordes bien demarcados pero sin evidencia de queratinización o perlas

arrinconadas. Las células pequeñas tienen una apariencia redondeada y tumores con bordes poco definidos.

El adenocarcinoma proviene de la mucosa cilíndrica del endocervix o de la secreción mucosa de las glándulas endocervicales [16].

1.4.4. Estadio Clínico

El carcinoma cérvico-uterino tiene sus orígenes en la unión escamoso-columnar ya sea en el canal endocérvico o en el portio del cérvix. La lesión precursora es *displasia* o *carcinoma in situ* la cual subsecuentemente puede convertirse en cáncer invasivo. Este proceso puede ser lento. Al irse haciendo invasivo, el tumor traspasa de la membrana basal e invade el estroma cervical. La extensión de tumor en el cérvix puede manifestarse como ulceración, tumor o infiltración extensiva del tejido interior del recto o del ano.

El estadio inicial fue propuesto en 1929 por un subcomité de las Naciones Unidas, la cual fue subsecuentemente revisada en 1937 y en 1950. Estas funciones fueron tomadas por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO), en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Unión Internacional Contra el Cáncer. Los estadios propuestos por esta comisión fueron finalmente revisados en 1971.

Se describen los criterios utilizados por la FIGO para la clasificación del carcinoma cérvico-uterino. Dicha clasificación debe estar basada en la evaluación clínica (inspección, palpación, colposcopia), examinación del seno, riñones y esqueleto, y biopsias endocervicales. Cuando haya un desacuerdo en el estadio, se debe seleccionar el estadio más cercano para fines estadísticos. Todos los tipos histológicos deben ser incluidos. [12, 15]

- Estadio 0 o carcinoma *in situ*: El carcinoma *in situ* es un cáncer muy temprano. Las células anormales se encuentran sólo en la primera capa de células que recubren el cuello uterino, y no invaden los tejidos más profundos del cuello uterino.
- Estadio I. El cáncer afecta el cuello uterino, pero no se ha diseminado a los alrededores.
 - Estadio I-a: una cantidad muy pequeña de cáncer, sólo visible por microscopio, se encuentra ya en el tejido más profundo del cuello uterino.
 - Estadio I-b: una cantidad mayor de cáncer se encuentra en dicho tejido.
- Estadio II. El cáncer se ha diseminado a áreas cercanas, pero aún se encuentra en el área pélvica.
 - Estadio II-a: el cáncer se ha diseminado fuera del cuello uterino a los dos tercios superiores de la vagina.
 - Estadio II-b: el cáncer se ha diseminado al tejido alrededor del cuello uterino.
- Estadio III. El cáncer se ha diseminado a toda el área pélvica. Puede haberse diseminado a la parte inferior de la vagina, o infiltrar los uréteres (los tubos que conectan los riñones a la vejiga).
- Estadio IV. El cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo.
 - Estadio IV-a: Diseminación a la vejiga o al recto (órganos cerca del cuello uterino)

- Estadio IV-b: Diseminación a órganos distales como los pulmones (metástasis). [17, 18]

1.5. Tratamiento del cáncer

Ya que en general no hay síntomas asociados con cáncer cérvico-uterino, suelen ser necesarias una serie de pruebas para diagnosticarlo:

- **Citología** con tinción de Papanicolaou: Se lleva a cabo usando un pedazo de algodón, un cepillo o una espátula de madera pequeña para raspar suavemente el exterior del cuello uterino con el fin de recoger células. La paciente puede sentir algo de presión, que se acompañará en algunos casos de dolor.
- **Biopsia**. Si se encuentran células anormales, el médico tendrá que extraer una muestra de tejido del cuello uterino y lo observará a través del microscopio para determinar la presencia de células cancerosas. Para efectuar una biopsia sólo se necesita una pequeña cantidad de tejido y puede hacerse en la consulta del médico. A veces se necesita extraer una muestra de biopsia en forma de cono, más grande (**conización**), para lo cual quizás sea necesario ir al hospital.[19]

El pronóstico (posibilidades de recuperación) y selección de tratamiento dependen de la etapa en que se encuentra el cáncer (si está sólo en el cuello uterino o si se ha diseminado a otros lugares) y el estado de salud en general.

Dentro de los esfuerzos para poder erradicar el cáncer se tiene principalmente la cirugía, el tratamiento con fármacos (quimioterapia), la radioterapia y últimamente la inmunoterapia y la Terapia Fotodinámica. En la mayoría de los casos se utilizan terapias combinadas.

Existen tratamientos para todas las pacientes con cáncer cérvico-uterino. Se emplean tres clases de tratamiento:

- **Cirugía** (extracción del cáncer en una operación)
- **Radioterapia** (radiaciones de alta energía para eliminar las células cancerosas).
- **Quimioterapia** (medicamentos o "venenos" para eliminar las células cancerosas).

El cáncer se puede extraer empleando alguna de las siguientes operaciones:

- La **criocirugía** consiste en la eliminación del cáncer por congelamiento.
- La **cirugía con rayo láser** consiste en el uso de un haz de luz intensa para eliminar células cancerosas.
- La **conización** consiste en la extracción de un pedazo de tejido en forma de cono en el lugar donde se encuentra la anormalidad. Se emplea para biopsias, pero también para el tratamiento de cánceres tempranos del cuello uterino.
- La **escisión electro quirúrgica** (LEEP, siglas en inglés) usa una corriente eléctrica que pasa por un aro de alambre delgado, el cual sirve como cuchilla.
- Una **Histerectomía** es una operación en la cual se extraen todo el útero, incluyendo todo el cuello uterino, además del cáncer.
 - *Histerectomía vaginal*. El útero se extrae a través de la vagina.
 - *Histerectomía abdominal*. El útero se extrae mediante una incisión en el abdomen. Puede ser necesario extraer también los ovarios y los oviductos (*Salpingooforectomía bilateral*).

- o *Histerectomía radical* es una operación en la cual se extraen el cuello uterino, el útero y parte de la vagina. También se extraen los ganglios linfáticos del área.
- **Exenteración** si el cáncer se ha diseminado afuera del cuello uterino o los órganos femeninos, puede ser necesario extraer el colon inferior, recto o vejiga (dependiendo del lugar al que se haya diseminado el cáncer) junto con el cuello uterino, útero y vagina. La paciente puede necesitar cirugía plástica para formar una vagina artificial (*vaginoplastia*) después de esta operación.

Para tratamientos por estadíos dependerán de la etapa en que se encuentra la enfermedad, el tamaño del tumor, la edad y estado de salud general, y el deseo de tener hijos.[20]

En general, para todos los estadíos el tratamiento puede consistir de:

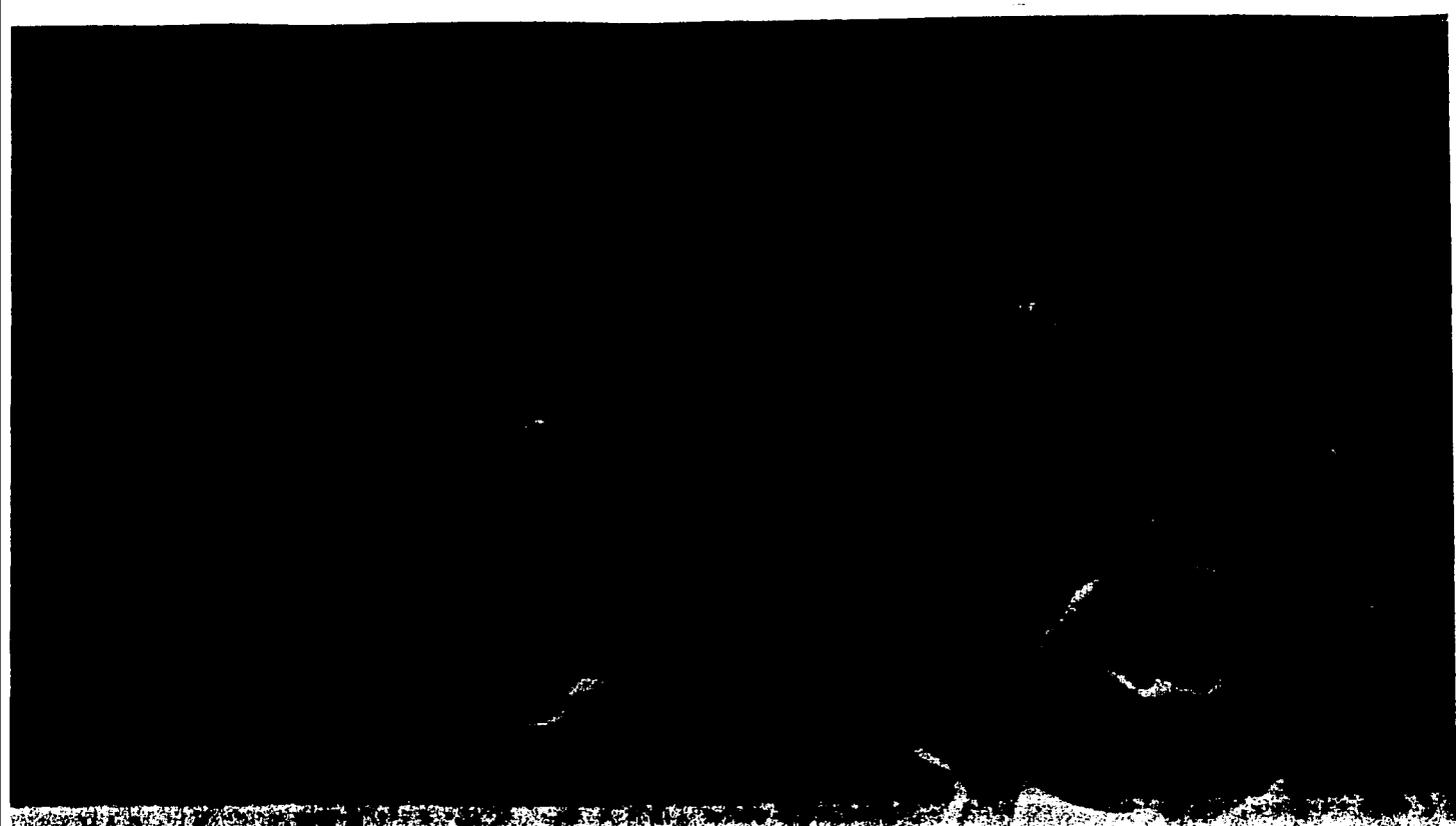
1. Conización.
2. Cirugía con rayo láser.
3. Procedimiento de escisión electro quirúrgica (LEEP).
4. Criocirugía.
5. Cirugía para eliminar el área cancerosa, cuello uterino y útero (total abdominal o histerectomía vaginal) para aquellas mujeres que no pueden o no desean tener niños.

RECIDIVAS. El tratamiento de la recidiva local podría consistir en:

1. Cirugía para extraer el colon inferior, el recto o vejiga (dependiendo del lugar al que se ha diseminado el cáncer) junto con el cuello uterino, útero y vagina (exenteración).
2. Radioterapia y quimioterapia.

Si el cáncer ha recurrido fuera de la pelvis, se puede optar a una prueba clínica con quimioterapia sistémica.[3, 12, 19]

La Terapia Fotodinámica presenta una nueva alternativa de diagnóstico y prevención para éste enfermedad.



02 terapia fotodinámica

2. Capítulo II Terapia Fotodinámica

2.1. Historia y antecedentes.

La terapia fotodinámica (también llamada Photodynamic Therapy, o PDT, radiofototerapia, fototerapia o fotoquimioterapia) es un tratamiento para algunos tipos de cánceres. Esta basada en el descubrimiento en donde ciertos químicos fotosensibles que actúan como fotosensibilizadores, pueden matar organismos unicelulares cuando son expuestos a la luz de una cierta y específica longitud de onda. PDT funciona, entonces, como una terapia en contra de células cancerígenas, cuando se combina un fotosensibilizador y un tipo de luz específico. Es la combinación de luz y sustancias químicas fotosensibles (como las porfirinas) en un medio rico en oxígeno. Las porfirinas pueden absorber energía de los fotones que les lleguen, y transferirla a las moléculas de oxígeno de su alrededor. Esto ocasiona que se formen especies reactivas de oxígeno, como singuletes y radicales libres. Estas moléculas reaccionan en una manera destructiva con proteínas, lípidos, organelos celulares y ácidos nucleicos. Así como la clorofila utiliza luz para formar azúcares, las porfirinas utilizan la luz para formar sustancias tóxicas.

El agente fotosensibilizador es inyectado o aplicado tópicamente y es absorbido por las células de todo el cuerpo. La sustancia fotosensible se acumula en mayor tiempo en las células con cáncer que en células normales. Cuando estas células son expuestas a cierto tipo de luz, el agente fotosensible absorbe la luz y produce una forma activa de oxígeno que destruye las células tratadas. El tiempo de exposición de la luz tiene que estar muy bien determinado para no dañar a las células normales, pero que sí sea efectivo en contra de las células anormales [21].

La PDT aplicada a las neoplasias o cáncer es esencialmente el uso de luz visible, un Fotosensibilizador y oxígeno. En 1903, no mucho después de la observación del efecto fotodinámico, Jesionek y von Tappeiner (Munich) reportaron experimentos en donde tumores habían sido tratados tópicamente con eosina, y expuestos a la luz visible. Dos años después reportaron una extensión de éste trabajo en donde varios sensibilizadores, y dos fuentes de luz (luz solar y un arco eléctrico) fueron empleados para el mismo fin. La aplicación del sensibilizador era cerca o sobre la superficie (untada o por inyección local) y los resultados (principalmente en pacientes con carcinoma basal) resultaban prometedores.

Después de esto no se realizó ningún otro avance al respecto aunque existen algunos trabajos indicando sustancias coloridas efectivas para añadirse únicamente al tejido canceroso, y no al tejido sano. Policard (originario de Lyons) en 1924 observa lo que se considera como una fluorescencia de una porfirina en tumores experimentales, asociando por primera vez a ésta familia de sustancias con el tejido dañado.

El descubrimiento siguiente en estos años se considera el realizado por Auler y Banzer, que escriben:

"Un pequeño número de animales con tumores fueron inyectados con Photodyn (haematoporfirina) al mismo tiempo que eran irradiados con una potente lámpara de cuarzo. Además de los síntomas de irritación previamente conocidos (edema, intranquilidad), los animales mostraron necrosis, fluorescencia y suavizado celular de los tumores. Un animal, pasando 4 irradiaciones, mostraba solo un pequeño tumor y fuerte fluorescencia. La presencia de la porfirina fue identificada

espectroscópicamente. Experimentos análogos se han iniciado con personas" (traducido de Z. Krebsforsch., 1942, 53, 65-68).

Sin embargo, esto sucedió en 1942, en Berlín; la Segunda Guerra Mundial estaba a su pico y no existen más reportes de los mencionados experimentos análogos.

El siguiente desarrollo se realizó en los Estados Unidos. En 1948 Figge, Wieland y Manganiello (Baltimore) reportan la ubicación de haematoporfirina y su complejo con zinc en tumores de ratones (así como en tejidos de embriones y tejido en proceso de regeneración) pero este reporte no produce mucho impacto. Una década después Lipson y su grupo introdujeron una preparación llamada "derivado de haematoporfirina" (HpD). Se demuestra en 1961 que esta solución se localiza con un cierto grado de selectividad en tejido canceroso, con la selectividad suficiente como para que haciendo uso de la fluorescencia roja de la porfirina, producida al ser irradiada con una luz ultravioleta (366nm), el tumor pudiera ser visualizado por ésta. Por una década, HpD fue investigada como un agente de diagnóstico para el cáncer, y ésta sigue siendo una importante aplicación. Eventualmente, los investigadores se percataron que cambiando las condiciones de la irradiación, el efecto fotodinámico podía agregarse a la receta y el tumor, identificado por su fluorescencia, se fotodegradaría. Observaciones de este tipo fueron realizadas por Diamond y sus colegas en 1972, en San Francisco, donde reportaron la fotodegradación de implantes de glioma en rata después de la administración intraperitoneal de haematoporfirina. El mismo grupo también introdujo el término Terapia Fotodinámica. En 1974, Dougherty demuestra que la fluoresceína administrada intraperitonealmente reducía el índice de crecimiento de tumores mamarios implantados en animales irradiados. En ese mismo año, Thomson, Emmett y Fox (Cincinnati) describen la foto-destrucción de tumores epiteliales de ratón después de una administración oral de naranja de acridina.

Sin embargo, ha sido el derivado de haematoporfirina (HpD) que llevó al rápido desarrollo de estos experimentos. Ensayos *in vivo* realizados por Dougherty (Buffalo, USA) y por Berenbaum (Londres, UK), y sus colegas, claramente demostraron la efectividad de la Terapia Fotodinámica del cáncer en animales y en humanos. El primer experimento realizado en un hombre es publicado por Kelly and Snell, trabajando en Londres (1976). Estos autores concluyeron que: "el derivado de haematoporfirina puede ser usado como una ayuda al diagnóstico y al tratamiento del carcinoma de vejiga." [22]

El concepto del tratamiento se muestra de forma esquemática en la Figura No. 5.

HpD y sus diferentes preparaciones comerciales derivadas (Photofrin) han sido utilizadas en experimentación clínica por algunos años ya. Varios miles de pacientes han sido tratados utilizando éste sensibilizador y la Terapia Fotodinámica. El primer medicamento aprobado para esta terapia fue el Photofrin, por las autoridades Canadienses en 1993. Esta aprobación se dio para el tratamiento superficial del cáncer de vejiga. Aprobaciones subsecuentes se dieron en diferentes países para acciones limitadas. Al mismo tiempo, ha existido un desarrollo para sensibilizadores más específicos, menos tóxicos y de mayor selectividad.

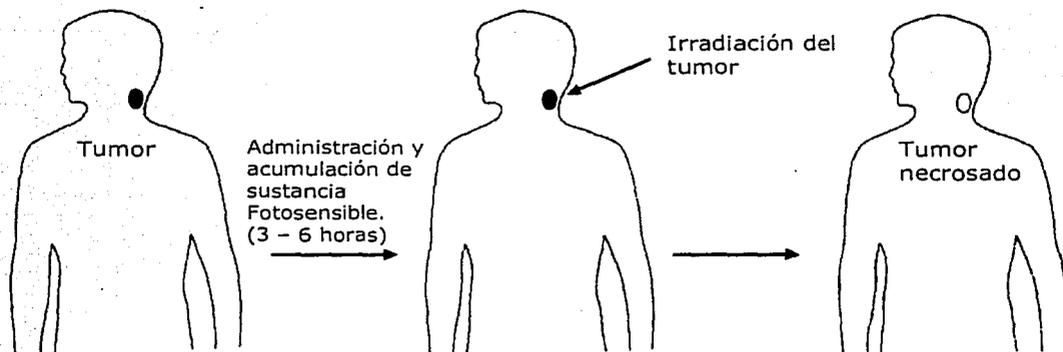


Figura No. 5. Diagrama esquemático del principio de la Terapia Fotodinámica [1].

Observaciones importantes que ayudan en el desarrollo de la terapia fotodinámica en los pacientes con cáncer.

1900	Raab reporta efectos tóxicos de un colorante de acridina en ciertos paramecios, al contacto con la luz.
1924	Una extraña fluorescencia roja se detecta en ciertos tumores malignos cuando son expuestos a luz UV, atribuido a porfirinas propias.
1942	Auler y Banzer describen la presencia de haematoporfirina en tejidos neoplásicos
1958	Se inventa y perfecciona el LASER (Descrito teóricamente por A. Einstein en 1917)
1961	Lipson reporta una fluorescencia rojiza de derivados de haematoporfirina en lesiones cancerosas, cuando son irradiados por luz azul. Se utiliza como detección.
1975	Kelly y Snell atienden un carcinoma de vejiga utilizando PDT, como una opción de terapia.
1979	Dougherty y colegas reportan los primeros pacientes tratados con derivados de haematoporfirina.

Tabla No. 5. Avances importantes en el desarrollo de la Terapia Fotodinámica. [23]

2.2. Terapia Fotodinámica del Cáncer.

Esta terapia se inició en Alemania a principios del siglo XIX, cuando científicos experimentaban auto-inyectándose derivados de porfirinas y notaban cierto tipo de quemaduras en su piel, producidas por reacciones de PDT.

Derivada de porfirina animal, existen dos tipos muy conocidos de fotosensibilizadores: derivado de Hematoporfirina (HPD) y porfimer sodium (Photophrin®). Photophrin® está actualmente en Fase Clínica III y ha sido aprobada ya en Canadá para el tratamiento de carcinoma de vejiga, donde el tratamiento por métodos convencionales ha fallado. Esta sustancia también ha sido ya aprobada en otros países para el tratamiento del cáncer en esófago y de pulmón. Estos fotosensibilizadores de primera generación, como se les conoce, producen una prolongada fotosensibilización de la piel como principal efecto secundario.

Los fotosensibilizadores de segunda generación producen una menor fotosensibilización y están actualmente en fases clínicas I / II para melanoma (cáncer de la piel), lesiones cutáneas producidas por cáncer metastático y psoriasis crónica. Un ejemplo de éste es el derivado de benzoporfirina (Benzoporphyrin derivative - Monoacid ring A (BPD verteporfin)).

FASES CLÍNICAS

- FASE I.- Estudios de laboratorio y experimentos in-vitro así como in-vivo y determinar la seguridad del fármaco. Farmacodinamia y farmacocinética del medicamento.
- FASE II.- Determinación de la eficiencia del fármaco, dosis efectivas, dosis tóxicas y dosis letales.
- FASE III.- Comparaciones con terapias pre-establecidas.
- FASE IV.- Combinación con terapias pre-establecidas, determinar si un resultado mejor se puede obtener.

Las principales fuentes de luz que se emplean para éste tipo de terapia es la luz ordenada, coherente, intensa y monocromática de los láseres. Las ventajas que presenta esto son muchas;

- son monocromáticos, se puede seleccionar con precisión la longitud de onda a la cual se va a irradiar el tumor o las células,
- intensa ya que se puede utilizar de manera continua o utilizando pequeños pulsos de luz sin perder la intensidad del rayo,
- coherente, ya que los rayos viajan en forma paralela, permitiendo enfocar el rayo exactamente en donde se requiere.

Láseres de semiconductores (Light Emitting Diodes, o LED's) se están utilizando también para la PDT, así como lámparas fluorescentes ya que son mucho más fáciles de manipular, son equipos que requieren menos mantenimiento y son más pequeños, pero se requiere un tiempo de terapia mayor, por lo tanto, más sesiones de exposición para el paciente. La utilización de la fibra óptica también se ha empleado en las sesiones de aplicación de la Terapia Fotodinámica para hacer llegar la luz a lugares de difícil acceso. Ésta también ha permitido que la aplicación de la luz sea localizada y el paciente no tenga que sufrir lesiones dérmicas o de otro tipo por su exposición a radiaciones luminosas.

Una sesión de Terapia fotodinámica (PDT) típica consta de varias etapas:

1. Dependiendo el tipo de fotosensibilizador a emplear, se puede aplicar sobre la piel o inyección intravenosa de éste.
2. Se permite que el fotosensibilizador actúe en las células, dejando que disminuya la concentración en células normales pero acumulándose en células que se encuentran en constante división (cáncer), ó que se absorba por la piel.
3. Irradiación con una fuente luminosa a determinada longitud de onda, activando al fotosensibilizador.
4. Generación de especies tóxicas en la parte irradiada.
5. Daño de tejido.

Los fotosensibilizadores que actualmente tienen más efecto son: **Photophrin®** y **BPD verteporfin®**. La primera es elaborada por QLT Phototherapeutics, ha estado en fases clínicas por la última década, el primer fotosensibilizador aprobado, es activado por luz roja (630 nm), se administra por vía intravenosa y requiere de 48 a 72 horas para que se acumule preferentemente en las células con cáncer. El mayor efecto secundario es una notable fotosensibilización general que dura de 6 a 8 semanas después de la administración.

BPD verteporfin es elaborada por QLT Phototherapeutics y ha estado en ensayos clínicos desde 1992. Es activada por luz roja (690 nm) donde presenta una ventaja sobre el fotosensibilizador antes mencionado ya que a ésta longitud de onda, la luz penetra en mayor cantidad la piel a diferencia de la luz a 630nm; también es activada en Ultra-violeta (290-320 nm). Se administra por vía intravenosa y tiene un periodo de 1.5 a 6 horas para que esté acumulada la sustancia preferentemente en células con cáncer. El mayor efecto secundario que tiene es una alta fotosensibilización que dura de 3 a 4 días, y que los pacientes tienen que permanecer por este tiempo en cuartos con escasa luz.

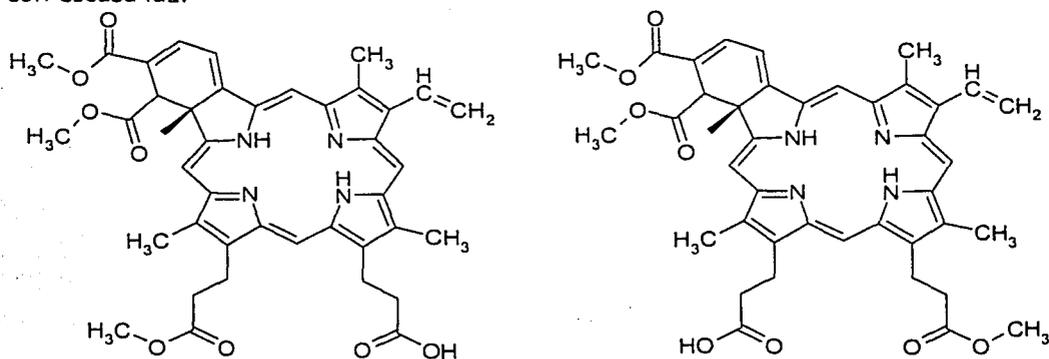


Figura No. 6. Estructura de los dos isómeros de BPD verteporfin.

La efectividad de las células cultivadas *in-vitro* y expuestas a un Fotosensibilizador y la combinación de éste con una luz láser ha sido demostrada en muchas ocasiones. [1, 14, 24-28]

2.2.1. El Láser, su importancia en la medicina.

La tecnología del láser ha tenido muchos avances en los últimos años. Con la creación de materiales de estado sólido y cristales no-lineales, nuevas instrumentaciones y herramientas de diagnóstico médico han aparecido año con año. Desde la invención de la tecnología láser a principios de los años 60's, médicos y científicos han buscado maneras y procedimientos para tratar a los pacientes. Quizá uno de los primeros usos que se le dio fue como bisturí sin sangrado.

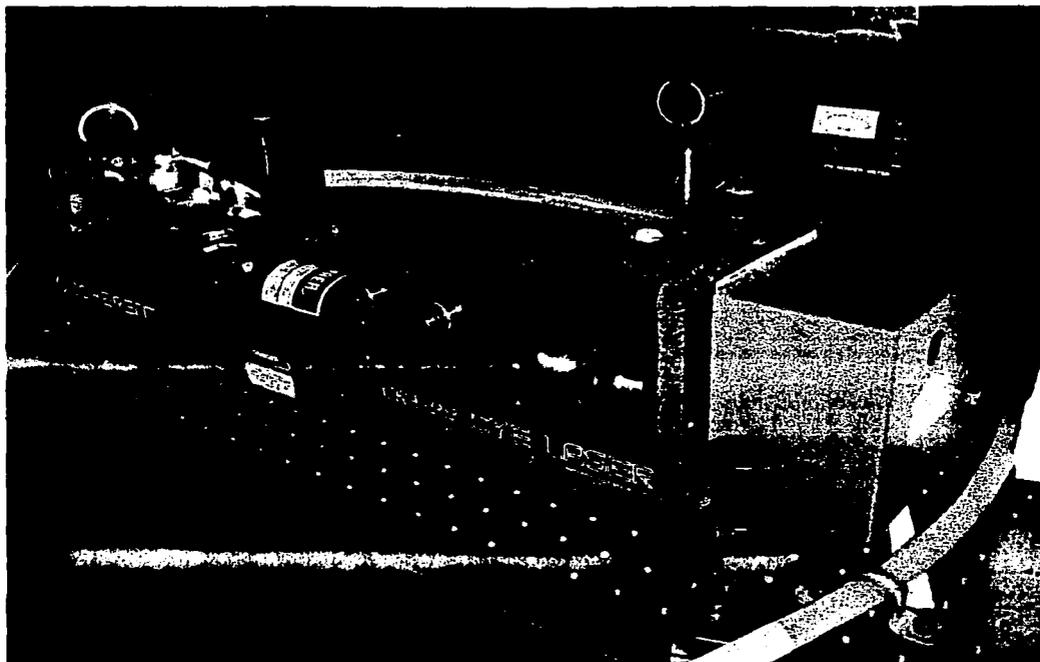


Figura No. 7. Láser de Colorante (al frente) y detectores de potencia lumínica (atrás).

El desarrollo de los láseres de estado-sólido así como cristales no lineales han incrementado la facilidad de uso de éstos equipos, así como contar con más longitudes de onda a nuestra disposición. Esto es importante pues los tratamientos generalmente dependen en la habilidad de las moléculas en los tejidos de absorber una específica longitud de onda del espectro [1, 29, 30]. Además, estos nuevos láseres son más compactos, de fácil uso, más económicos, más versátiles y consumen menores recursos que los láseres de gas o líquidos (Tabla No. 6). [31, 32]

El empleo de la tecnología láser en investigaciones y aplicaciones biotecnológicas se vuelve indispensable en estos días. La precisión con la que cuenta para enfocar la luz, así como la capacidad de generar pulsos con un intervalo muy corto, permite medir, detectar, estimular, enfocar, detener, evaporar y un sin número de aplicaciones con las que cuentan ya. Nuevos métodos de espectroscopia permiten en ciertos casos un diagnóstico temprano de enfermedades.

El mundo de la medicina no se ha puesto aún al corriente con todas estas aplicaciones brindadas por el láser (Tabla No. 6), pues es todavía poco común encontrar centros que presten este servicio. La continua mejora de los materiales para elaborar los láseres permitirá que los costos se reduzcan y se expanda su utilización.

Aplicaciones Médicas de los Láseres

Tipo de láser	Longitud de onda	Interacción con tejidos	Ventajas / Desventajas
Láseres de gas			
CO2	10.6 mm	Esta longitud de onda es bien absorbida por el agua y solo penetra el tejido menos de 0.1 mm. Coagulación del tejido resulta en necrosis.	Esta longitud de onda no se puede transmitir por fibras ópticas, limitando su uso a tejidos superficiales únicamente
Argon	488 - 514.5 nm.	Estas longitudes de onda son bien absorbidas por la hemoglobina pero no por tejidos no pigmentados. Se utilizan para evaporar lesiones.	Estos láseres tienen excelentes propiedades para la coagulación, sin embargo, requieren equipos de enfriamiento y protección en los ojos para todo el personal.
Láseres de colorante			
Colorante	400 - 1000 nm.	Utilizado para eliminar piedras en los riñones y para remover tatuajes.	Estos láseres son ajustables, se puede elegir con precisión la longitud de onda a utilizar. Requieren mucho mantenimiento, los colorantes son carcinogénicos y se tienen que cambiar regularmente
Láseres de estado sólido.			
Nd:YAG	1064 nm.	Esta longitud de onda causa coagulaciones en tejidos hasta 1.0 mm de profundidad	Como es infrarroja la radiación, requiere de otro láser para guiar al láser principal (comúnmente un láser de He-Ne)
Ho:YAG	2060 nm.	Esta longitud de onda es efectivamente absorbida por el agua y penetra en el tejido hasta 0.5 mm.	Esta longitud de onda se puede transmitir por fibras de sílice con poco contenido de agua, lo que la hace útil para aplicaciones endoscópicas. Sin embargo, es un láser infrarrojo, así que necesita otro láser como guía.
KTP	532 nm	Esta longitud de onda penetra el tejido de 1 hasta 2 mm.	No necesita láser guía ya que es verde.
Diodos	800 - 1100 nm	La longitud de 805 nm es la más conocida y se utiliza en aplicaciones de urología. No se absorbe en los tejidos así que causa coagulación.	Estos sistemas son pequeños y más baratos. La radiación es fácilmente transmitida por fibra óptica.

Tabla No. 6. Aplicación, rangos de funcionamiento y usos de diferentes tipos de láser.
[31, 33]

2.2.2. Interacción Luz-tejido.

Los tejidos biológicos son ópticamente heterogéneos al absorber radiación de cualquier tipo, y tienen un índice de refracción promedio mucho mayor que el aire. Esto es debido parcialmente por la reflexión de la radiación en la interfase entre el aire y el tejido (conocida como reflexión de Fresnel), mientras que la parte de la radiación que no se refleja, penetra al tejido. La difusión y la absorción de la radiación se deben principalmente por el esparcimiento de la luz láser y el decaimiento del mismo mientras viaja a través del tejido. Diferentes organelos celulares, como las mitocondrias, son los principales responsables de la difusión de la radiación.

La luz absorbida es convertida en calor o emitida en forma de fluorescencia, es también consumida en reacciones fotoquímicas. El espectro de absorción depende en que tipo de centros de absorción predominan en el tejido y la cantidad de agua que contenga.

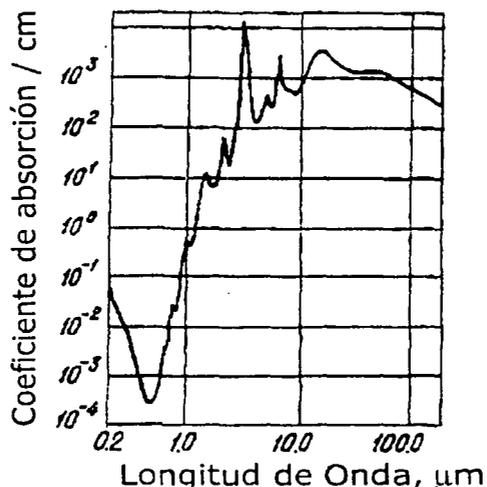


Figura No. 8. Diagrama de absorción para el agua a diferentes longitudes de onda. [34]

Coefficientes de absorción absolutos para algunos tejidos típicos caen dentro de un rango de entre 10^{-2} y 10^4 cm^{-1} . [32, 34-38] En la región de luz ultra-violeta (UV) e infrarrojo (IR) ($\lambda > 2 \mu\text{m}$), la luz es fácilmente absorbida, esto contribuye a la propagación y la ineficiencia de la luz de penetrar en los tejidos (sólo lo hace en una o dos capas de profundidad). Luz visible de menor longitud de onda tiene una mayor penetración en el tejido entre 0.5 - 2.5 mm. En éste caso, tanto absorción como esparcimiento de la luz ocurren, y un 15-40% de reflexión de la luz incidente. En el rango de longitud de onda de 0.6 - 1.5 μm , es mayor la dispersión de la luz que la absorción, y la luz se introduce en el tejido un rango de 8 a 10 mm. Simultaneo a esto, un 35 - 70% de la luz que incide, es reflejada. [34, 39]

La interacción de la luz con un tejido de varias capas y con un sin número de componentes, como lo sería la piel, es un proceso complicado. [40] La capa rugosa

de la piel refleja aproximadamente 5 - 7% de la luz incidente. Un haz de luz colimado es transformado en un haz difuso al chocar con microscópicas irregularidades en el paso entre el aire y la piel. La absorción de la luz difusa por los pigmentos de la piel es una medida directa de la concentración de bilirrubina, concentración de oxihemoglobina y la concentración de de productos farmacéuticos en la sangre y en los tejidos; éstas características son usadas en diagnósticos para muchas enfermedades.

Coefficiente de extinción molar, $\times 10^5$, L / mol cm

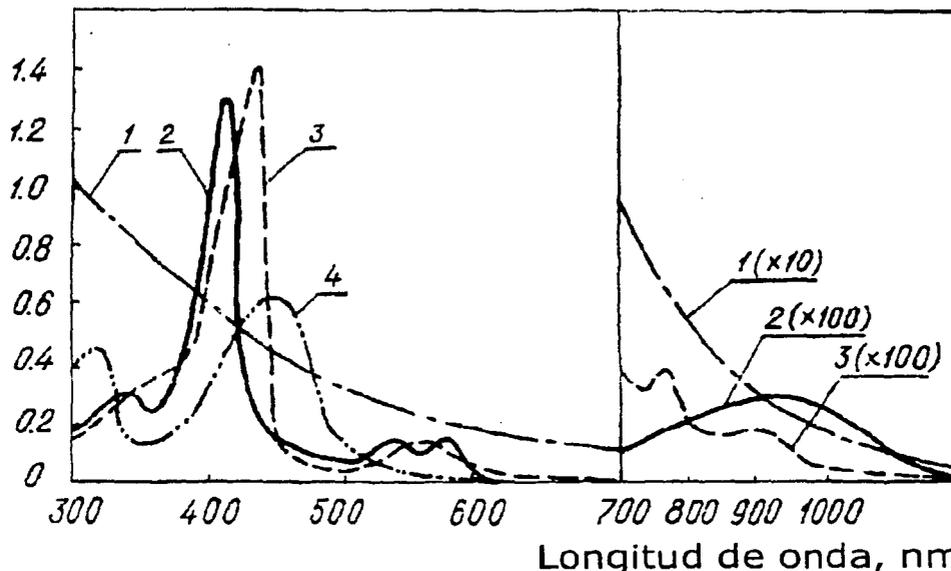


Figura No. 9. Espectros de atenuación de diferentes constituyentes biológicos: 1. DOPA-melanina (H_2O), 2. oxihemoglobina (H_2O), 3. hemoglobina (H_2O), 4. bilirrubina ($CHCl_3$). [34]

Algunos de los diagnósticos y tratamientos fototerapéuticos aprovechan las ventajas de la fácil penetración de la región del espectro cercano al Infrarrojo (NIR) dentro del cuerpo en la región de 600 a 1600 nm.

Otro ejemplo de un tejido con componentes heterogéneos es un tejido de glándula mamaria femenina (compuesto principalmente por tejido adiposo y fibroso). Se puede apreciar en la figura No. 9 las bandas de absorción de la hemoglobina, grasa y el agua *in-vitro* en una preparación de 3 mm de ancho del tejido. [30]

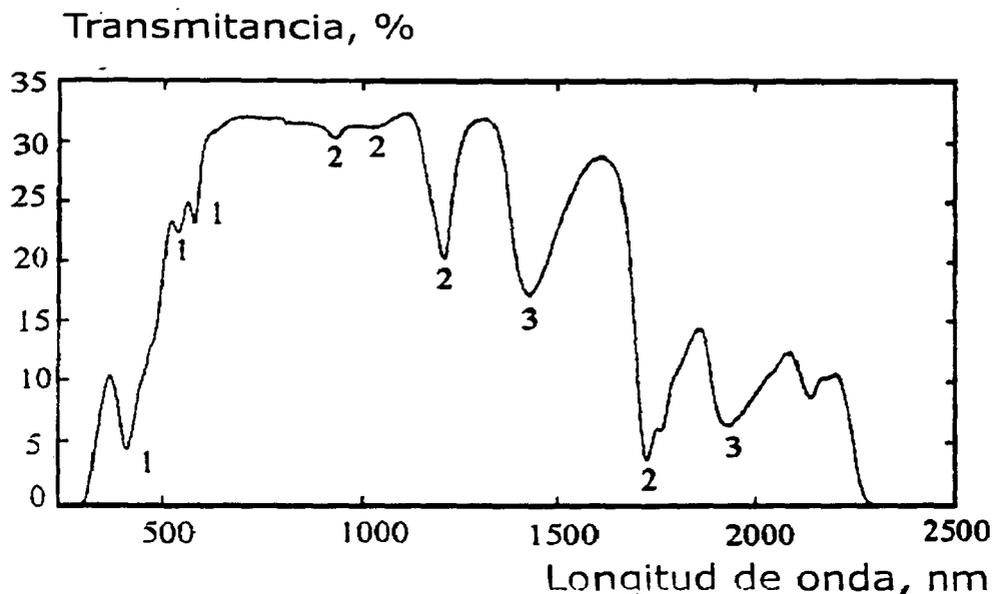


Figura No. 10. Espectro de transmitancia de un corte de 3-mm. de ancho de tejido. Se pueden ver las bandas contribuidas por los diferentes componentes del tejido: 1. hemoglobina, 2. tejido adiposo y 3. Agua. [34]

Existe una gran atenuación de porcentaje de luz transmitida entre 700 y 1100 nm, y varias más en 1300 y 1600 nm, donde el mayor porcentaje de luz es atenuada.

Tejidos sólidos como las costillas y el cráneo, así como sangre completa, son fácilmente penetrados por luz visible y de la banda cercana al infrarrojo. [34, 36, 41] La transmitancia que tiene la piel con luz ultravioleta, es relativamente buena, con luz ultravioleta. Esto se debe al espectro de absorción que tienen el ADN, el triptófano, la tirosina, el ácido úrico y la melanina (Figura No. 10). [29, 41, 42]

Densidad óptica

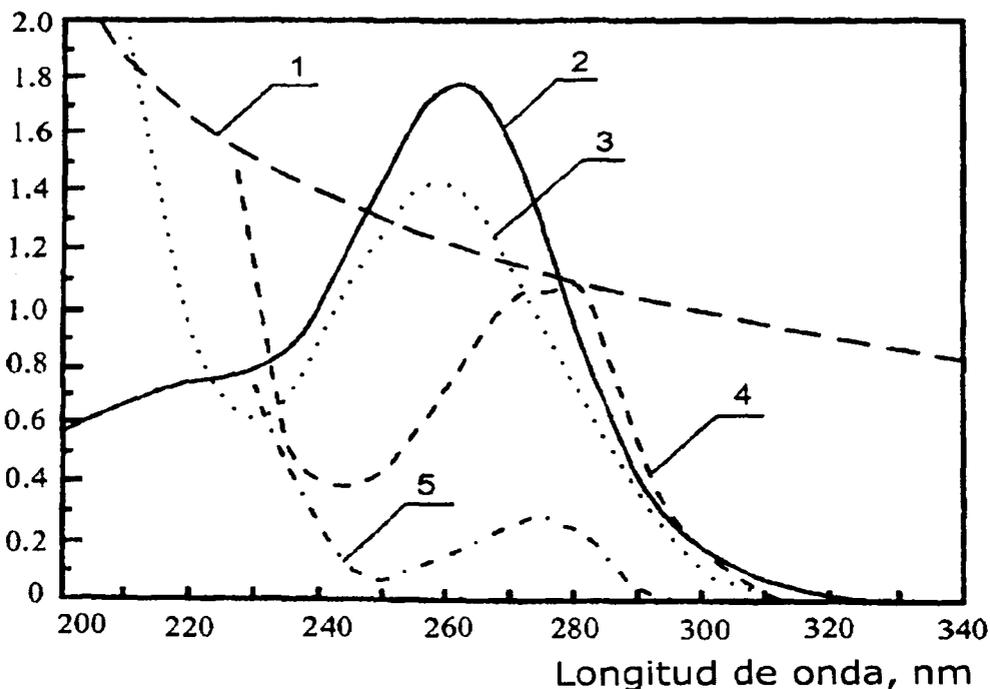


Figura No. 11. Espectro de absorción en la región UV de los mayores grupos cromóforos en la piel (1. DOPA-melanina, 1.5 mg % en H₂O; 2. ácido urocánico, 10⁻⁴ M en H₂O; 3. DNA en 10 mg % en H₂O (pH 4.5); 4. triptófano, 2 x 10⁻⁴ M (pH 7); 5. tirosina, 2 x 10⁻⁴ M (pH 7). [40]

Un haz de luz colimado, como aquél producido por un Láser, es atenuado en una capa de tejido de grosor d siguiendo la ley exponencial de Beer-Lambert.

$$I(d) = (1 - R_F)I_0 \exp(-\mu_t d),$$

donde $I(d)$ es la intensidad de luz transmitida medida usando un fotodetector con una pequeña apertura de entrada, W / cm²; R_F es el coeficiente de reflexión, I_0 es la intensidad de la luz incidente, μ_t es el coeficiente de absorción.

Existen dos principales mecanismos en donde la luz, en presencia de un fotosensibilizador y di-oxígeno, puede promover una reacción química en un sustrato, dentro de una célula, incluyendo con esto el daño al tejido vivo. Estos mecanismos son referidos como de Tipo I y de Tipo II. Ha habido discusión acerca de las definiciones de éstos dos procesos, para simpleza, se utilizarán las definiciones de Henderson [26].

2.3. Mecanismos de Acción

Los mecanismos que involucran al funcionamiento de la Terapia Fotodinámica, involucran mecanismos de absorción y emisión de luz. En un tema tan interdisciplinario como lo es el empleo de ésta terapia, no podemos continuar sin comentar los fundamentos del comportamiento físico de los átomos y elementos. Más información se puede encontrar en el último apéndice de éste trabajo: "Un poco acerca de la luz".

Esta terapia está basada en lo que sucede cuando una sustancia con ciertas características absorbe energía en forma de luz, que provoca esta sustancia con esa energía y que ocurre con el entorno alrededor de la sustancia.

Existen varias maneras en las que las sustancias absorben o emiten luz, así como existen diferentes resultados cuando ocurre la interacción de la luz con la materia. Los procesos más importantes son:

- Absorción de luz:
 - Ley de Lambert-Beer
- Excitación:
 - Multiplicidad
- Emisión
- Transferencia de excitación electrónica intermolecular (Intermolecular electronic excitation transfer)

Ley de Lambert-Beer

La cantidad de luz que absorbe una sustancia en un solvente obedece a dos leyes. La Ley de Lambert que establece que la fracción de luz que es absorbida por una sustancia es independiente de la energía radiante incidente; mientras que la Ley de Beer dice que la cantidad de luz absorbida es directamente proporcional a la concentración de la solución. Si unimos ambas Leyes (la Ley de Lambert-Beer) tenemos que:

$$\text{Absorción } A = \log_{10} \frac{P_0}{P} = A = \varepsilon cl = \log_{10} \frac{I_0}{I}$$

donde P_0 y P son las energías de la luz transmitida e incidida (llamadas también intensidades y denominadas por I_0 y I), A es la absorbancia, ε es el coeficiente de absorción molar, c es la concentración (mol L^{-1}) y l es la longitud del recorrido de la luz (en centímetros, es por eso que se acostumbra a utilizar celdas de 1 cm^3 , para unificar las mediciones). Las unidades de ε quedan como $1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La figura No. 12 muestra el espectro electrónico (graficando ε contra longitud de onda) de la haematoporfirina en acetona. Este espectro muestra una intensa absorción alrededor de los 400nm (llamada la banda Soret, o la banda B) y 4 bandas más (las llamadas bandas Q) en el rango de 500 a 650 nm. [43, 44]

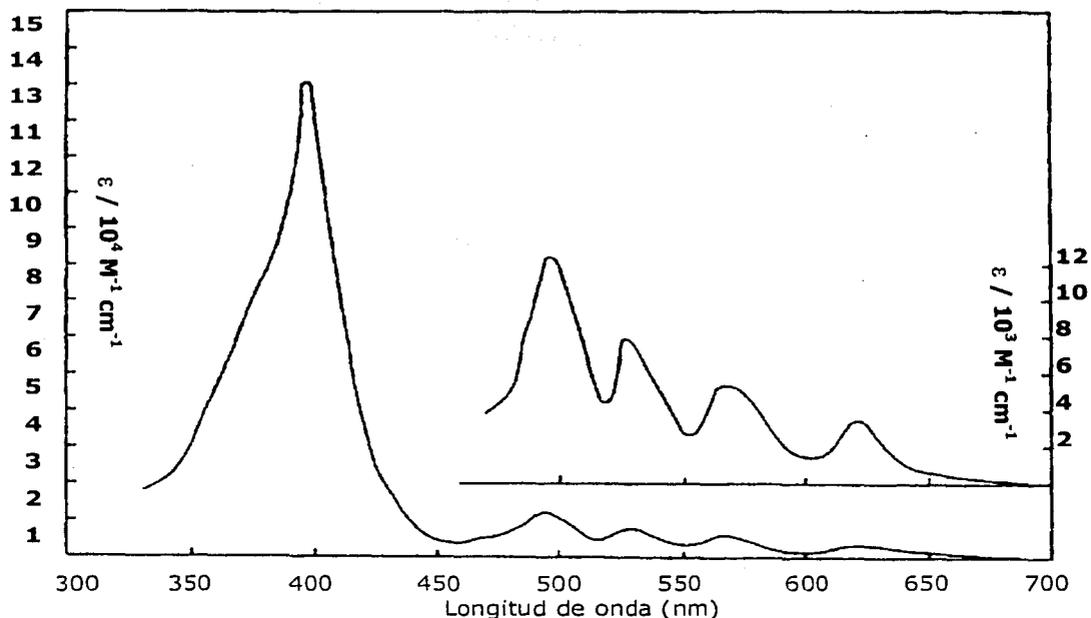


Figura No. 12. Espectro electrónico de la Haematoporfirina en acetona. Las bandas en la región de 500-600 nm son conocidas como las Bandas I-IV. [45]

Excitación por multiplicidad.

La absorción de la luz en la región de la luz ultravioleta y la luz visible involucra transiciones electrónicas: un fotón de cierta energía interacciona con la molécula sustrato en su estado basal (S_0) para obligar a un electrón a ser promovido de un orbital de enlace o anti-enlace a un orbital de mayor energía, normalmente en moléculas orgánicas, un orbital de anti-enlace desocupado. La molécula es entonces elevada de su estado basal a un estado excitado electrónicamente.

Dicha excitación puede resultar en dos configuraciones, que difieren en *multiplicidad*. La multiplicidad es definida como $2S + 1$, donde S es el número total de spin del sistema ($\Sigma \pm 1/2$). Las configuraciones mencionadas son: estado de singulete y estado de triplete (Figura No. 13).

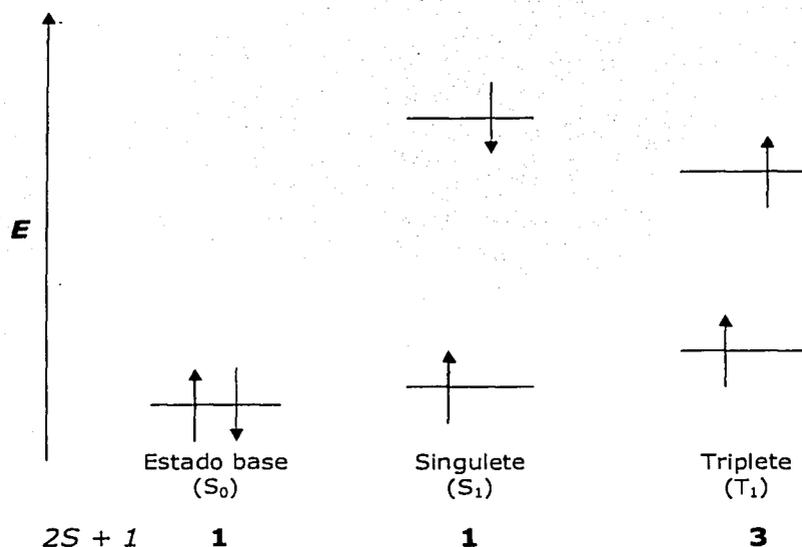


Figura No. 13. Multiplicidad de los estados basales y excitados: se muestra la configuración de los electrones más externos.

Excitación por probabilidad.

La energía requerida para alguna transición, así como aquellas descritas en la figura No. 12 para la Haematoporfirina, son determinadas por su longitud de onda: el coeficiente de absorción molar da la probabilidad de que cierta transición se permita. Esto está relacionado con el área debajo de la banda de absorción, conocida también como ϵ_{\max} . Existen algunas características que ocasionan que las transiciones energéticas estén "prohibidas" (que sean menos probables), y disminuyendo el valor de ϵ :

- *Spin*: transiciones que involucran un cambio de multiplicidad ($S \rightarrow T$, o $T \rightarrow S$) están restringidas. Esta restricción puede ser relajada por la presencia de átomos pesados, especies paramagnéticas y por ordenamiento de orbitales del átomo.
- *Espacio*: los orbitales que están involucrados en la transición, tienen que traslaparse: esto sucede para la transición del grupo carbonilo $\pi \rightarrow \pi^*$, pero no para la transición $n \rightarrow \pi^*$, la cuál está prohibida ($\epsilon=15$ a λ_{\max} 279nm para la acetona en hexano).

Emisión

Después de la estimulación y excitación, éste estado, ya sea como singulete o tripolote, puede producir una o más de lo siguiente:

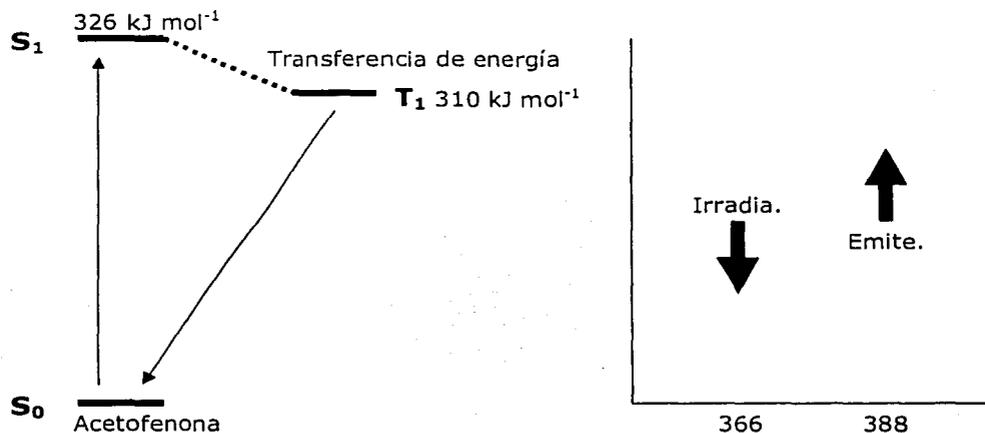
- Puede emitir un fotón;
- Puede convertirse a un estado diferente;
- Puede producir una reacción química;
- Puede pasar su estado de excitación a otra especie que se encuentre en estado basal (transferencia de excitación electrónica).

Emisión de un fotón a partir de un singulete se llama fluorescencia (10^{-8} a 10^{-10} segundos), mientras que la emisión de una especie excitada estado de triplete, se llama fosforescencia (10 a 10^{-3} segundos). En ambos casos, la longitud de onda de la luz emitida no es la misma que a la longitud de onda de la luz utilizada para excitar y en ambos casos, se regresa siempre al estado basal (S_0).

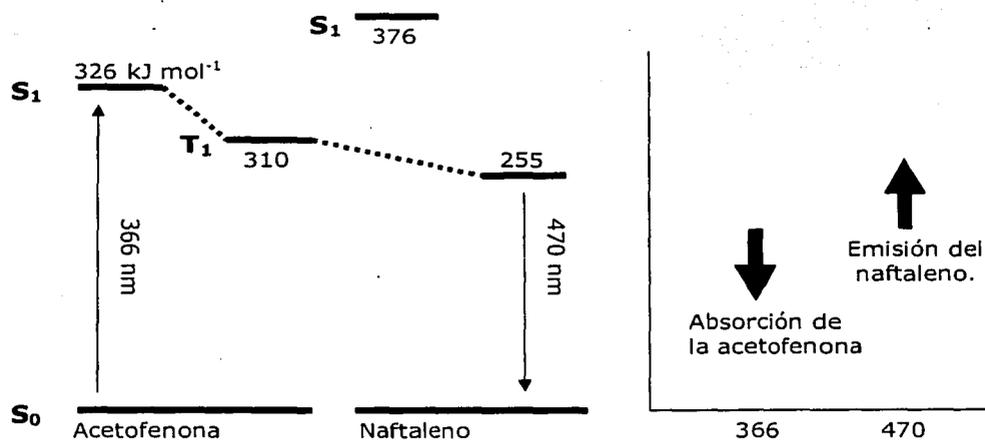
Transferencia de excitación electrónica intermolecular (Intermolecular electronic excitation transfer)

Este fenómeno fue demostrado por los rusos por primera vez y utilizaremos el ejemplo original del trabajo de Terenin y Ermolaev.

Cuando 0.5 M de acetofenona en una mezcla de etanol-éter a 90K es irradiada a 366nm, ocurre una radiación fosforescente de la acetofenona a los 388nm:

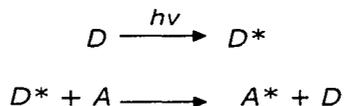


Ahora, si se le agrega al sistema 0.5 M de naftaleno, la emisión de 388 nm es consumida y la emisión ocurre ahora a los 470 nm, que corresponde a la fosforescencia del naftaleno. La estimulación a 366 nm no causa al naftaleno por si solo emisión alguna (porque no absorbe). Por lo tanto podemos deducir que la excitación de la acetofenona, que resulta en la generación del triplete de ésta (T_1 310 kJ mol^{-1}) ha pasado, en el segundo experimento, a la molécula del naftaleno. El naftaleno no puede absorber energía por si solo, pero puede aceptarla de la acetofenona. El triplete del naftaleno ha sido generado sin que se requiera la excitación fotoquímica del naftaleno por si solo (pues la energía disponible no es suficiente para lograr el estado S_1 a 376 kJ mol^{-1}).



Entonces, la acetofenona, que llamaremos donador, D , es el sensibilizador de la fosforescencia del naftaleno, mientras el naftaleno, que llamaremos receptor, R , es el "eliminador" de la fosforescencia de la acetofenona. La reacción se puede resumir como:

Para esto que funciona, la energía del triplete del donador (E_s) tiene forzosamente que ser mayor que la energía del triplete del receptor, y el spin de las especies tendrá que ser:



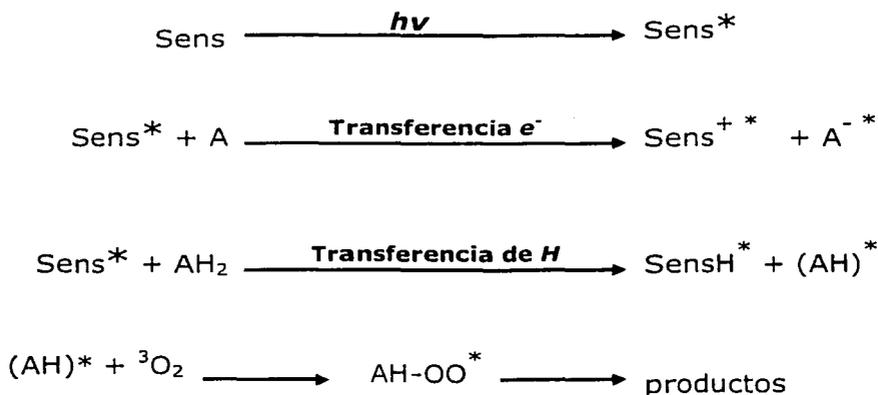
El spin total en cada lado de la reacción es el mismo. Con esto tenemos una manera de generar especies reactivas en forma de triplete, que pueden ser útiles para la sensibilización para el uso de Terapia Fotodinámica.



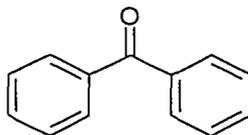
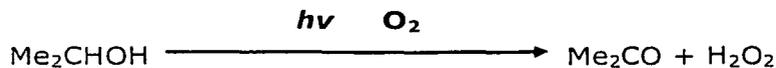
Existen dos principales mecanismos en donde la luz, en presencia de un fotosensibilizador y di-oxígeno, puede promover una reacción química en un sustrato, dentro de una célula, incluyendo con esto el daño al tejido vivo. Estos mecanismos son referidos como de Tipo I y de Tipo II. Ha habido discusión acerca de las definiciones de éstos dos procesos, para simpleza, se utilizarán las definiciones de Henderson [26].

2.3.1. Tipo I – Transferencia electrónica.

En este mecanismo, el estado de transición (o excitado), genera un radical libre, por ejemplo, por transferencia electrónica hacia (o desde) un sustrato, o por la transferencia de un átomo de hidrógeno desde un sustrato. Los radicales entonces reaccionan con el oxígeno presente para comenzar una auto-oxidación:

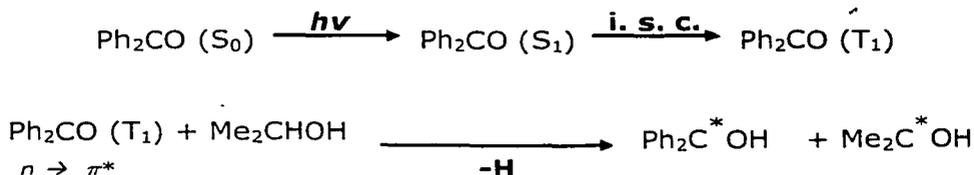


Como ejemplo para ésta explicación se puede utilizar la foto-auto-oxidación de un alcohol secundario en la presencia de benzofenona como el sensibilizador. La reacción en general es:



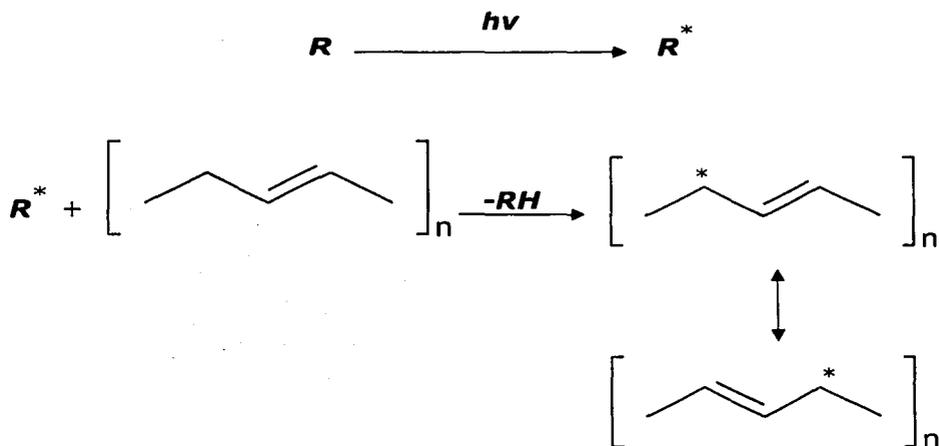
Ph₂CO

y el mecanismo completo se desarrolla como:



Con este mecanismo, la generación del radical libre foto-dinámicamente se termina. Las reacciones (oscurecidas) que seguirían serían de propagación de las especies recién generadas, hasta que se agoten los radicales libres.

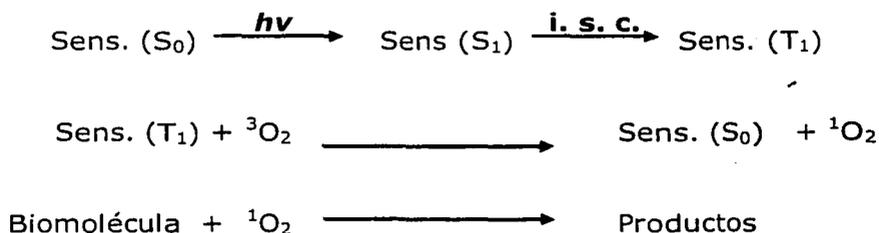
Un proceso biológico que puede proceder por la vía de los radicales libres, es la per-oxidación de los lípidos. En éste caso, una especie generada foto-químicamente sustrae un átomo de hidrógeno de un lípido insaturado:



Después de esto, los radicales reaccionan con oxígeno en forma de triplete para generar una mezcla de hidro-peróxidos y sus productos de descomposición.

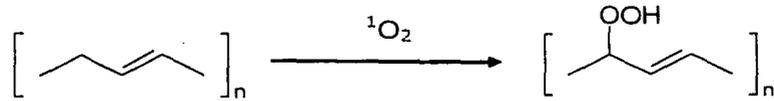
2.3.2. Tipo II – Transferencia energética.

En éste mecanismo, la energía de excitación electrónica es transferida desde el estado excitado (triplete) de la sustancia sensibilizadora, al estado excitado del dióxigeno (también triplete), para dejar al sensibilizador en su forma basal y oxígeno en forma de singlete:

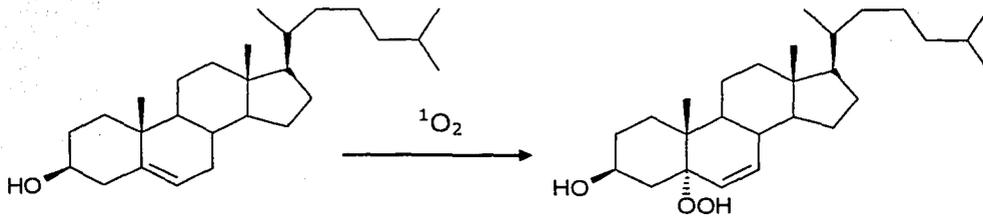


De entre las biomoléculas más reactivas con la presencia de singletes de oxígeno, se encuentran:

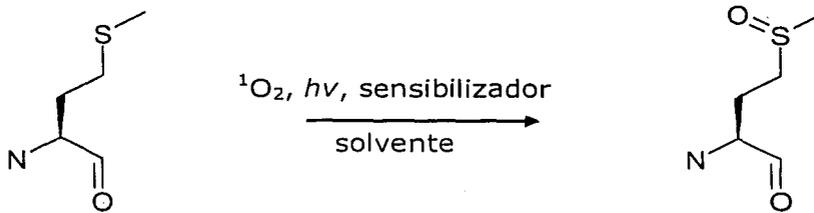
a) Lípidos insaturados.



b) Colesterol, dando como producto 5 α -hidroperóxido.

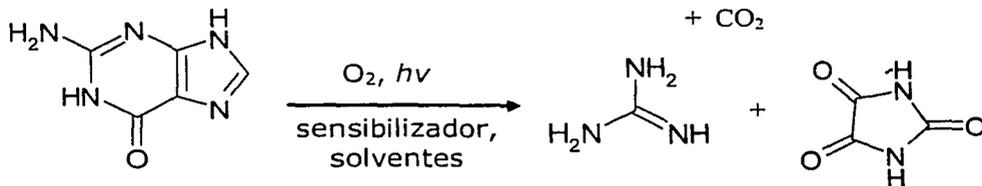


c) Derivados de α -aminoácidos.

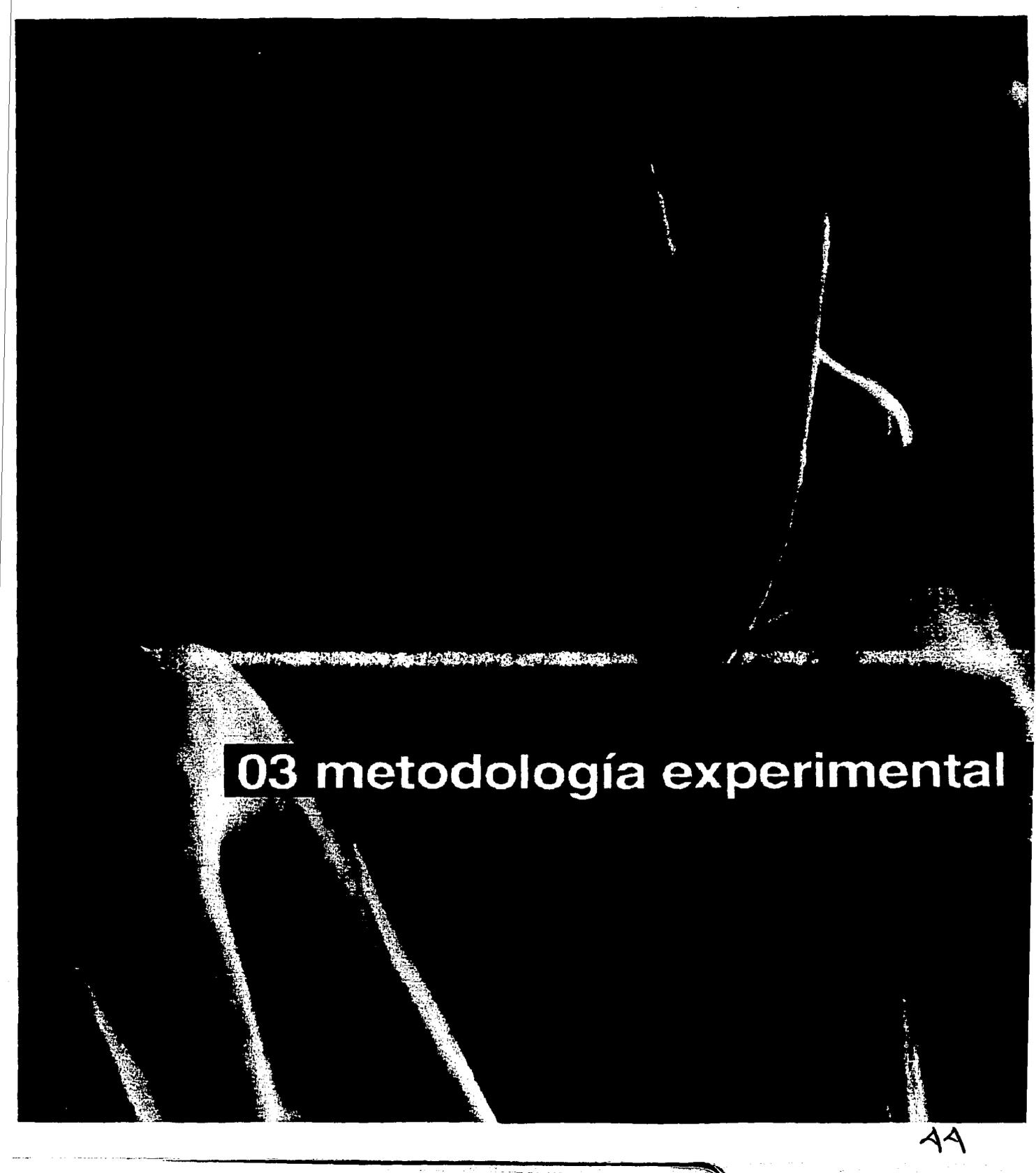


Metionina

d) Bases nitrogenadas (purinas, ADN, ARN).



Este es el mecanismo con mayor interés en esta situación, pues la producción de oxígeno reactivo por medio de fotosensibilización, es el fundamento de la presente tesis. Es el método más sencillo, también, para la producción de singuletes de oxígeno en el laboratorio. El umbral de reconocimiento entre que tipo de reacción se lleva a cabo en procesos de fotosensibilización es muy estrecho y todavía no hay suficientes métodos para distinguir el uno del otro. Las pruebas conocidas para realizar la detección entre un tipo y el otro (como el tiempo de vida en solventes deuterados, detección de radicales oxidrilo, etc.) no distinguen de manera efectiva entre radicales singuletes de oxígeno y radicales superóxidos. Básicamente el fundamento de ambos, consiste en la transferencia de excitación electrónica intermolecular (Intermolecular electronic excitation transfer). [1, 26, 27, 45]



03 metodología experimental

3. Capítulo III Metodología Experimental

3.1. Cultivo de líneas celulares tumorales in vitro

Las células que se encuentran dentro de un organismo pueden crecer debido a que reciben todos los nutrientes necesarios para su desarrollo. Las células tumorales pueden crecer *in vitro* empleando un medio de cultivo que contenga todos los elementos necesarios para su crecimiento, como son: fuente de carbono, fuente de nitrógeno y cofactores, aminoácidos esenciales y vitaminas, así como oligoelementos y factores de crecimiento que aporta el suero fetal bovino. Además existen células que requieren de ciertos factores especiales que deben ser adicionados al medio para el crecimiento adecuado.

De acuerdo a su procedencia y al tipo de subcultivo se clasifican en [46]:

- Cultivo primario: se obtiene directamente del tejido animal; está constituido por células bien diferenciadas cuya permanencia en cultivo es corta.
- Cultivo secundario: se obtiene a partir de un cultivo primario, se comporta de la misma forma que éste.
- Cepa celular: es un cultivo celular bien caracterizado. Consta básicamente de tres fases: inicio, reproducción (división celular) y muerte.
- Línea celular: se refiere a una estirpe celular, que se divide aceleradamente, y que muestra un tiempo de vida indefinido, es decir, que es inmortal bajo condiciones de cultivo establecidas.

En el presente trabajo se evaluaron dos líneas tumorales humanas de Carcinoma cérvico-uterino: HeLa y SiHa.

3.1.1. Generalidades de cada línea celular utilizada

LINEA CELULAR: HeLa	
Número ATCC	CCL-2
Organismo	Homo sapiens (humano)
Designación	HeLa
Depositario	W.F.Scherer
Tejido	Adenocarcinoma del cérvix, queratinizante
Morfología	Epitelial
Comentarios	Las células son positivas para queratina por tinción de inmunoperoxidasa. Se ha reportado que contienen secuencias de papiloma virus 19 (HPV18).
Edad del paciente	31 años
Etnicidad	Negra
Género	Femenino
Propiedades de crecimiento	Adherente
Estadío clínico	IV-A

LINEA CELULAR: SiHa	
Número ATCC	HTM-35
Organismo	Homo sapiens (humano)
Designación	SiHa
Depositario	Y. Ito
Tejido	Carcinoma de células escamosas de cérvix
Morfología	Epitelial
Comentarios	Esta línea fue establecida a partir de fragmentos de una muestra de tejido primario obtenida después de cirugía a una paciente japonesa. Se reporta que contiene genoma de papiloma virus tipo 16 (HPV16) en una o dos copias por célula.
Edad del paciente	55 años
Etnicidad	Oriental
Género	Femenino
Propiedades de crecimiento	Adherente
Estadío clínico	III-B

3.2. Reactivos y materiales

3.2.1. Materiales

- Matracas de cultivo
- Microplacas de 96 pozos
- Pipetas sexológicas desechables estériles
- Tubos de centrifuga desechables estériles (15mL)
- Criotubos
- Filtro μ star BL 0.22, no pirogénico
- Pipetas Pasteur de Vidrio
- Matracas kitasato
- Frascos de vidrio (contenedores para reactivos)
- Hematocitómetro (cámara de Newbauer)

3.2.2. Equipo

- Campana de flujo laminar
- Microscopio invertido
- Microscopio óptico
- Lector de microplacas
- Pipetero automático
- Baño a 37°C
- Incubadora a 37 °C (+/- 2 °C) y 5% de CO₂
- Refrigerador a 4 °C
- Termómetro
- Autoclave
- Bomba de vacío
- Tanque de nitrógeno líquido
- Balanza analítica
- Mesa óptica
- Soportes para lentes, lentes, prismas
- COHERENT INNOVA 90 Ar ion Laser
- COHERENT CR-599-01 Dye Laser (Rodamina 6G, 572-665 nm)
- Princeton Instruments Chopper
- Fibra óptica
- Monocromador Oriel y
- Monocromador AR-504 Acton Research.

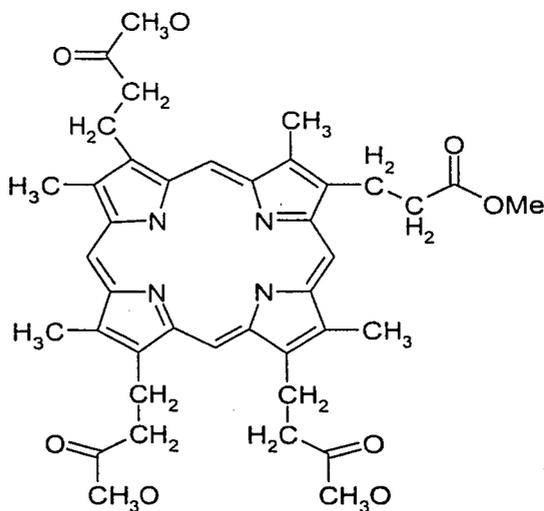
3.2.3. Reactivos

- Medios y reactivos para el cultivo de las células:
 - Medio D-MEM
 - Medio RPMI
 - Suero fetal Bovino
 - Antibiótico-antimitótico: Penicilina G sódica

- Sulfato de estreptomina y anfotericina B
- Reactivos para el lavado de las células en la caja de cultivo (PBS):
 - Cloruro de sodio
 - Fosfato monobásico de potasio
 - Fosfato dibásico de sodio
 - Cloruro de potasio
- Reactivos para desprender las células de la caja de cultivo:
 - PBS-EDTA
 - Cloruro de sodio
 - Fosfato monobásico de potasio
 - Fosfato dibásico de sodio
 - Cloruro de potasio
 - EDTA (sal disódica dihidratada)
 - Tripsina
- Medio para el congelamiento de las células:
 - Suero fetal bovino
 - Dimetilsulfóxido
 - Nitrógeno líquido
- Reactivos para tinción de las células:
 - Sulforrodamina-B
 - Ácido acético

3.3. Fotosensibilizador

El Fotosensibilizador empleado fue la Coproporfirina III tetrametil ester, al ser el intermediario de la generación de haematoporfirina, que ingresa a la mitocondria del citosol. Se busca con esto, que se tenga mayor foto-acción dentro de la mitocondria. La eficiencia de utilizar ésta familia de intermediarios en la vía de la generación de la haematoporfirina, es tema para otro estudio completo.



Coproporfirina III tetrametil ester

3.4. Metodología para el manejo de las líneas celulares

Existen varios métodos para determinar el efecto de agentes externos sobre la proliferación celular, dentro de los cuales se encuentran:

- Incorporación de Timidina Triteriada: que consiste en medir la cantidad de timidina triteriada en la síntesis no programada DNA de células dañadas por los compuestos que se quieren monitorear. Una de las desventajas de éste método es la complejidad de la técnica, además de los problemas asociados con el uso de radioisótopos y su deposición.
- Ensayo de sales de tetrazolio (MTT), el cual se basa en la habilidad de las células viables en reducir las sales de tetrazolio a formazán, asumiendo que las células muertas o sus productos no realizan dicha función. Entre las desventajas del método se encuentran:
 - La reducción química de las sales y otros agentes
 - Interferencia química con la reducción celular
 - Gran variedad de condiciones metabólicas
 - Costo y tiempo de incubación muy altos
- Ensayo con Sulforrodamina B (SRB), es un típico ensayo de medición de proteínas, asume que las células muertas son removidas durante el proceso y no contribuyen en el punto colorimétrico. Es un método sencillo y confiable utilizado para este tipo de ensayos donde se quiere monitorear el efecto del fármaco sobre los cultivos celulares. Una posible desventaja es que puede sobreestimar la porción de células vivas por la presencia de células muertas no lisadas.

En este ensayo, se utilizará la tinción con Sulforrodamina B por ser el método de mayor facilidad. Dado que queremos medir el porcentaje de células eliminadas por la técnica base de ésta tesis, esta tinción funciona adecuadamente.

3.4.1. Des-congelamiento de células

Las células se encuentran originalmente en criotubos, para proceder al descongelamiento se debe tener la campana de flujo laminar estabilizada, encendida al menos 30 minutos antes de iniciar el trabajo y tener un baño de agua a 37 °C, se saca el criotubo del tanque con Nitrógeno líquido y se introduce cuidadosamente al baño, en la campana de flujo laminar se prepara un tubo con 10 mL de medio D-MEM (tanto el medio como el tubo deben estar estériles), en cuanto se observa el descongelamiento, se pasa la suspensión celular al tubo ya preparado y se centrifuga durante 10 min. a 2000 rpm, el sobrenadante se desecha y el paquete celular se lava con medio. Se centrifuga nuevamente y se elimina el sobrenadante, el paquete celular se resuspende en una pequeña cantidad de medio de cultivo y se procede a la siembra en los matraces de cultivo

3.4.2. Obtención del cultivo de abastecimiento (stock) a confluencia

Las células después de haber sido lavadas se colocan en matraces de cultivo de 25 cm², con 5 mL de medio de cultivo adicionado con 10% de suero fetal bovino (4.5

mL de D-MEM y 0.5 mL de SFB), éste cultivo se incuba a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 5% de CO_2 . Se debe revisar diariamente el cultivo para estimar el porcentaje de confluencia, si aún no se ha alcanzado al menos el 70%, se cambia el medio de cultivo cada 48 horas.

Si el medio de cultivo vira a color amarillo y se observa turbio es un indicador de contaminación microbiológica, aunque la coloración amarilla también se puede deber a que el cultivo ya se encuentre a confluencia y por ello acidificó el medio

3.4.3. Tripsinización

Una vez que se obtiene el cultivo Stock a confluencia se aspira el medio de cultivo de la caja, se lava con 5 mL de PBS-EDTA y 2 mL de la solución de Tripsina, se agita hasta que, al microscopio se observen las células desprendidas de la superficie y separadas individualmente. Se para la reacción de la Tripsina adicionando 5 mL de PBS-Albúmina, ésta suspensión se coloca en un tubo y se procede a centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se desecha y el paquete celular se resuspende en 1 ml de medio de cultivo

3.4.4. Cuantificación de células

El uso de la cámara de Neubauer y la cuantificación de viabilidad con azul tripano ha sido muy utilizado y recomendado por su sencillez y por dar muy buenos resultados.

Se debe limpiar cuidadosamente la superficie del hematocitómetro con una solución de isopropanol al 70% y se deja secar.

Por separado en un tubo Eppendorf se colocan 20 μL de la suspensión de células y 80 μL de solución de azul tripano, se mezcla perfectamente y se transfiere cuidadosamente a las dos secciones de la cámara. Se coloca el Hematocitómetro en el microscopio óptico utilizando el objetivo de 10X, y se procede a contar el número de células teñidas y no teñidas por mm^2 , para que el conteo sea más preciso se recomienda que la cuenta sea de entre 100 y 500 células por mm^2 , la cuenta se repite en las otras secciones y después se hacen los cálculos correspondientes a la viabilidad y a el número de células por mL de suspensión.

$$C = \bar{N} * 10^4$$

Donde: C = Células por mililitro; \bar{N} = Promedio de células contadas; 10^4 = Factor de conversión de la cámara.

$$\text{Porcentaje de viabilidad} = [(\text{Tot} - \text{Teñ}) / \text{Tot}] * 100$$

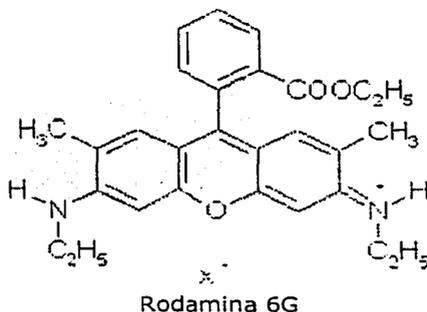
Donde: Tot = Total de células contadas; Teñ = Células teñidas.

3.5. Arreglo óptico y preparación del láser de Argón y el láser de Colorante.

El arreglo óptico empleado fue armado en una mesa óptica de 2 x 1.40 m ubicada en el laboratorio de Espectroscopia del Laboratorio de Óptica Aplicada, en el Centro de Ciencias Aplicadas y desarrollo Tecnológico (LOA-CCADET) en CU, UNAM. Para lograr la estimulación adecuada del Fotosensibilizador en 422, 519 y 585 nm (puntos de absorción máxima detectados en un Espectro de Fluorescencia) se empleó un sistema conjunto de láseres de Argón y de Colorante. El láser de Argón, es un láser de onda continua que proporciona de 0.01 watt hasta 1.4 watts de intensidad contiene varias líneas espectrales máximas, siendo estas: 454.6 nm 457.9 nm 465.8 nm 476.5 nm 488.0 nm 496.5 nm 501.7 nm 514.5 nm 528.7 nm.[33, 47, 48]

Longitud de onda (nm)	Potencia relativa	Potencia absoluta (W)
454.6	0.03	0.8
457.9	0.06	1.5
465.8	0.03	0.8
472.7	0.05	1.3
476.5	0.12	3.0
488.0	0.32	8.0
496.5	0.12	3.0
501.7	0.07	1.8
514.5	0.40	1.2
528.7	0.07	1.8

Para contribuir con la banda de 585 nm se utilizó conjuntamente un láser de colorante líquido excitado por el bombeo óptico del láser de argón (aprox. 1 watt). En este caso se utilizó un láser de colorante DYE 599 COHERENT y como colorante se utilizó *rodamina 6G* (Rh6G).



Se tienen evidencias que un láser pulsado es mucho más eficiente para la penetración y la activación de la Terapia Fotodinámica, para evitar el calentamiento del tejido, que una emisión e irradiación de forma continua, así que se empleó un modulador óptico mecánico (Fig. 14. CHOPPER) con una frecuencia de 400 Hz. [49-51]

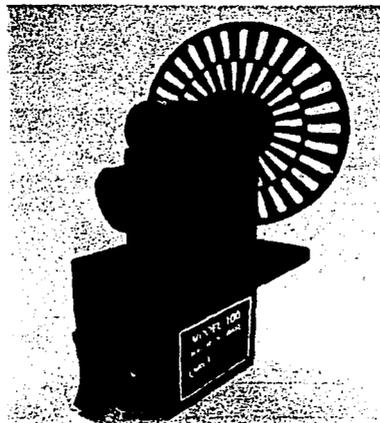


Fig. 14. Modulador óptico mecánico (Chopper) Princeton Instruments.

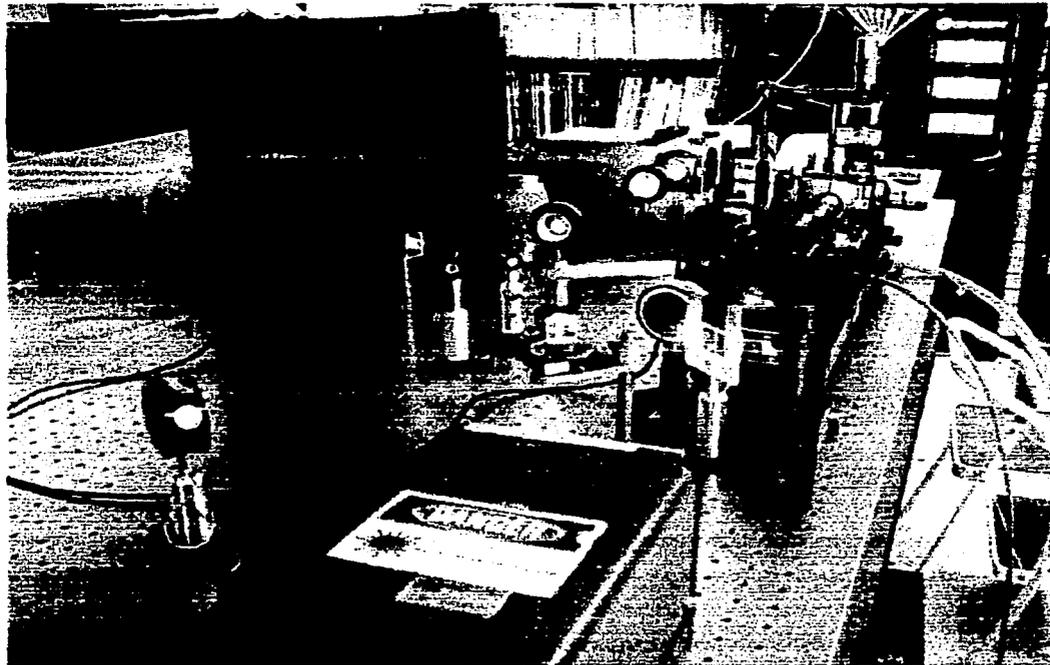


Fig. 15. Vista del arreglo óptico mostrando el láser de Argón (abajo) irradiando el láser de colorante (en medio), el arreglo óptico (lentes y prismas) y detector de potencia lumínica (izquierda).

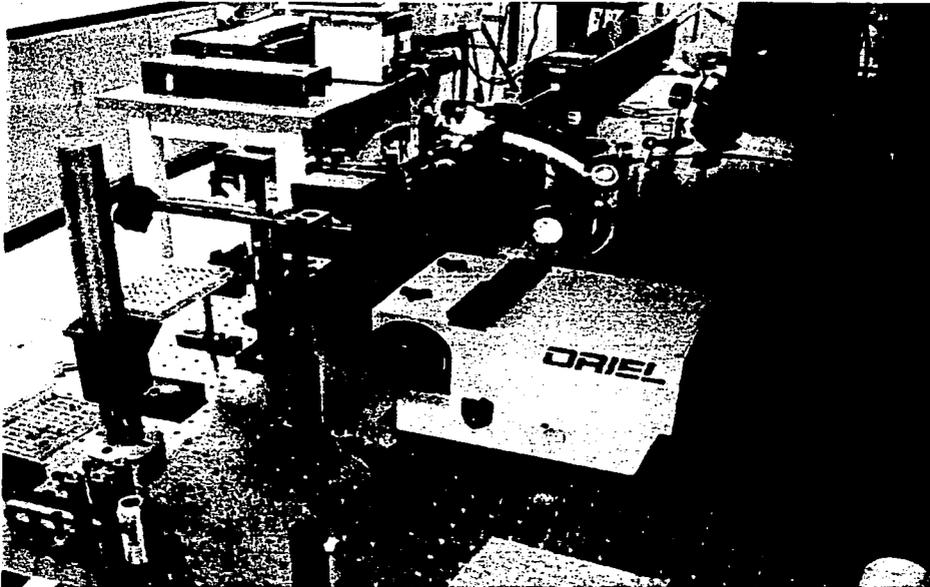


Fig. 16. Vista del arreglo óptico mostrando la colocación de las muestras sobre la platina (izquierda), el monocromador Oriel (abajo, centro), los láseres de Argón y colorante en funcionamiento (arriba) y los detectores de luz (arriba, derecha).

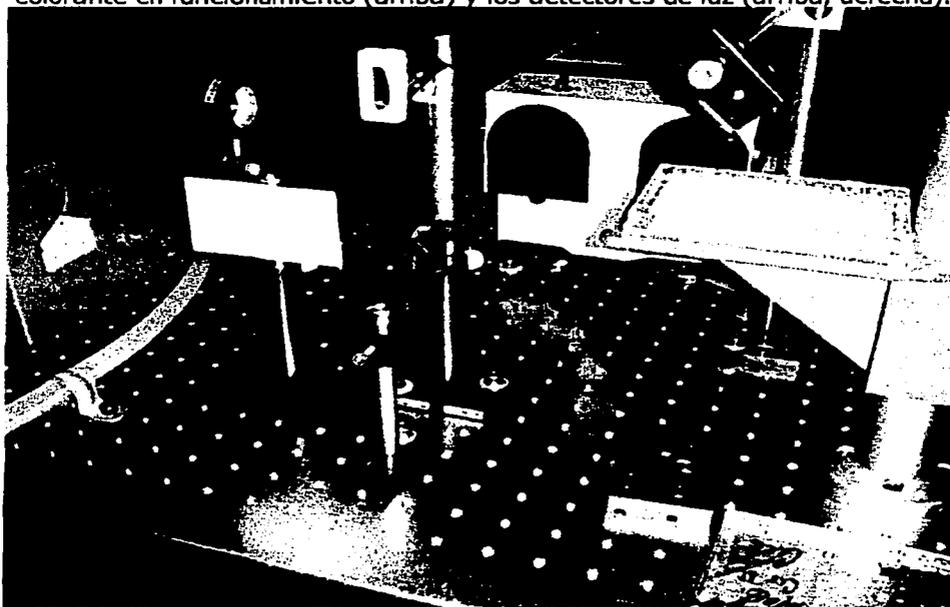


Fig. 17. Posición de las placas de cultivo sobre la platina (derecha, arriba).

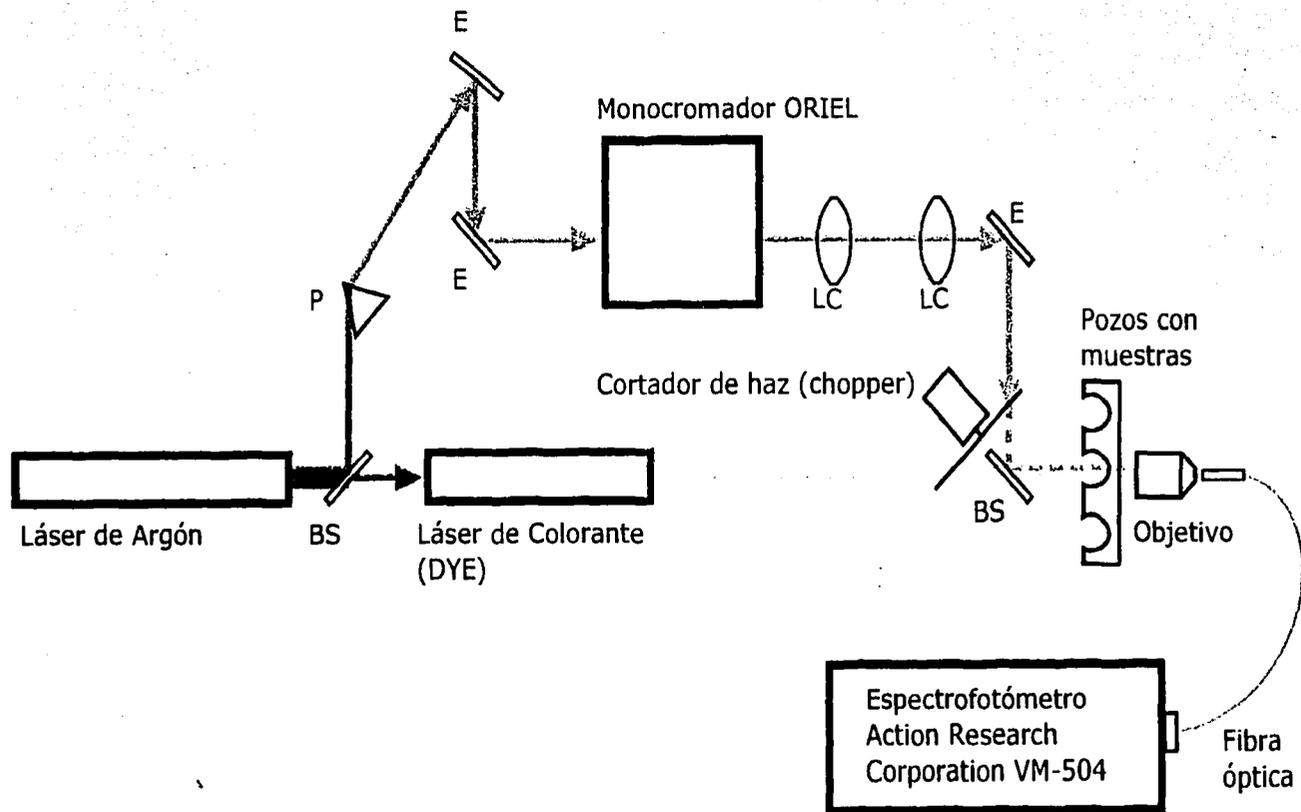


Figura No. 18. Arreglo óptico experimental empleado. BS: Divisor de Haz, P: prisma, E: espejo, LC: lente convergente.

3.6. Ensayo de inhibición e irradiación con láser.

A partir del cultivo Stock a confluencia obtenido del pase correspondiente para cada línea celular, se prepara una dilución celular de 10^6 células/mL del cual se agregará un volumen de 20 μ L a cada pozo de la microplaca para tener $2 * 10^4$ células/pozo. En los pozos donde se colocan las células ya debe haber 100 μ L del medio adicionado con SFB. En seguida se incubarán a 37° C y 5% CO₂ por 24 horas para que se recuperen de la tripsinización.

Las células se incuban durante 1 hora en presencia del fotosensibilizador (1 μ g / mL del fotosensibilizador en PBS). Pasado este tiempo, se aspira el PBS y se lava por duplicado con PBS-Albúmina. A partir de éste momento, se toma especial cuidado para que las células sean expuestas a la MENOR cantidad de luz posible. Las placas sembradas y con Fotosensibilizador se cubrían con papel aluminio y se transportaban en una hielera precalentada a 25-30° C cerrada y sin abrirse hasta la hora de exposición.

Los cultivos celulares se prepararon de acuerdo a lo expuesto en el apartado anterior. Al contacto con el Fotosensibilizador, se trató de no exponer las placas sembradas a luz de cualquier tipo. El equipo de irradiación se tenía prendido y en operación al menos 60 minutos antes de efectuar los experimentos y la óptica completamente limpia y alineada.

Las células se transportan al Laboratorio de Espectroscopia del LOA-CCADET para ser irradiadas por el arreglo óptico descrito, formado principalmente por un Láser de Argón de onda continua y un Láser de Colorante. Se irradian las células por 30 segundos teniendo el laboratorio en oscuridad, barriendo en el intervalo de emisión espectral de la Rodamina 6G de 320 a 600 nm. Se aspira el PBS-Albúmina, se substituye con SFB y se dejan incubando por 24 horas antes del ensayo de inhibición de proliferación.

Se aspira el medio y se fijan las células con 100 μ L de ácido tricloroacético al 10% durante una hora a 4°C. Se lavan 5 veces con agua y se dejan secar a temperatura ambiente. De aquí pasan a la tinción.

3.6.1. Tinción con sulforrodamina-B y lectura

Se adicionan 100 μ L de la solución de sulforrodamina-B a cada uno de los pozos con células, y se dejan en incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se lavan 4 veces con ácido acético al 1%, cuidando aspirar completamente al ácido en cada lavado. Se dejan secar a temperatura ambiente, el colorante que ha sido incorporado por las células se solubiliza con 100 μ L de Tris base 10 mM (pH 10.5) durante 5 minutos y con agitación mecánica suave. Finalmente el colorante celular se lee en un lector de microplacas a 564nm.

3.7. Determinación de la eficiencia de la Terapia Fotodinámica

Se emplearon dos líneas celulares para la determinación de la eficiencia de la Terapia Foto dinámica. Se realizaron ensayos con ambas líneas celulares no menos de 30 veces (30 pozos con la misma concentración de células y de Fotosensibilizador).

Controles positivos y negativos fueron empleados de la siguiente manera:

- Células con Fotosensibilizador sin irradiar,
- Células sin Fotosensibilizador con irradiar y
- Células sin Fotosensibilizador sin irradiar.

Estos controles fueron empleados, además de las células con la concentración de Fotosensibilizador con irradiar. Tanto a los controles como a las células muestra, se les dio el mismo tratamiento y tiempos de incubación. Con estos controles logramos probar eficientemente que la combinación de luz más el Fotosensibilizador es la causa de la muerte celular.

La emisión de luz por fluorescencia se colectó a través de la fibra óptica, y se llevo con ésta a un Espectrofotómetro Action Research Corporation (Fig. 19 y 20) VM-504, el cual obtuvo los espectros de las gráficas.

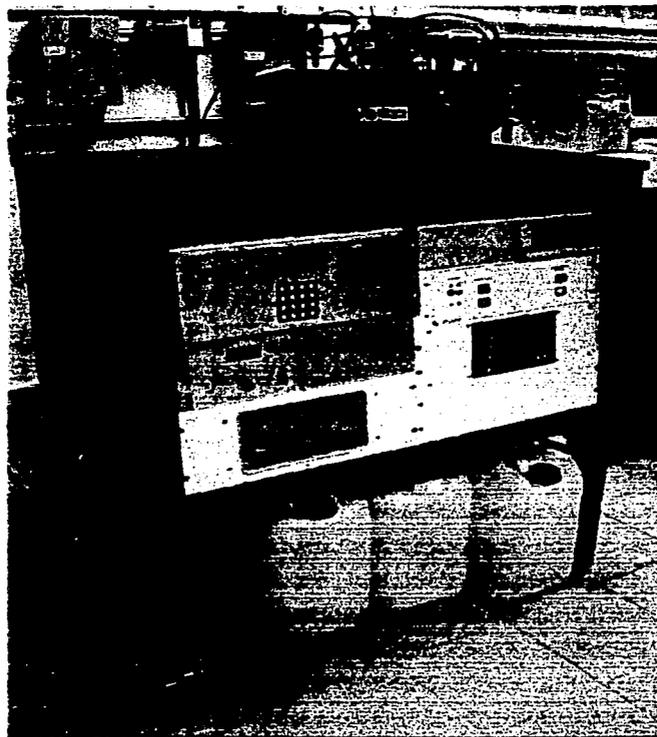


Fig. No. 19. Monocromador VM-504.

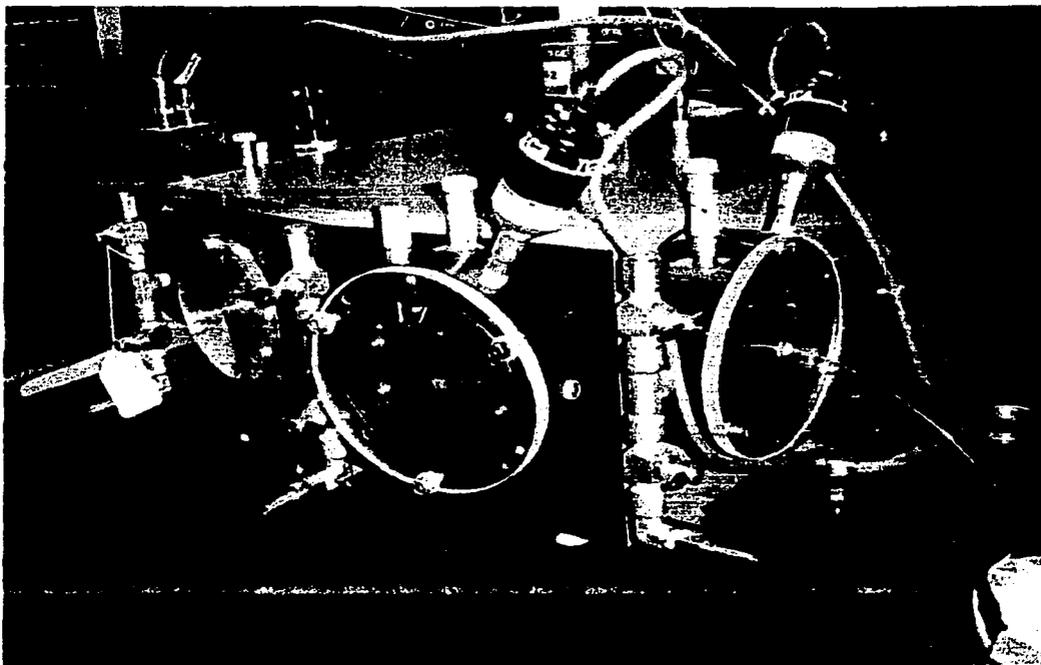
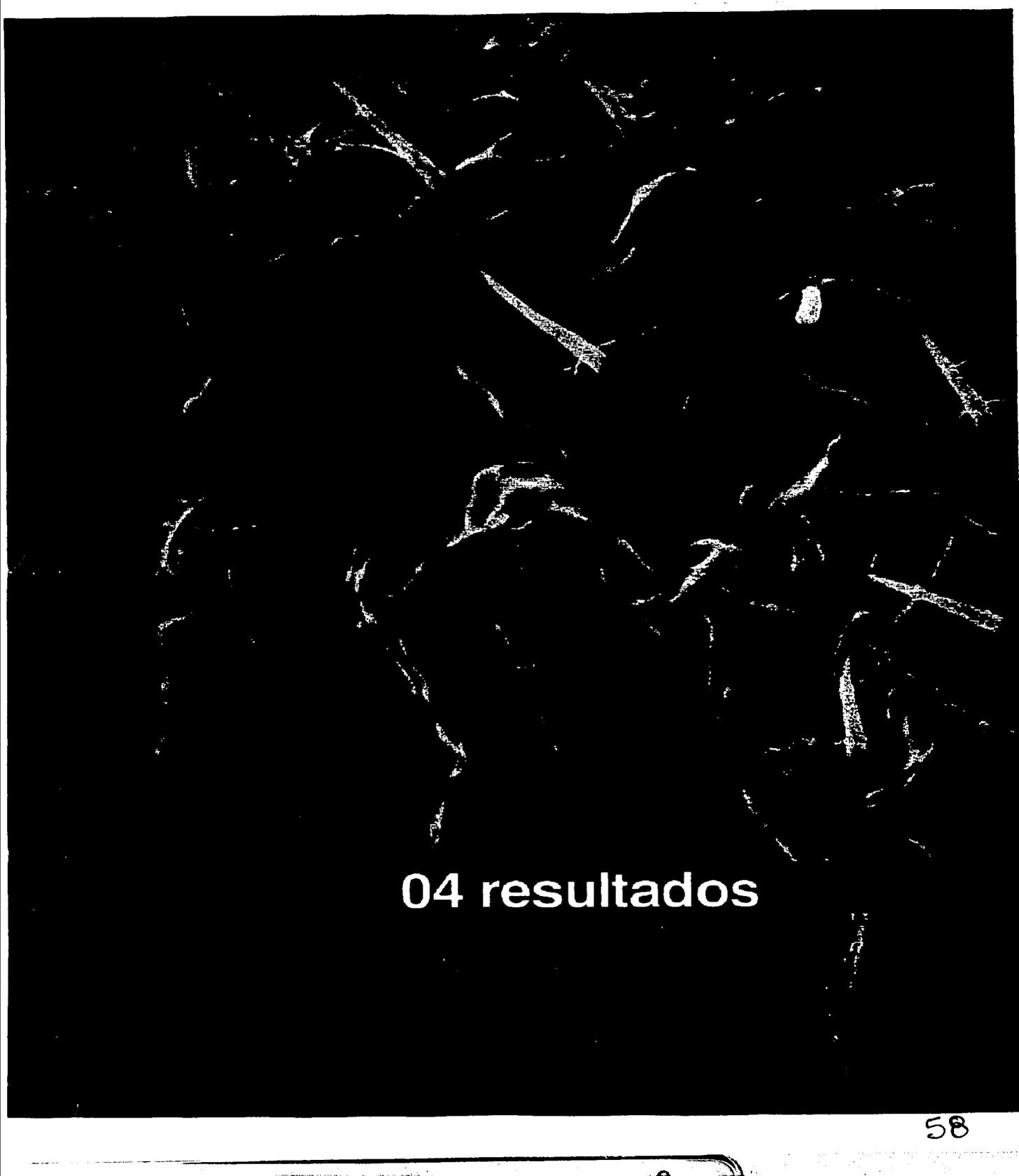


Fig. No 20. Detalle de la fibra óptica entrando al monocromador VM-504 (derecha) y detector fotomultiplicador (izquierda).

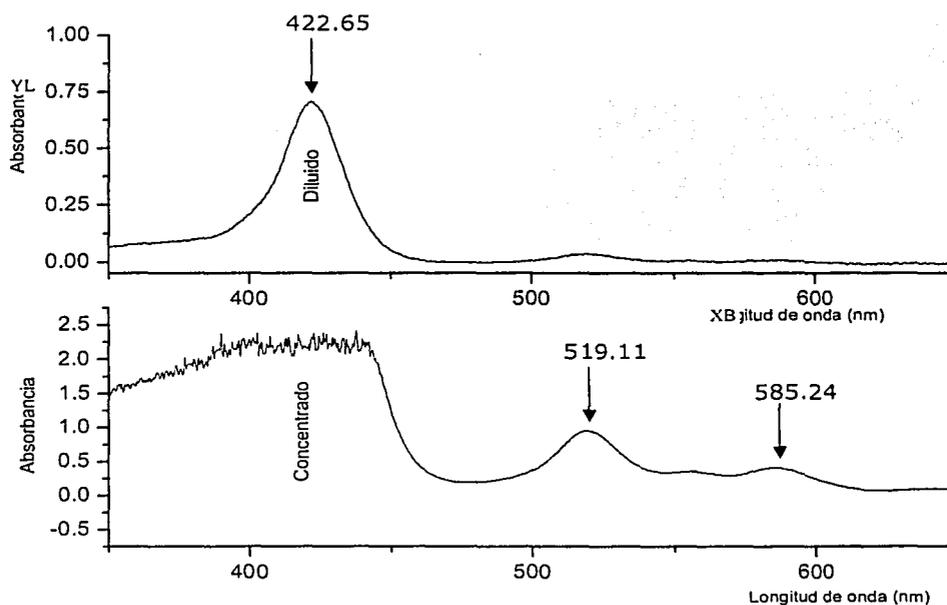


04 resultados

4. Capítulo IV Resultados

4.1. Fluorescencia del fotosensibilizador en los cultivos in-vitro del carcinoma cérvico-uterino.

Espectro de absorción del fotosensibilizador en PBS estéril (por filtración). Se utilizaron 2 concentraciones en un Espectrofotómetro Action Research Corporation VM-504: 1mg/mL y 500µg/mL; y se irradió la muestra barriendo el espectro de 310 a 650 nm. Los máximos de absorción para el Fotosensibilizador fueron de: 422.65 nm, 519.11 nm, 585.24 nm



Posteriormente se irradió el Fotosensibilizador con un fluoroscopio FLUOROMAX (Fig. 21) utilizando como base las longitudes de onda de máxima absorción captadas por el estudio anterior. Se detectarán las líneas de emisión que tiene el Fotosensibilizador empleado, esperando captar éstas mismas líneas en el estudio con las células. La "huella digital" espectroscópica proporcionada por el estudio de fluorescencia del Fotosensibilizador permitirá reconocer la presencia o ausencia de la sustancia fotosensible en las células.

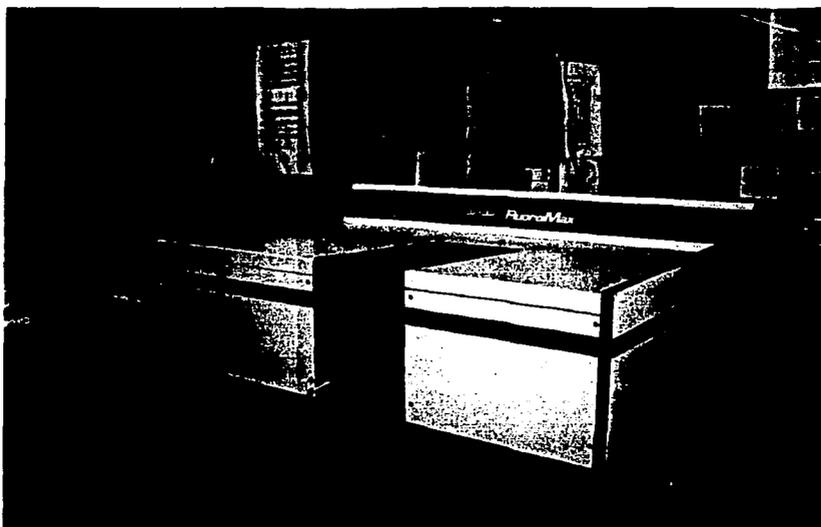


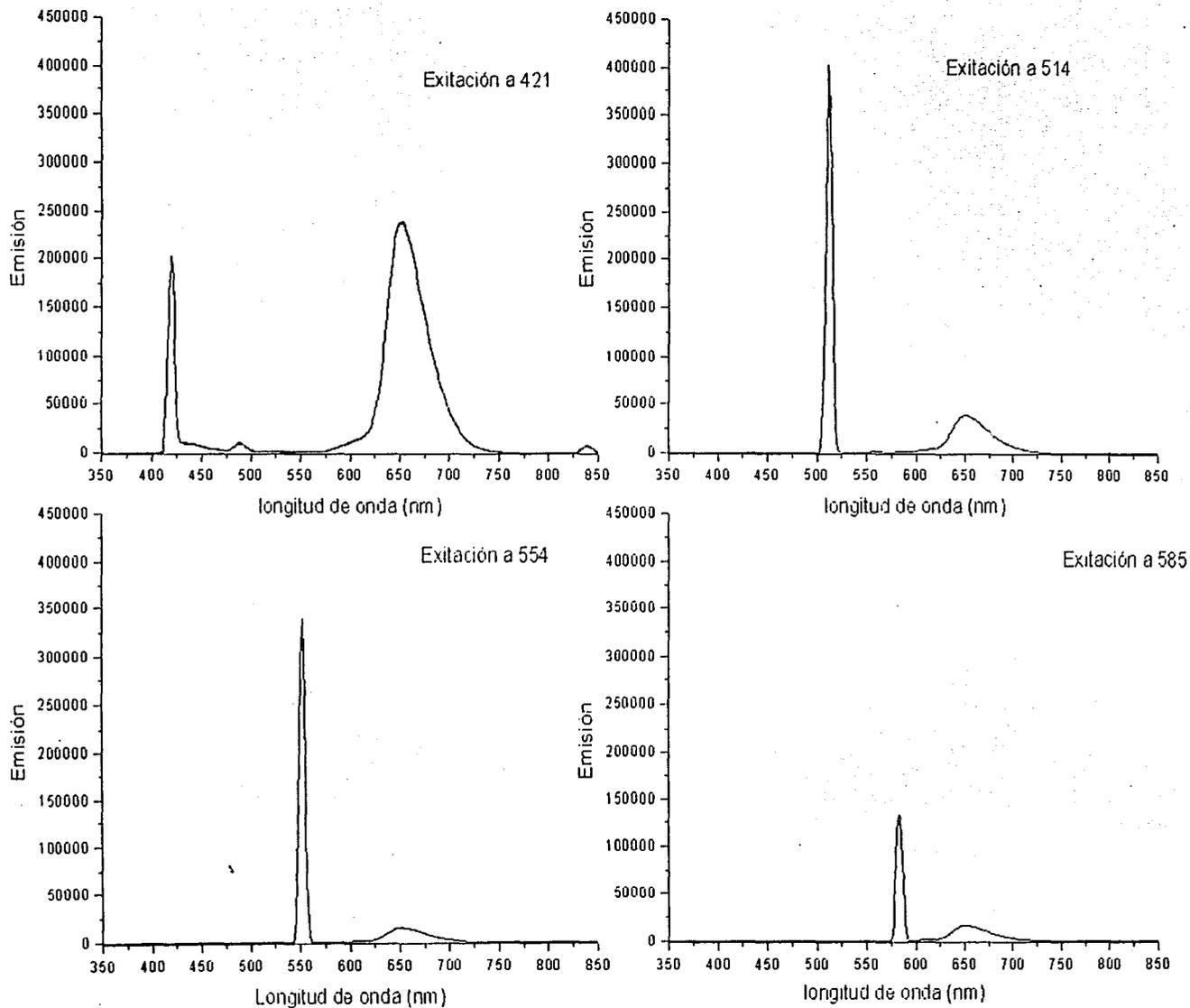
Fig. No. 21. Fluoroscopia marca FLUOROMAX

Al irradiar el Fotosensibilizador a esas longitudes se encontraron las siguientes líneas de emisión:

Irradiando a (nm):	Líneas de emisión encontradas (nm):	
421	480	653
514	512	652
554	551	653
585	582	652

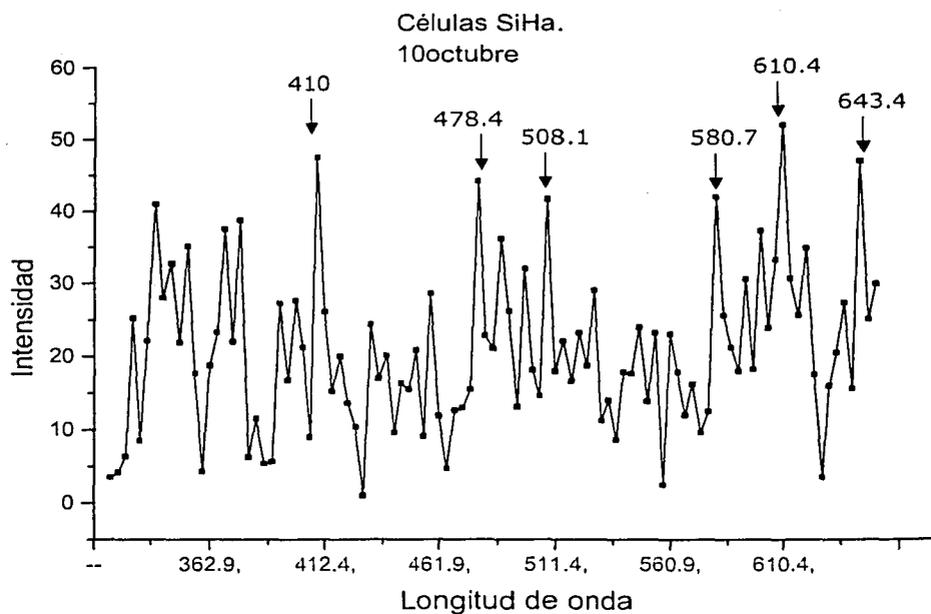
La presencia de la misma emisión a una longitud de onda de 652/653 nm es causada por el solvente, en éste caso, PBS, pues es el solvente que se utilizará a la hora de poner el Fotosensibilizador en contacto con los cultivos celulares.

Se irradiarán las muestras a las longitudes de onda encontradas en los espectros de emisión de fluorescencia, para intentar captar la emisión emitida por el Fotosensibilizador. Los resultados de emisión se resumen en la Gráfica No. 1.



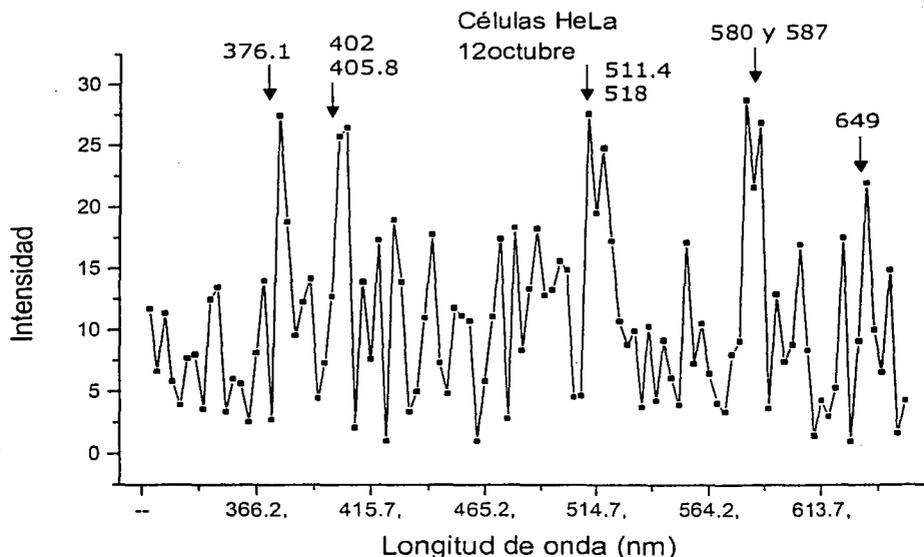
Gráfica No. 1. Espectros de emisión de fluorescencia obtenidos con el espectrofotómetro ARC-VM-504 del Fotosensibilizador empleado. Se irradió de acuerdo a las longitudes marcadas en el espectro de absorción anterior.

Línea Celular SiHa
10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Fotosensibilizador



Gráfica No. 2. Promedios de los valores obtenidos de 36 pozos sembrados con células SiHa. Se aprecian máximos de emisión en 410, 478.4, 508.1, 580.7, 610.4, 643.4 y señal de ruido.

Línea Celular HeLa
10 µg/mL de Fotosensibilizador



Gráfica No. 3. Se muestra el promedio de 48 pozos con células HeLa. Los máximos de emisión captados fueron: 376.1, 402, 405.8, 511.4, 518, 580.7, 587.3 y señal de ruido.

En cada sesión de experimentación, se obtuvieron espectros de la placa de plástico vacía y éstos se restaron para cada espectro que se realizó con cultivo celular. Estos valores se promediaron. También se restaron de cada ensayo, las líneas espectrales de los láseres usados (Se irradiaron las muestras a: 421, 514, 554 y 585 nm)

4.2 Actividad antineoplásica de la Terapia Fotodinámica

El porcentaje de sobrevida que se presentó después de realizar el estudio de Terapia Fotodinámica indica una buena actividad antineoplásica de la combinación del Fotosensibilizador y la luz láser. Las líneas celulares empleadas muestran resultados similares como se aprecia en la Tabla No. 7. Aquellas células que no fueron irradiadas ni puestas en contacto con el Fotosensibilizador son las que mayor porcentaje de sobrevida tuvieron. Las que fueron irradiadas presentaron un menor porcentaje de sobrevida a comparación de las que fueron puestas en contacto con el Fotosensibilizador. Este resultado es esperado pues el daño que produce la radiación es mayor al prácticamente nulo efecto tóxico que tiene el sensibilizador. Siento éste una sustancia nativa de una ruta metabólica, es prácticamente despreciable que la sustancia por si sola genera efectos tóxicos o dañinos a la célula. El efecto de la

combinación del Fotosensibilizador con la luz láser es en donde menor porcentaje de sobrevivida se encontró, demostrando una vez más el ya comprobado efecto de la Terapia Fotodinámica.

Línea celular HeLa				
% de sobrevivida	Control	Sensibilizador	Radiación	Sensibilizador + Radiación
100 - 80	X			
80 - 60		X		
60 - 40			X	
40 - 20				
20 - 0				X
Línea celular SiHa				
100 - 80	X			
80 - 60		X		
60 - 40			X	
40 - 20				
20 - 0				X

Tabla No. 7: Estudio de tinción con sulforrodamina-B y lectura en un lector de microplacas a 564 nm. Los resultados muestran el promedio de pozos control tomados como el 100%, el promedio de lecturas de los pozos sembrados sin Fotosensibilizador irradiados, con Fotosensibilizador sin irradiar y los pozos sembrados con Fotosensibilizador y expuestos a la luz láser

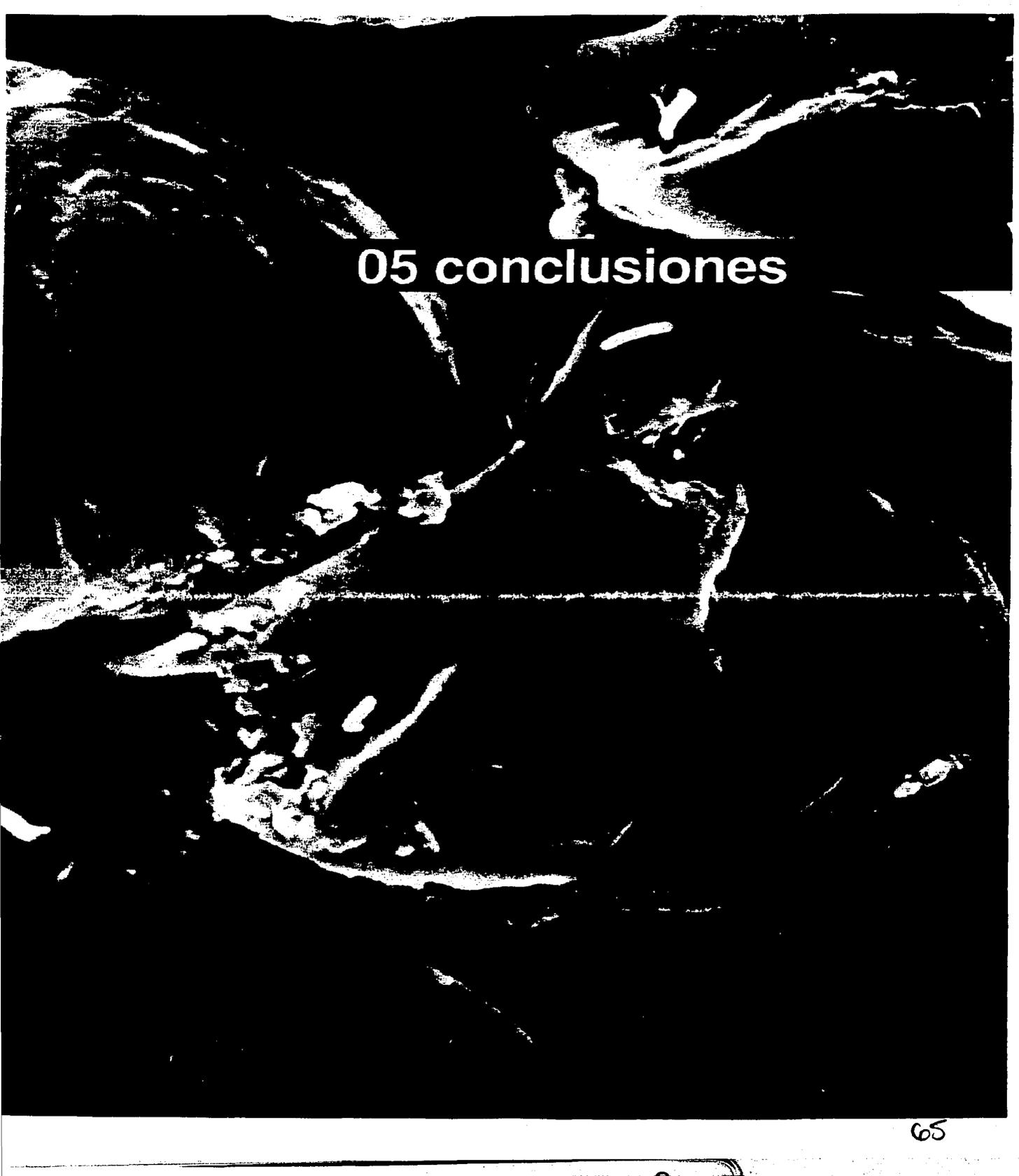
4.3 Discusión de resultados

Ambas líneas celulares mostraron una fluorescencia característica del fotosensibilizador en los espectros obtenidos:

- Línea SiHa: 410, 508 y 580 nm
- Línea HeLa: 402, 405.8, 511 y 580 nm

confirmando la presencia del Fotosensibilizador dentro de las células. Las células sin Fotosensibilizador no muestran las líneas mencionadas.

Es posible lograr una mayor detección de la fluorescencia del Fotosensibilizador al modificar el arreglo óptico tratando de captar la mayor cantidad de luz que se emite. En el arreglo que se utilizó mucha de la luz era dispersada por las mismas paredes de la placa de cultivo, pero al necesitar un ambiente estéril para las células, no era posible quitar la tapa a la placa para realizar el ensayo. Aumentando la cantidad de Fotosensibilizador crea un efecto tóxico a las células [52] por lo que incrementarla para lograr una mayor emisión no se realizó.



05 conclusiones

5. Conclusiones

Se logró realizar un método sencillo para la determinación in-vitro de la fotocitotoxicidad inducida por la Terapia Fotodinámica, con la combinación de la tinción de sulforrodamina y su posterior lectura en el lector de microplacas a 564 nm. La terapia fue efectiva con las dos líneas celulares empleadas, comprobando también que únicamente la combinación del Fotosensibilizador y la radiación adecuada matan a la célula.

El arreglo óptico explicado aquí permitió este estudio y procurando tener toda la óptica alineada y los monocromadores para perder la mínima cantidad de radiación posible (para optimizar el registro de los espectros), teniendo cuidado de que la dispersión causada por las placas de cultivo no impida que esto se lleve a cabo satisfactoriamente. Es necesario optimizar al máximo la irradiación del haz láser en la longitud de onda estimulante a las muestras y la lectura de la fluorescencia esperada, para cuantificar la fotocitotoxicidad.

La irradiación de las líneas celulares con luz láser en presencia de una sustancia fotosensible, permite que el mecanismo de fluorescencia pueda ser registrado, para una posible aplicación en Terapia Fotodinámica. La correcta interpretación de los espectros de fluorescencia producidos por el Fotosensibilizador, permiten identificar si el tejido es canceroso o no. El Fotosensibilizador se acumula preferentemente en tejido canceroso [25, 28, 53], por lo que puede llegar a considerarse como un método de detección temprana.

La técnica básica de la Terapia Fotodinámica es muy eficiente ya aquí mostrada para las líneas celulares empleadas; pues podemos observar después del estudio de actividad antineoplásica realizado, que solo aquellas células que habían sido irradiadas e incubadas con el Fotosensibilizador, presentaron un mayor índice de muerte celular lo que es un resultado original e intrigante.

El presente trabajo es de gran importancia para la expansión y conocimiento de los temas tratados, tanto para el conocimiento del Cáncer cérvico-uterino, los procesos de su cultivo in-vitro y sus mecanismos de acción, como las técnicas espectroscópicas, ópticas y analíticas involucradas. Para un futuro se deberán realizar ensayos tanto in-vitro, mejorando los sistemas ópticos manejados, como estudios in-vivo, elaborando la metodología pertinente para la realización de la Terapia Fotodinámica. Nuevas sustancias fotosensibles se pueden probar y sintetizar. Sustancias que involucren diferentes intermediarios de rutas metabólicas conocidas, como lo es el ácido δ -aminolevulínico, intermediario intra-mitocondrial de la síntesis del grupo hemo. Estudios de los diferentes mecanismos que tiene el fotosensibilizador para causar daño celular, como lo son la generación de especies reactivas de oxígeno e investigación cuantitativa de la presencia de fotosensibilizadores en células cancerosas.

Experimentación enfocada a la utilización de esta familia de fotosensibilizadores y mayor eficiencia en las mediciones de fluorescencia permitirán refinar las investigaciones en este ramo. La utilización del rayo láser en la medicina da nuevas opciones para desarrollar terapias y métodos de diagnóstico que ayuden a evitar y detectar enfermedades. El trabajo realizado en esta tesis, es de actualidad como se lee en numerosa literatura. [54]



06 anexos

Anexos

A. Preparación de soluciones

PREPARACIÓN DE PBS

Para preparar 1l de PBS:

NaCl	8.015g
KCl	0.224g
KH ₂ PO ₄	0.275g
Na ₂ HPO ₄	1.136g

Ajustar el pH a 7.4 con HCl 1N o con NaOH 1N.

Aforar a 1L con agua desionizada y esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 15 lib/in² y 12° C.

PREPARACIÓN DE PBS-EDTA

Para preparar 1L de PBS-EDTA

NaCl	8.000g
KCl	0.200g
KH ₂ PO ₄	0.240g
Na ₂ HPO ₄	1.440g
EDTA (sal disódica hidratada)	0.372g
Agua desionizada c. b. p.	1.000L

Ajustar pH a 7.4 con HCl 1N o con NaOH 1N

Esterilizar por autoclave durante 20 minutos a 15lib/in² y 121°C.

PREPARACIÓN DE PBS-ALBUMINA

Para preparar 1L de solución:

NaCl	8.000g
KCl	0.200g
KH ₂ PO ₄	0.240g
Na ₂ HPO ₄	1.440g
Albúmina	2.500g
Agua desionizada c. b. p.	1.000L

Esterilizar por filtración con membrana. Almacenar en congelación.

PREPARACIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO

Para 1L de solución

Ácido acético	10.0 mL
Agua desionizada c. b. p.	1L

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE SULFORRODAMINA-B

Para 1L de solución:

Sulforrodamina-B	4.00g
Ácido acético al 1% c. b. p.	1.00L

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TRIS-BASE

Para preparar 1L de solución:

Tris(hidroximetil)aminometano	1.2114g
Agua destilada c. b. p.	1L

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TRIPSINA AL 2.5%

Para preparar 100 mL de la solución:

Tripsina	2.50g
PBS c. b. p.	100mL

Esterilizar por filtración con membrana de 0.45 μ m. Conservar en congelación.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

B. Espectros

Cada pozo cultivado con o sin fotosensibilizador se irradió con la luz láser y la información analizada por un espectrómetro ARC VM504. Para cada línea celular cultivada se tenía un mínimo de 48 pozos irradiados. Se presentan los promedios de los datos agrupados en ocho grupos.

Cultivo Celular SiHa									
Número	λ (nm)	Intensidad (Promedio de 48 pozos agrupados en 8 grupos)							
		1	2	3	4	5	6	7	8
0,	320,	1	1	1	15	7	1	1	1
1,	323.3,	126	1	66	244	1	1	1	1
2,	326.6,	1	1	1	44	1	1	1	1
3,	329.9,	13	10	58	171	1	26	1	1
4,	333.2,	61	1	1	1	1	1	1	1
5,	336.5,	34	17	1	57	1	1	17	49
6,	339.8,	89	1	88	1	1	40	107	1
7,	343.1,	102	1	36	58	1	1	24	1
8,	346.4,	1	1	1	81	59	8	110	1
9,	349.7,	40	1	82	1	15	1	1	34
10,	353,	1	1	69	57	93	1	58	1
11,	356.3,	1	1	1	75	1	1	60	1
12,	359.6,	1	1	1	1	27	1	1	1
13,	362.9,	1	2	1	1	142	1	1	1
14,	366.2,	1	1	1	97	1	1	83	1
15,	369.5,	1	1	1	1	204	90	1	1
16,	372.8,	1	1	25	44	52	24	28	1
17,	376.1,	1	110	1	105	84	1	7	1
18,	379.4,	1	1	43	1	1	1	1	1
19,	382.7,	1	1	49	1	37	1	1	1
20,	386,	1	1	1	4	1	1	33	1
21,	389.3,	1	1	1	1	38	1	1	1
22,	392.6,	190	1	1	8	15	1	1	1
23,	395.9,	1	1	13	1	31	50	36	1
24,	399.2,	69	1	1	67	1	80	1	1
25,	402.5,	103	1	1	46	6	1	11	1
26,	405.8,	1	1	1	1	41	1	25	1
27,	409.1,	1	1	1	265	1	1	109	1
28,	412.4,	23	1	17	36	1	4	13	114
29,	415.7,	1	1	1	98	1	1	1	18
30,	419,	12	1	1	1	1	56	87	1
31,	422.3,	1	1	18	1	45	1	41	1
32,	425.6,	9	1	1	18	1	51	1	1
33,	428.9,	1	1	1	1	1	1	1	1
34,	432.2,	1	1	4	1	185	1	1	1
35,	435.5,	1	1	48	62	21	1	1	1
36,	438.8,	1	45	1	8	1	69	29	7
37,	442.1,	1	1	1	70	1	1	1	1
38,	445.4,	107	1	18	1	1	1	1	1
39,	448.7,	1	1	1	22	1	1	64	33

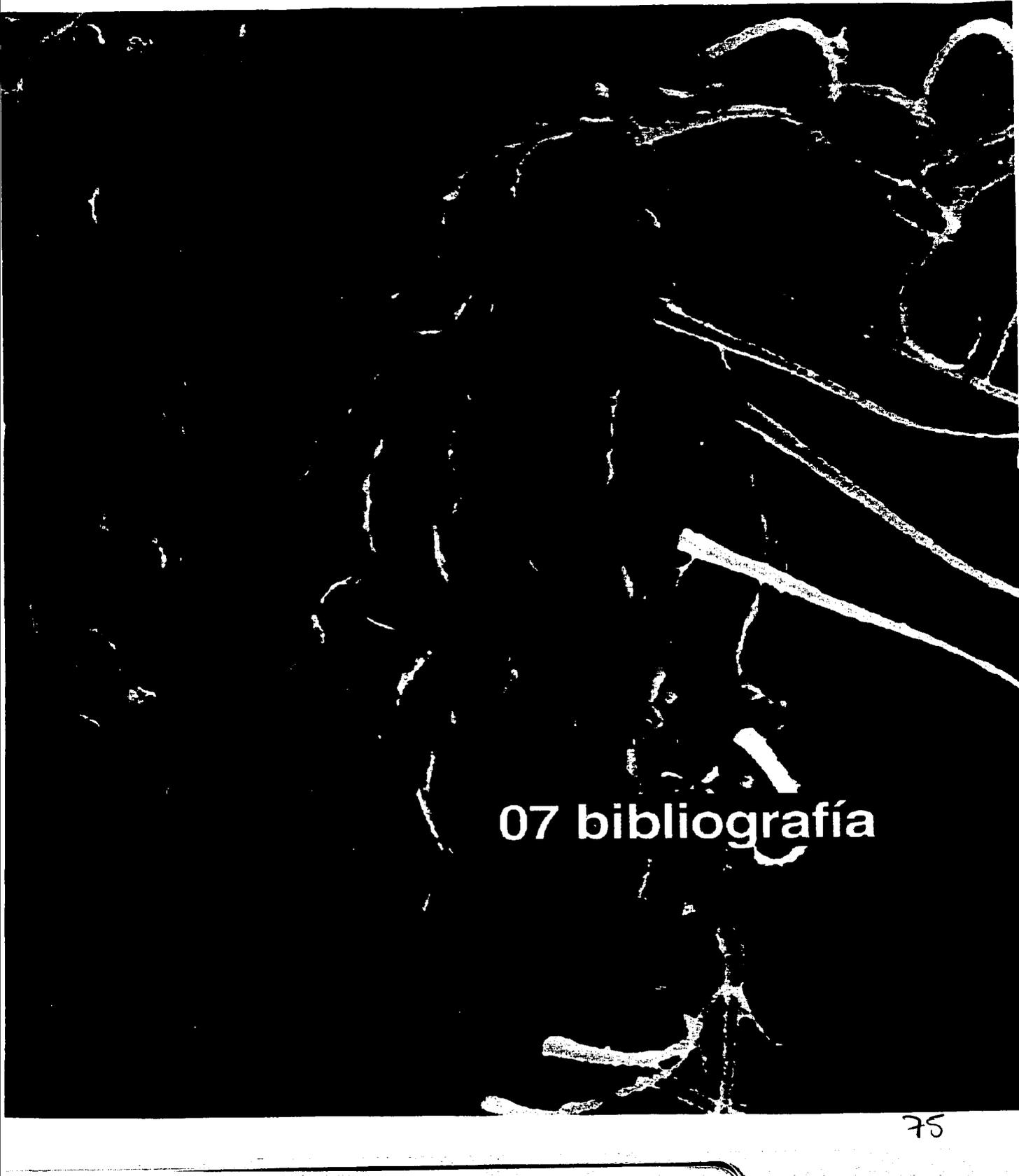
40,	452,	41	1	1	120	1	1	1	1
41,	455.3,	1	1	6	1	1	1	61	1
42,	458.6,	72	53	99	1	1	1	1	1
43,	461.9,	6	1	4	44	1	37	1	1
44,	465.2,	1	1	1	8	1	1	1	24
45,	468.5,	55	1	1	1	40	1	1	1
46,	471.8,	1	1	1	1	1	18	80	1
47,	475.1,	58	1	1	1	32	1	29	1
48,	478.4,	1	1	1	247	99	3	1	1
49,	481.7,	17	1	16	79	67	1	1	1
50,	485,	1	1	115	1	1	1	8	41
51,	488.3,	98	1	123	1	64	1	1	1
52,	491.6,	1	1	1	27	57	1	97	25
53,	494.9,	1	1	1	20	1	7	35	39
54,	498.2,	1	1	1	219	1	1	32	1
55,	501.5,	15	63	1	44	1	1	1	19
56,	504.8,	1	1	89	1	1	1	18	5
57,	508.1,	1	1	93	19	1	1	217	1
58,	511.4,	1	1	1	1	106	1	32	1
59,	514.7,	126	1	34	12	1	1	1	1
60,	518,	1	1	41	1	1	5	82	1
61,	521.3,	95	1	1	74	1	1	12	1
62,	524.6,	1	1	11	133	1	1	1	1
63,	527.9,	1	1	1	49	21	158	1	1
64,	531.2,	46	14	1	1	1	1	25	1
65,	534.5,	7	1	1	1	21	1	1	79
66,	537.8,	1	1	1	1	1	18	17	29
67,	541.1,	1	1	1	1	1	136	1	1
68,	544.4,	1	1	1	1	1	1	134	1
69,	547.7,	1	1	1	1	1	1	185	1
70,	551,	1	1	1	1	1	1	104	1
71,	554.3,	1	94	46	1	1	41	1	1
72,	557.6,	1	1	1	13	1	1	1	1
73,	560.9,	51	1	13	116	1	1	1	1
74,	564.2,	1	18	32	82	6	1	2	1
75,	567.5,	1	1	86	4	1	1	1	1
76,	570.8,	1	1	1	1	2	1	13	110
77,	574.1,	28	1	1	43	1	1	1	1
78,	577.4,	1	1	1	1	1	29	65	1
79,	580.7,	1	1	310	1	9	1	1	13
80,	584,	1	17	79	1	91	3	12	1
81,	587.3,	1	1	87	20	27	1	32	1
82,	590.6,	14	107	1	1	18	1	1	1
83,	593.9,	8	1	1	16	19	55	112	33
84,	597.2,	1	1	38	19	21	1	1	64
85,	600.5,	16	1	83	143	11	1	1	43
86,	603.8,	1	1	14	7	84	35	1	48
87,	607.1,	77	1	1	38	20	32	62	36
88,	610.4,	42	36	158	59	1	45	1	75
89,	613.7,	1	1	42	21	95	30	8	48
90,	617,	46	93	1	1	61	1	1	1

91,	620.3,	65	1	16	97	1	1	98	1
92,	623.6,	24	1	1	40	36	1	1	36
93,	626.9,	19	2	1	1	1	1	1	2
94,	630.2,	1	45	1	18	60	1	1	1
95,	633.5,	17	8	1	27	1	1	108	1
96,	636.8,	1	1	37	1	1	1	101	76
97,	640.1,	37	1	1	14	1	2	68	1
98,	643.4,	1	1	1	100	197	75	1	1
99,	646.7,	103	1	1	19	74	1	1	1
100,	650,	99	1	1	1	67	69	1	1

Cultivo Celular HeLa									
		Intensidad (Promedio de 48 pozos agrupados en 8 grupos)							
Número	λ (nm)	1	2	3	4	5	6	7	8
0,	320,	73	1	1	1	1	23	1	1
1,	323.3,	1	1	40	11	1	1	1	1
2,	326.6,	1	25	1	7	1	10	44	1
3,	329.9,	1	1	1	1	4	17	6	1
4,	333.2,	1	11	1	1	1	22	2	1
5,	336.5,	7	1	1	1	4	22	4	31
6,	339.8,	1	62	1	9	3	7	1	1
7,	343.1,	1	1	1	6	1	1	1	1
8,	346.4,	1	15	1	79	1	1	1	1
9,	349.7,	1	18	22	1	1	1	31	1
10,	353,	1	16	1	1	1	6	1	7
11,	356.3,	1	1	1	1	19	10	1	1
12,	359.6,	1	42	1	8	4	1	1	1
13,	362.9,	3	15	1	1	2	1	1	1
14,	366.2,	1	7	1	1	1	1	16	1
15,	369.5,	1	1	14	15	1	1	1	1
16,	372.8,	17	1	1	1	1	1	1	1
17,	376.1,	82	5	18	10	47	1	5	1
18,	379.4,	17	1	43	1	1	1	8	17
19,	382.7,	1	1	1	1	19	7	7	1
20,	386,	8	1	1	1	1	6	48	13
21,	389.3,	1	1	1	78	1	1	60	1
22,	392.6,	1	2	5	1	23	1	1	1
23,	395.9,	6	1	7	42	2	6	1	13
24,	399.2,	1	10	1	1	26	93	4	1
25,	402.5,	1	22	137	51	1	1	1	1
26,	405.8,	1	6	49	1	1	88	3	28
27,	409.1,	8	1	1	1	1	6	1	1
28,	412.4,	1	1	52	22	1	1	41	1
29,	415.7,	1	10	1	10	2	16	1	1
30,	419,	4	2	1	96	1	1	62	21
31,	422.3,	1	1	1	1	1	1	1	1
32,	425.6,	1	30	35	1	1	1	120	1
33,	428.9,	1	1	1	1	1	1	1	94
34,	432.2,	1	1	27	1	1	1	1	1
35,	435.5,	1	1	1	8	1	14	1	1

36,	438.8,	2	1	1	1	13	1	1	20
37,	442.1,	5	1	1	1	42	85	1	6
38,	445.4,	1	25	1	1	1	1	1	47
39,	448.7,	6	1	34	1	1	1	1	1
40,	452,	1	11	18	70	1	1	1	19
41,	455.3,	1	1	1	1	5	83	9	1
42,	458.6,	1	1	1	1	1	6	1	43
43,	461.9,	1	1	1	1	1	1	1	1
44,	465.2,	1	1	1	1	1	34	1	1
45,	468.5,	1	3	1	25	1	22	1	1
46,	471.8,	2	4	94	1	1	7	69	1
47,	475.1,	1	17	1	1	1	1	1	5
48,	478.4,	1	1	1	1	84	1	6	1
49,	481.7,	8	1	1	25	1	10	1	1
50,	485,	1	1	1	10	11	34	3	1
51,	488.3,	1	1	38	1	4	20	9	1
52,	491.6,	25	1	1	40	1	1	56	13
53,	494.9,	21	1	1	1	2	14	1	3
54,	498.2,	14	1	55	6	1	6	1	5
55,	501.5,	23	119	1	10	1	1	1	5
56,	504.8,	1	1	1	8	1	14	1	1
57,	508.1,	1	7	1	1	25	4	1	1
58,	511.4,	1	1	1	35	19	1	22	1
59,	514.7,	7	5	4	59	1	34	84	1
60,	518,	1	44	17	81	124	1	1	1
61,	521.3,	1	1	47	1	8	10	20	1
62,	524.6,	1	1	5	1	11	1	73	1
63,	527.9,	1	1	1	39	32	1	1	1
64,	531.2,	2	1	15	1	29	1	1	56
65,	534.5,	3	1	1	11	1	1	1	1
66,	537.8,	20	1	9	1	1	76	1	1
67,	541.1,	1	11	8	1	7	1	2	1
68,	544.4,	1	1	1	1	48	11	1	1
69,	547.7,	1	1	1	1	1	12	11	7
70,	551,	1	1	1	29	1	1	1	1
71,	554.3,	1	2	1	46	1	1	1	22
72,	557.6,	1	15	8	1	1	1	8	24
73,	560.9,	13	30	16	1	2	13	1	1
74,	564.2,	1	1	28	23	1	1	1	1
75,	567.5,	6	1	1	6	1	1	14	1
76,	570.8,	15	1	1	6	1	1	4	1
77,	574.1,	1	1	57	1	1	22	1	1
78,	577.4,	20	4	7	19	1	1	4	1
79,	580.7,	1	18	20	1	1	1	148	1
80,	584,	1	1	1	51	1	16	4	117
81,	587.3,	1	1	3	1	37	112	1	21
82,	590.6,	1	1	1	11	20	1	1	1
83,	593.9,	2	9	1	1	1	1	1	1
84,	597.2,	1	1	3	21	1	1	14	1
85,	600.5,	1	40	1	1	16	1	5	14
86,	603.8,	1	1	1	10	1	1	4	1

87,	607.1,	72	1	1	1	1	1	1	4
88,	610.4,	6	1	1	1	1	1	1	1
89,	613.7,	35	1	1	1	3	1	1	1
90,	617,	1	6	7	1	1	12	1	1
91,	620.3,	1	1	1	1	15	6	29	1
92,	623.6,	1	1	13	9	86	1	44	7
93,	626.9,	1	1	1	1	1	1	1	1
94,	630.2,	1	17	7	63	2	1	1	1
95,	633.5,	1	1	1	70	1	134	1	1
96,	636.8,	3	1	1	15	66	1	1	1
97,	640.1,	1	1	4	1	1	10	1	1
98,	643.4,	139	1	7	1	1	1	1	1
99,	646.7,	1	1	1	8	1	1	1	1
100,	650,	1	1	1	1	1	1	1	1



07 bibliografía

Bibliografía

1. Bonnett, R., *Chemical aspects of Photodynamic Therapy*. Primera edición ed. Advanced Chemistry Texts. 2000, Amsterdam, The Netherlands: Gordon and Breach Science Publishers.
2. Salud, S.d., *Registro Histopatológico de Neoplasias en México año 1994*. 1995.
3. Jaramillo, J., *El Cáncer, Fundamentos de Oncología*. 2da. ed. 1991: Ed. de la Universidad de Costa Rica.
4. Berenblum, I., *Cancer*. Cancer Research Today. 1997, Oxford: Oxford Press.
5. Santos, R.E., *El Cáncer*. Scientific American Books, ed. S. American. 1995, España: Prensa científica.
6. Torrella, K. and V.T. M., *Bases Genéticas del Cáncer*, ed. I.N.d. Cancerología. 1998, México.: Fondo de cultura económica.
7. Aznavoorian, S. and L.A. Liotta, *La evolución en etapas de la neoplasia invasora: desequilibrio de la regulación positiva y negativa*. Triángulo, 1993. **31**: p. 25-35.
8. Trichopoulos, D., F. Li, and D. Hunter, *What causes Cancer?*, in *Scientific American*. 1996. p. 50-55.
9. Weinberg, R., *One renegade cell*. 1998, London: Weidenfeld and Nicolson.
10. Ridley, M., *Genome: The autobiography of a species in 23 chapters*. 2000, New York: Perennial.
11. *Estadísticas de Mortalidad en México*, S.d. Salud, Editor. 2000, Dirección de Estadística, Informática y Evaluación: México D. F.
12. Institute, N.C., *Cáncer del cuello uterino*. 2001, MedNews.
13. *Estadísticas de Mortalidad en México*. 1994, Dirección de Estadística, Informática y Evaluación: México D. F.
14. Hopkins, M.P. and G.W. Morley, *A comparison of adenocarcinoma and squamous cell. Carcinoma of the cervix*. *Obstetrics & Gynecology*, 1991. **77**(6): p. 914-917.
15. Tannok, I.F. and R.P. Hill, *The Basic Science of Oncology*. 1987, New York: Pergamon Press.
16. Vita, V.d., *Principles and Practice of Oncology*, in *Cancer*. 1985, Lippincott Company: U. S. A.
17. Creasman, W.T., *New Gynecologic Cancer Stragin*. *Gynecologic Oncology*, 1995. **58**(2): p. 157-158.
18. Institute, N.C., *Gynecologic cancer*, Cancer Information section of US National Cancer Institute.
19. Souhami, R., et al., *The Oxford Textbook of Oncology*. 2001: Oxford University.
20. *Dermatology; Photodynamic Therapy with Porphyrins*.
21. Delaney, T., *Photodynamic Therapy*, in *Comprehensive textbook of oncology*. 1986. p. Chapter 72: 675-685.
22. Kelly, S., *Haematoporphyrin derivative in carcinoma of the bladder*. *Journal of Urology*, 1976. **115**: p. 150-151.
23. Thomas F. Delaney, M.D., *Photodynamic Therapy*, in *Comprehensive textbook of oncology*. 1986. p. Chapter 72: 675-685.
24. Ramón, E., et al., *Mortality of HeLa cells exposed to d-aminolevulinic acid and laser irradiation*. *Proceedings of light for life*, 1999.
25. Moan, J. and E. Boye, *Photodynamic effect on DNA and cell survival of human cells sensitized by hematoporphyrin*. *Photobiochemistry and Photobiophysics*, 1981. **2**: p. 301-307.
26. Henderson, B.W. and T.J. Dougherty, *Photodynamic Therapy - Basic Principles and Clinical Applications*. 1992, New York: Dekker.

27. Blum, H.F., *Photodynamic Action and Diseases Caused By Light*. American Chemical Society Monograph Series. Vol. 85. 1941, New York: Reinhold Publishing Corp.
28. Brown, S.G., C.J. tralau, and P.D. Coleridge-Smith, *Photodynamic therapy with porphyrin and phthalocyanine sensitisation: quantitative studies in normal rat liver*. British Journal of Cancer, 1986. **54**: p. 45-52.
29. Young, A.R., *Chromophores in Human Skin*. Physical Medical biology, 1997. **42**(1997): p. 789-802.
30. Marks, F.A., *Optical Determination of the Hemoglobin Oxygenation State of Breast Biopsies and Human Breast Cancer Xenografts in Nude Mice*. Proc. SPIE 1641, 1992: p. 227-237.
31. Barba, M.C.P., *La física en la medicina*. La ciencia desde méxico No., ed. F.d.c. económica. Vol. 37. 1987, México.
32. Ortega-Martínez, R., C.J. Román-Moreno, and A.A. Rodríguez-Rosales. *Time-resolved Spectroscopic Techniques in Laser Medicine*. in *Medical Physics*. 2000. Mérida, Yucatán, México.
33. Ortega-Martínez, R., C.J. Román-Moreno, and A.A. Rodríguez-Rosales. *Review of Applications of Medical Lasers*. in *Medical Physics*. 2000. Mérida, Yucatán, México.
34. Tuchin, V., *Tissue Optics, Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis*. 1 ed. 2000, Washington: Bellingham,.
35. Katzir, A., *Lasers and Optical Fibers in Medicine*. 1993, San Diego: Academic Press.
36. Tuchin, V., *Lasers and Fiber Optics in biomedical Science*. 1998, Saratov: Saratov University Press.
37. Tuchin, V., *Selected Papers on Tissue Optics: Applications in Medical Diagnostics and Therapy*, ed. S. Press. Vol. MS102. 1994: Bellingham.
38. Priezzhev. A. V., T.V.V., Shubochkin. L. P., *Laser Diagnostics in biology and Medicine*. 1989, Nauka, Moscow.
39. Martellucci, S. and A.N. Chester, *Laser photobiology and photomedicine*. Vol. 22. 1985, New York: Plenum Press.
40. Anderson, R.R. and J.A. Parrish, *Optical properties of Human Skin*. The science of Photomedicine. 1982, New York: Plenum Press. 147-194.
41. Priezzhev, A., V. Tuchin, and L. Shubochkin, *Laser Diagnostics in biology and Medicine*. 1989, Nauka, Moscow.
42. Tuchin, V., *Lasers Light Scattering in Biomedical Diagnostics and Therapy*. Journal of Laser Application, 1993. **5**: p. 43-60.
43. Skoog, D.A. and D.M. West, *Principles of Instrumental Analysis*. 2da ed. 1989, Saunders College: McGraw-Hill.
44. Skoog, D.A., D.M. West, and F.J. Holler, *Analytical Chemistry*. 6ta ed. 1993: Saunders College Publishing.
45. Truscott, T.G., et al., *Photochemistry*. Journal of Photochemistry and Photobiology, C., 1983. **38**(1).
46. *Cataloge of Cell Lines and hibridomas*. 7th ed. 1992: American type-Culture Collection.
47. Hecht, J. and D. Teresi, *El rayo laser*, ed. B.C. Salvat. 1990, España: Salvat Editores S. A. de C. V.
48. Aboites, V., *El laser*. La ciencia desde méxico, ed. F.d.c. económica. Vol. 105. 1991, México.
49. Müller Simone, Walt Heinrich, and D. Dobler-Girdziunaite., *Enhanced photodynamic effects using fractionated laser light*. Journal of Photochemistry and Photobiology, B., 1997. **42**: p. 67-70.

50. Yuuichi, M., U. Yukihiro, and N. Tsuyoshi, *Comparison of phototoxicity mechanism between pulsed and continuous wave irradiation in photodynamic therapy*. Journal of Photochemistry and Photobiology, B., 1999. **53**: p. 53-59.
51. Sterenberg, M. and M. van Germert, *Photodynamic therapy with pulsed light sources: a theoretical analysis*. Physical Medical biology, 1996. **41**: p. 835-849.
52. Ochsner, M., *Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours*. Journal of Photochemistry and Photobiology, B., 1996. **39**: p. 1-18.
53. Henderson, B.W., *How does photodynamic therapy work?* Journal of Photochemistry and Photobiology, B., 1992. **55**: p. 145-157.
54. Goldman, L., *Lasers in Medicine*, ed. R.W. Waynant. 2002: CRC Press Washington D. C.