



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**EFFECTO DE LA TERAPIA FOTOTÉRMICA EN UN MODELO IN VIVO APLICADA A TRAVÉS
DE MICROCALENTADORES DE FIBRA ÓPTICA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

FÍS. PIMENTEL DOMÍNGUEZ REINHER ROLANDO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ANAHÍ CHAVARRÍA KRAUSER
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. MATHIEU CHRISTIAN ANNE HAUTEFEUILLE
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ÁNGEL
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA

TUTOR INVITADO: DR. JUAN ARNALDO HERNÁNDEZ CORDERO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES, UNAM

MÉXICO, CD. MX., AGOSTO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

UNAM
POSGRADO
Ciencias Biológicas

COORDINACIÓN

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 30 de abril de 2018, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **PIMENTEL DOMÍNGUEZ REINHER ROLANDO**, con número de cuenta **304218114**, con la tesis titulada **"EFECTO DE LA TERAPIA FOTOTÉRMICA EN UN MODELO IN VIVO APLICADA A TRAVÉS DE MICROCALENTADORES DE FIBRA ÓPTICA"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ANAHÍ CHAVARRÍA KRAUSER**:

Presidente: DRA. EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE
Vocal: DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ
Secretario: DR. MATHIEU CHRISTIAN ANNE HAUTEFEUILLE
Suplente: DRA. GERTRUDIS HORTENSIA GONZÁLEZ GÓMEZ
Suplente: DRA. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 21 de junio de 2018


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



Unidad de Posgrado · Coordinación del Posgrado en Ciencias Biológicas Edificio D, 1er. Piso, Circuito de Posgrados Cd. Universitaria
Delegación Coyoacán C.P. 04510 México, D.F. Tel. 5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx>

Agradecimientos Institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme las puertas y darme la oportunidad de cursar mis estudios de doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado, sin la cual no hubiera podido realizarlos.

Al CONACyT a través del Fondo de Cooperación Internacional en Ciencia y Tecnología (FONCICYT) con número de proyecto 246648

A los proyectos PAPIIT con número IN217612, IN222215 and IT101215.

A la Dra. Anahí Chavarría Krauser por su apoyo y enseñanzas desde el inicio de este camino.

Al Dr. Juan Hernández Cordero por su gran apoyo durante tantos años.

Al Dr. Mathiue Hautefeuille por su apoyo técnico y horas de discusión desde el principio.

Al Dr. Abel Santamaría por su apoyo durante este proyecto y por abrirme las puertas de su laboratorio.

Agradecimientos a Título Personal

A Diana que me acompañó durante los momentos buenos y me alentó a seguir adelante durante los malos momentos.

A Helga e Inga que me apoyaron desde el inicio de esta travesía, por sus palabras de aliento y los chistes en cada visita.

A mis papás que siempre me ha apoyado en mi camino académico.

A Juan, Mathieu y Anahí por su gran apoyo desde el inicio.

A mis compañeros de laboratorio: Amado, Mildred, Giovani, Natanael, Sandra por esas horas de apoyo, discusión y chistes.

A Paco y Óscar por su gran apoyo técnico para implementar y desarrollar la técnica de termometría.

A Paola, Ana, Gaby, Cristina, Alejandra y Perla por gran apoyo en los diferentes laboratorios que trabajé y sus horas de paciencia al instruirme.

A la Dra. Sonia Galván por sus horas de enseñanza y apoyo.

Al Dr. Francisco Sánchez Arévalo por todo su apoyo técnico.

Al MC. Carlos Ramos, la Dra. Marel Monroy y Asael, por su gran ayuda técnica en el equipo sputtering.

Al Dr. Omar Novelo y al Fís. Josué Romero por su apoyo para obtener las imágenes de microscopía electrónica.

Al Dr. Jesús Pérez por su apoyo técnico.

Al Sr. Pedro por su apoyo técnico para obtener muestras histológicas.

A mis sinodales por el tiempo aportado y sus comentarios hechos para mejorar este trabajo.

Dedicatoria

Dedico este trabajo a todas las personas que compartieron conmigo sus risas, un café, una cerveza y/o unos buenos tacos desde el inicio de este viaje y que durante ese momento me alentaron a seguir adelante.

El tiempo que pasa uno riendo es tiempo que pasa con los dioses.

Proverbio japonés

ÍNDICE

I.	RESUMEN	1
II.	ABSTRACT	3
1.	INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES: TERAPIA FOTOTÉRMICA COMO TRATAMIENTO ALTERNATIVO EN ONCOLOGÍA	5
1.1.	CÁNCER COMO PROBLEMA MUNDIAL	6
1.2.	TRATAMIENTOS ACTUALES PARA COMBATIR LOS DIFERENTES TIPOS DE CÁNCER.....	7
1.2.1.	<i>Terapias convencionales</i>	8
1.2.2.	<i>Terapias dirigidas</i>	9
1.2.3.	<i>Tratamientos nuevos o alternativos</i>	11
1.3.	TERMOTERAPIAS	13
1.4.	EFFECTOS BIOLÓGICOS CONSECUENCIA DE LAS TERMOTERAPIAS	15
1.4.1.	<i>Estructuras celulares</i>	15
1.4.2.	<i>Muerte celular</i>	18
1.4.3.	<i>Sistema inmune</i>	19
1.4.4.	<i>Niveles de oxígeno y pH</i>	20
1.4.5.	<i>Flujo sanguíneo</i>	21
1.5.	MÉTODOS Y TÉCNICAS DE ADMINISTRACIÓN DE CALOR EN TERMOTERAPIAS	24
1.5.1.	<i>Termoterapia general</i>	24
1.5.2.	<i>Termoterapia parcial</i>	24
1.6.	TERAPIA FOTOTÉRMICA: TERMOTERAPIA LOCAL INDUCIDA CON LUZ	28
1.7.	TERAPIA FOTOTÉRMICA EN ONCOLOGÍA	30
1.7.1.	<i>Uso de nanopartículas en terapia fototérmica</i>	33
1.7.1.1.	<i>Terapia fototérmica asistida con nanopartículas de carbono</i>	35
1.7.1.2.	<i>Terapia fototérmica con nanopartículas de oro o terapia plasmónica</i>	37
1.7.2.	<i>Limitantes del uso de nanopartículas utilizadas en terapia fototérmica</i>	39
2.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS.....	47
2.1.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	48
2.2.	HIPÓTESIS.....	49
2.3.	OBJETIVOS.....	49
2.3.1.	<i>Objetivo general</i>	49
2.3.2.	<i>Objetivos particulares</i>	49
3.	MICROCALENTADORES DE FIBRA ÓPTICA COMO INDUCTORES DE TERAPIA FOTOTÉRMICA	51
3.1.	INTRODUCCIÓN	52
3.1.1.	<i>Microcalentadores de fibra óptica</i>	53
3.2.	METODOLOGÍA.....	56
3.2.1.	<i>Diseño de microcalentadores de fibra óptica para terapia fototérmica</i>	56

3.2.2.	<i>Fabricación de los microcalentadores de fibra óptica</i>	57
3.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
3.3.1.	<i>Caracterización de las películas fototérmicas en los μFO</i>	60
3.3.2.	<i>Pruebas de adhesión</i>	64
3.3.3.	<i>Pruebas cualitativas de calor</i>	65
3.3.4.	<i>Discusión</i>	66
4.	MEDICIÓN DEL CALOR GENERADO DURANTE LA ACTIVACIÓN FOTOTÉRMICA DE LOS MICROCALENTADORES DE FIBRA ÓPTICA	69
4.1.	INTRODUCCIÓN	70
4.1.1.	<i>Termometría de fluorescencia inducida por láser</i>	71
4.2.	METODOLOGÍA	73
4.2.1.	<i>Fabricación de membranas PDMS-rB</i>	73
4.2.2.	<i>Control de temperatura</i>	73
4.2.3.	<i>Sistema TLIF</i>	75
4.2.4.	<i>Calibración del sistema TLIF</i>	75
4.2.5.	<i>Medición de temperatura en μFO-Au</i>	76
4.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
4.3.1.	<i>Membranas termosensibles de PDMS-rB</i>	77
4.3.2.	<i>Curva de calibración del sistema TLIF</i>	78
4.3.3.	<i>Medición de temperatura y curva térmica característica de un μFO-Au</i>	79
4.3.4.	<i>Discusión</i>	81
5.	EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA TERAPIA FOTOTÉRMICA EN UN MODELO EX VIVO DE HÍGADO DE RATÓN	85
5.1.	INTRODUCCIÓN	86
5.2.	METODOLOGÍA	86
5.2.1.	<i>μFO</i>	86
5.2.2.	<i>Muestras de tejido</i>	86
5.2.3.	<i>Aplicación de la terapia fototérmica</i>	87
5.2.4.	<i>Evaluación del daño</i>	88
5.2.4.1.	<i>Medición del diámetro de la lesión</i>	88
5.2.4.2.	<i>Histología</i>	88
5.2.4.3.	<i>Microscopía electrónica de barrido</i>	89
5.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	89
5.3.1.	<i>Lesiones fototérmicas</i>	89
5.3.2.	<i>Histología</i>	92
5.3.3.	<i>Discusión</i>	96
6.	EFFECTO DE LA TERAPIA FOTOTÉRMICA EN UN MODELO MURINO IN VIVO APLICADA MEDIANTE μFO	103
6.1.	INTRODUCCIÓN	104
6.2.	METODOLOGÍA	104
6.2.1.	<i>μFO-Au</i>	104
6.2.2.	<i>Animales</i>	105
6.2.3.	<i>Aplicación de la terapia fototérmica</i>	105

6.2.4. Evaluación del daño	107
6.2.4.1. Histología	107
6.2.4.2. Medición de caspasa-3 activada	107
6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	108
6.3.1. μ FO-Au	108
6.3.2. Lesiones fototérmicas.....	108
6.3.3. Histología.....	111
6.3.4. Ensayo ELISA para caspasa-3 activada	115
6.3.5. Discusión	117
CONCLUSIONES.....	125
APÉNDICES.....	131
1. SISTEMAS COMERCIALES DE TERAPIA FOTOTÉRMICA INTRACRANEAL	131
2. TERMOMETRÍA DE FLUORESCENCIA INDUCIDA POR LÁSER	137
ANEXOS.....	143
1. ARTÍCULO DE REQUISITO	143
LITERATURA CITADA	155

Resumen

Hoy día, los diferentes tipos de cáncer se han convertido en una de las principales causas de muerte a nivel mundial, y el número de personas que fallecerán por esta causa aumentará drásticamente en los siguientes años. La radioterapia, quimioterapia y la cirugía siguen siendo los tratamientos más utilizados para luchar contra esta enfermedad; no obstante, en los últimos años han aparecido nuevas alternativas para combatirlo, buscando reducir los efectos secundarios de las terapias convencionales y haciendo más eficiente la destrucción de los tumores, mejorando la supervivencia del paciente y su calidad de vida.

Una herramienta alternativa para la destrucción del cáncer que ha cobrado interés en los últimos años es el uso terapéutico del calor. El calor puede inducir varios efectos fisiológicos provocando la muerte celular, que se refleja en la disminución o destrucción de un tumor. Diversas técnicas han surgido para generar calor y destruir células cancerosas, pero el problema principal de éstas es que no son selectivas, destruyendo también células sanas alrededor del tumor, provocando daño colateral. La luz representa una opción muy atractiva para resolver este problema, ya que la luz láser permite calentar un tejido de forma muy precisa, provocando daño altamente localizado. Este tipo de tratamiento anticáncer se conoce como terapia fototérmica. Habitualmente, se recurre al uso de fibras ópticas para aplicarla, debido a su gran flexibilidad y tamaño, permitiendo llevar la luz a lugares de difícil acceso logrando tratar tumores inoperables o alojados profundamente mediante el uso de técnicas mínimamente invasivas.

Diversos nanomateriales han mejorado la producción de calor en terapia fototérmica, pronosticando resultados alentadores para el tratamiento de tumores. Actualmente, las nanopartículas de oro son las más utilizadas en esta terapia debido a su biocompatibilidad y su gran eficiencia fototérmica. En general, para calentar un tumor mediante nanopartículas, éstas deben ser inyectadas previamente en el sitio de interés para su posterior irradiación. Recientemente, se ha reportado el uso de dispositivos de fibra óptica que utilizan nanopartículas capaces de generar calor altamente localizado, a estos dispositivos se les conoce como microcalentadores de fibra óptica.

En este trabajo se evaluó el efecto de la terapia fototérmica mediante microcalentadores de fibra óptica basados en nanopartículas aplicada en tejido de ratón. La terapia aplicada de esta manera permitió controlar la temperatura del tratamiento, provocar daño localizado en el tejido de interés y también permitió el uso de nanopartículas sin necesidad de inyecciones. El proyecto se dividió en tres etapas: la evaluación de

diferentes nanopartículas para obtener un microcalentador de fibra óptica óptimo para terapia fototérmica, la caracterización del calor generado en estos dispositivos para su aplicación controlada y la evaluación biológica del daño inducido mediante terapia fototérmica localizada.

En la primera etapa se evaluaron distintos nanomateriales, encontrando que nanopelículas de oro fueron la mejor opción para inducir la terapia fototérmica. En una segunda etapa, se midió y visualizó la temperatura generada en estos microcalentadores utilizando termometría de fluorescencia inducida por láser. La técnica mencionada permitió establecer una relación entre la temperatura generada y la potencia de la luz láser empleada para la terapia.

El efecto de la terapia fototérmica se evaluó en ratones. Inicialmente, se hicieron pruebas preliminares *ex vivo* en hígado, estudiando el daño de la lesión térmica a través de cortes histológicos con una tinción de H&E e imágenes obtenidas con microscopio electrónico de barrido. Los resultados mostraron que los microcalentadores fueron capaces de provocar lesiones térmicas en el tejido y que el daño tisular fue local. Finalmente, se evaluó el daño provocado por la terapia fototérmica en un modelo *in vivo* de cerebro, para dos temperaturas diferentes (45 y 60 °C). Las lesiones fueron examinadas a través de una tinción H&E y también se midió la molécula caspasa-3 activada asociada a muerte apoptótica mediante un ensayo de ELISA tipo sándwich. En esta parte del estudio se observaron células muertas en la vecindad de las lesiones y el ensayo ELISA mostró una mayor cantidad de células apoptóticas para el tejido dañado con la terapia fototérmica que para el tejido control.

La terapia fototérmica aplicada mediante microcalentadores de fibra óptica con nanopelículas de oro permitió generar lesiones térmicas minúsculas (<1 mm) en tejido de ratón sin necesidad de inyectar nanopartículas previamente. Las lesiones provocadas mostraron muerte celular en una pequeña área poco extendida alrededor de la lesión. Además, este tipo de terapia permitió controlar el tamaño de la lesión variando la temperatura de los microcalentadores. La evidencia obtenida señala que controlando el rango de temperaturas puede ser posible modular la muerte celular entre apoptosis y necrosis.

Abstract

Nowadays, cancer is one of the main causes of death in the world, and the number of people who will die because of this will increase drastically in the following years. Radiotherapy, chemotherapy and surgery are still the most used treatments against this disease; however, in recent years new alternatives have emerged aiming at reducing the secondary effects of traditional therapies and to enhance the destruction of tumors, improving patient survival and their quality of life.

An alternative tool for cancer treatments that emerged in recent years is the therapeutic use of heat. Heat can induce different physiological effects provoking death cell and decreasing the size of a tumor or causing its destruction. There are several techniques for heat generation aiming at destroying cancer cells, but the main problem with these techniques is that they are not selective destroying healthy cells in the surroundings of the tumor and thus provoke collateral damage. Light represents a very attractive option for solving this problem because laser light allows for heating tissue with high precision, thereby causing highly localized damage. This type of anticancer treatment is known as photothermal therapy. Habitually, this therapy is applied using optical fibers due to their flexibility and small size, transporting the light to intricate sites for treating either inoperable or deep-seated tumors in a minimally invasive way.

Several nanomaterials have enhanced heat production for photothermal therapy showing good results for the treatments of tumor. Today, gold nanoparticles are the most widely used nanomaterials used in this therapy because of their biocompatibility and their high photothermal efficiency. In general, to heat a tumor using nanoparticles, these have to be previously injected in the tissue target for subsequent irradiation. Recently, it has been reported the use of optical fiber devices that use nanoparticles capable to generate heat, these devices are known as optical fiber microheaters.

In this work, the effect of photothermal therapy applied through optical fiber microheaters was evaluated in mouse tissue. The therapy applied in this manner allowed to control the temperature of the treatment, generate localized damage in the target tissue using nanoparticles without to need of injections. This study was divided in three stages: evaluation of several nanoparticles to obtain an optimal optical fiber microheater for photothermal therapy, characterization of heat generated by these devices for their controlled application and biological evaluation of the damage induced by photothermal therapy.

In the first stage, different nanomaterials were evaluated and we concluded that gold nanofilms were the best option to induce photothermal therapy. In the second stage, the temperature generated by the microheaters was measured and mapped using laser induced-fluorescence thermometry. This technique allowed determining a relation between the temperature attainable with the microheaters and the laser power used in the therapy.

The biological effect of the photothermal therapy was evaluated in a mouse model. Firstly, a preliminary test was performed in liver tissue (*ex vivo*). Lesions were studied through histology cuts with a H&E stain and images obtained with scanning electron microscopy. The results showed that the microheaters were able to provoke thermal lesions in the tissue and the damage was local and small. Finally, the photothermal therapy was evaluated in brain tissue (*in vivo*) for two temperatures (45 and 60 °C). Lesions were studied through a H&E stain and the molecule activated caspase-3 was measured using a sandwiched ELISA assay; caspase-3 is associated to apoptosis death. The results showed dead cells in the vicinity of the lesions induced with the microheaters, while the ELISA assay showed higher amount of apoptotic cells for damaged tissue with the photothermal therapy than for control tissue.

Photothermal therapy applied through optical fiber microheaters with gold nanofilms allowed to generate local thermal lesions (< 1 mm) in mouse tissue without the need to inject nanoparticles previously. The resulting lesions obtained showed cell death in a small area, not widespread around these. In addition, this type of therapy allows controlling the size of the lesion upon varying the microheater temperature. The results further provide evidence that upon controlling the temperature range of the microheaters can lead to modulate the cell death between apoptosis and necrosis.

Introducción y antecedentes:

Terapia fototérmica como tratamiento alternativo en oncología

"Aquellas enfermedades que no pueden ser curadas por la medicina pueden curarse por la cirugía. Las que no pueden curarse mediante cirugía pueden ser curadas por el fuego (calor). Las que no se pueden curar por el fuego, son de hecho incurables"

Hipócrates (460 a.c.-370 a.c.)

1.1 Cáncer como problema mundial

Los diferentes tipos de cáncer se ha convertido en una de las principales enfermedades que afecta a la humanidad. Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) señalan que los diferentes tipos de cáncer son la segunda causa de muerte a nivel global [1]. El último reporte sobre los tipos de cáncer y sus estadísticas a nivel mundial, presentado por la OMS a través de la red GLOBOCAN, reveló que en el 2012 el número de defunciones por causa de algún tipo de cáncer fue de 8.2 millones de personas. En ese mismo año se diagnosticaron 14.1 millones de casos nuevos y 32.6 millones de personas vivían con algún tipo de cáncer [2]. Aunque esta cifra es alarmante, lo que realmente preocupa es que cada año aumenta el número de personas que mueren por esta causa. Las cifras más recientes mencionan que el número de muertes por algún tipo de cáncer ascendió a 8.8 millones de personas en 2015 y la OMS estima que la mortalidad por cáncer aumentará un 70% entre 2015 y 2035, es decir, casi 15 millones de personas perderán la vida debido a algún tipo de cáncer en el 2035 [1,2]. En México, el panorama no es tan diferente, pues los diferentes tipos de cáncer ya se han convertido en la tercera causa de muerte y se estima que 80,000 personas fallecieron por esta patología en 2015 [3].

El cáncer es un término genérico que designa a un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo [1]. La característica principal de esta enfermedad es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales. Las células de un organismo sano se dividen sólo cuando es necesario remplazar células viejas o dañadas y/o para reparar alguna lesión del cuerpo (homeostasis¹). Sin embargo, las células cancerosas se dividen sin control, ya que han desarrollado mecanismos que evaden los inhibidores naturales de crecimiento celular, así como los de muerte celular por apoptosis [4-6]. La acumulación de células cancerosas a menudo forma una masa o tejido, llamado tumor, que puede invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos en puntos distantes del organismo provocando metástasis.

Como esta patología puede afectar cualquier tipo celular, el resultado es que existen muchos tipos diferentes de cáncer, más de un centenar [4], siendo esto una de las principales desventajas para tratar y curar esta enfermedad. A nivel mundial, los cánceres de pulmón, hígado, estómago, colon y mama son los que provocan más fallecimientos cada año [1]. Sin embargo, existen otros tipos de cánceres muy agresivos los cuales deterioran la vida del paciente de forma más rápida y grave como los cánceres del sistema nervioso, siendo los tumores cerebrales los más malignos y fatales [7].

¹ Equilibrio entre el número de células nuevas y células muertas en un organismo.

1.2. Tratamientos actuales para combatir los diferentes tipos de cáncer

La OMS señala que " entre el 30 y el 50% de los cánceres se pueden evitar. Para ello, es necesario reducir los factores de riesgo y aplicar estrategias preventivas de base científica. La prevención abarca también la detección precoz de la enfermedad y el tratamiento de los pacientes. Si se detectan a tiempo y se tratan adecuadamente, las posibilidades de recuperación para muchos tipos de cáncer son excelentes" [1]. Sin embargo, detectar los cánceres, sobre todo en etapas tempranas, es complicado y costoso con la tecnología disponible hoy en día. Más aún, la mayoría de los pacientes son diagnosticados en etapas avanzadas, ya que hasta el momento en que éstos presentan algún tipo de sintomatología acuden al médico, y en estas etapas los cánceres pueden ser más agresivos dificultando su tratamiento.

Una vez diagnosticado el tipo de cáncer, su tratamiento requiere de una selección cuidadosa de una o más terapias oncológicas. El objetivo final de una terapia anticáncer radica en destruir a las células cancerosas en su totalidad; sin embargo, no es posible en todos los casos. De manera que, una terapia oncológica también busca limitar la diseminación del tumor o reducir su tamaño, y con ello prolongar de forma considerable la supervivencia del paciente y mejorar su calidad de vida.

Para que un tratamiento oncológico sea exitoso es necesario tomar en cuenta diversos factores del paciente como su edad, sexo, síntomas, estado de salud general, entre otros. Además, se deben considerar las características del tumor como su localización, grado de diferenciación histológica, su agresividad y la presencia de metástasis. También, se deben considerar los efectos secundarios de la terapia suministrada; y por último deben considerarse ciertos factores institucionales como accesibilidad, equipo, y la capacitación del personal para otorgar un diagnóstico, tratamiento y seguimiento adecuados [8].

Hoy en día, existen diversas terapias contra los diferentes tipos de cáncer las cuales se pueden agrupar de forma general en terapias químicas, físicas y biológicas, dependiendo del agente terapéutico que se utilice, ver figura 1. Las terapias más usuales son la quimioterapia, radioterapia y la cirugía; la mayoría de los pacientes son tratados con alguna de ellas. Sin embargo, actualmente existen otros tratamientos que han sido aprobados por organismos de salud mundial, los cuales se están empezando a utilizar y representan una alternativa ante los métodos convencionales, estas terapias son conocidas como *terapias dirigidas*. Por otra parte, también han surgido tratamientos que representan nuevas opciones ante estos métodos y sus posibles efectos secundarios. Esta nueva generación de terapias busca reducir o evitar los efectos secundarios de las terapias convencionales, sin descuidar su efectividad para atacar la enfermedad. Además, dependiendo del grado de diseminación del cáncer se busca tener terapias localizadas para tumores primarios (terapias físicas) y terapias que actúen en diversos puntos del cuerpo como en tumores

secundarios o metástasis (terapias biológicas y químicas). A continuación, se presentan algunas de estas terapias y sus generalidades haciendo hincapié en sus efectos secundarios. Las distintas terapias y sus efectos adversos pueden consultarse más a detalle en las referencias [9-15].

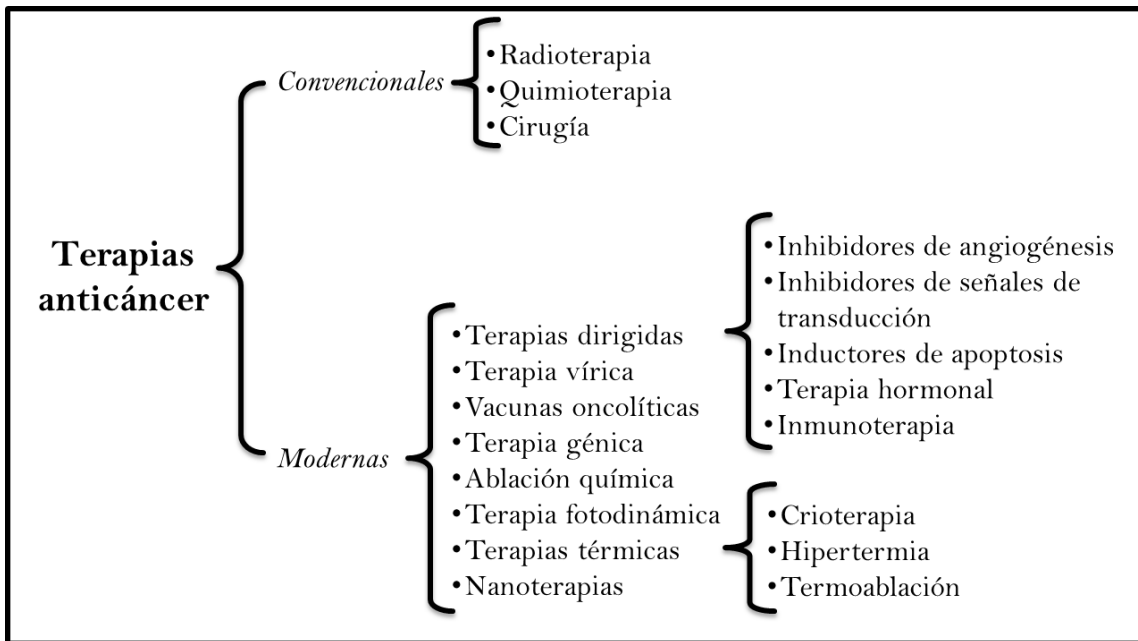


Figura 1. Métodos actuales para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. Las terapias pueden ser físicas, químicas o biológicas, dependiendo del agente terapéutico utilizado. Algunos de estas terapias siguen en fase experimental clínica.

1.2.1. Terapias convencionales:

- ▶ **Cirugía:** Consiste en la extirpación total o parcial del tumor, dependiendo de su localización, tipo y tamaño, así como su diseminación. En algunos casos se recurre a extirpar tejido sano adyacente al tumor para disminuir el riesgo de recurrencia. Sus efectos secundarios dependen de varios factores yendo desde molestias y dolor en la zona tratada, tiempo de recuperación prolongado hasta la pérdida parcial o total de un órgano [9-11].
- ▶ **Quimioterapia:** Es el uso de fármacos para destruir las células cancerosas. La quimioterapia se utiliza para curar un tipo de cáncer, controlar su diseminación, reducir el tamaño de un tumor o su tasa de crecimiento, además de mejorar o disminuir la sintomatología del paciente. Los fármacos anticáncer utilizados detienen o retrasan el crecimiento de las células cancerosas por sus efectos citotóxicos; sin embargo, estos

medicamentos no son específicos y también afectan a las células sanas que crecen y se dividen rápidamente, como por ejemplo, algunas células del interior de la boca, células de los intestinos, células que hacen crecer el pelo y las de la médula ósea (que producen las células de la sangre). El daño a las células sanas causa efectos secundarios como fatiga, náuseas, vómitos, anemia, pérdida del apetito, diarrea, debilidad, pérdida del cabello, lesiones en la boca, dolor, hemorragias anormales, problemas gastrointestinales, dolor al orinar, entre otros. Asimismo, la pérdida de glóbulos blancos durante la quimioterapia hace que el paciente sea vulnerable ante infecciones. En ocasiones los efectos secundarios son permanentes pudiendo causar daño al corazón, los pulmones, los nervios, los riñones u órganos reproductores [9-11].

- ▶ **Radioterapia:** La radioterapia hace referencia al uso de energía ionizante (rayos X o rayos γ) para lesionar y destruir las células cancerosas o reducir el tamaño de los tumores. Esta energía proviene de procesos radiactivos (de ahí su nombre). Estos rayos radiactivos son tan energéticos que dañan el material genético de las células impidiéndoles que crezcan y se dividan. El objetivo de la radioterapia es destruir el mayor número posible de células cancerosas y limitar el daño que sufre el tejido sano adyacente; sin embargo, el principal inconveniente de esta terapia es que no es específica y daña tanto a las células cancerosas como las sanas, causando efectos secundarios. Hay distintos tipos de radiación y modos de administrarla. La radiación puede provenir de una maquina colocada fuera del cuerpo (radiación externa), puede colocarse dentro del cuerpo (radiación interna o braquiterapia) o pueden usarse materiales radiactivos no sellados que viajan por el cuerpo (radioterapia sistémica). La mayoría de las personas reciben radiación externa. La radioterapia interna usa fuentes de radiación selladas en un portador llamado implante y se inserta directamente en el cuerpo muy cerca del tumor o dentro del mismo; pueden ser alambres, tubos de plástico, cápsulas o semillas. La radioterapia sistémica usa materiales radiactivos, como el yodo 131 y el estroncio 89, que pueden administrarse de vía oral o inyectarse en el cuerpo. El daño a las células sanas causa efectos secundarios como fatiga, náuseas, vómitos, pérdida del cabello, lesiones en la boca y garganta, problemas gastrointestinales, úlceras estomacales, enrojecimiento y daño en la piel o infertilidad. También puede causar la pérdida de glóbulos blancos provocando inmunodeficiencia, haciendo a los pacientes susceptibles a infecciones y promoviendo su lenta recuperación [9-11].

1.2.2. Terapias dirigidas

Las terapias dirigidas hacen referencia a los tratamientos en los que se utilizan sustancias o fármacos que interfieren en moléculas específicas (blancos moleculares) que participan en la supervivencia, el crecimiento y la diseminación de las células cancerosas. La diferencia principal de este tipo de terapias, con respecto a la quimioterapia, es que en esta última los fármacos tradicionales actúan contra toda la célula, en cambio las terapias

dirigidas buscan marcadores específicos de los cánceres (proteínas o genes) en los cuales actuar [9-11]. En general, la mayoría de las terapias dirigidas utilizan moléculas pequeñas o anticuerpos monoclonales². Las moléculas pequeñas actúan dentro de la célula, mientras que los anticuerpos son demasiado grandes para entrar a ella y actúan en blancos superficiales o fuera de ella. Algunas de las terapias dirigidas se enlistan a continuación:

- ▶ **Inhibidores de transducción de señales:** bloquean la actividad de moléculas participantes en la transducción de señales, interrumpiendo la ruta de señalización, y como consecuencia interfiriendo en el crecimiento de un tumor.
- ▶ **Inductores de apoptosis:** las células cancerosas han desarrollado estrategias que evitan la apoptosis. Los inductores de la apoptosis evaden estas estrategias para causar la muerte de las células cancerosas.
- ▶ **Inhibidores de la angiogénesis:** para que los tumores crezcan rápidamente, éstos desarrollan vasos sanguíneos nuevos (angiogénesis) que le suministran de nutrientes y oxígeno. Con este tipo de inhibidores se busca bloquear la formación de vasos sanguíneos nuevos y disminuir o detener el crecimiento de los tumores.
- ▶ **Terapia hormonal:** el blanco de este tratamiento son las hormonas producidas por el cuerpo que participan en el crecimiento de las células cancerosas. Se busca inhibir o interferir la acción de estas hormonas para detener el crecimiento de los tumores.
- ▶ **Inmunoterapia:** tratamiento que ayuda a estimular o potenciar al sistema inmune y con ello destruir a las células cancerosas. Algunos de éstas contraatacan las señales inmunosupresoras producidas por las células cancerosas y otras ayudan a fortalecer el sistema inmune para que funcione mejor. Un tipo de inmunoterapia utiliza anticuerpos monoclonales que se unen a la superficie de las células cancerosas que expresan moléculas blanco que no tienen las células normales.

Las terapias dirigidas pueden tener efectos secundarios como diarrea, problemas de hígado, problemas de piel, síntomas similares a gripe, fiebre, escalofríos, debilidad, mareos, náuseas, vómito, dolor de músculos o de articulaciones, fatiga, dolor de cabeza, problemas ocasionales para respirar, presión arterial baja o alta, recuentos sanguíneos más bajos, problemas de coagulación y curación de heridas, producción debilitada de espermatozoides, supresión inmunitaria y riesgo de reacciones de hipersensibilidad (alergias) graves o hasta fatales. Este tipo de terapias tiene limitaciones, por ejemplo, las células cancerosas pueden hacerse resistentes a dichas terapias, y además, los fármacos para algunos blancos identificados son difíciles de formular [9-11].

² Anticuerpos creados artificialmente a partir de una célula híbrida proveniente de la fusión de una célula madre del sistema inmune y una célula plasmática tumoral capaz de unirse a moléculas y/o células del organismo. Estos anticuerpos pueden unirse a células cancerosas.

1.2.3. Tratamientos nuevos o alternativos

Recientemente, se han propuesto terapias alternas que buscan ser más eficientes, locales (sólo afecten al tumor) o menos agresivas causando efectos secundarios menores en el paciente, mejorando así la supervivencia del paciente y su calidad de vida.

- ▶ **Terapias biológicas:** Existen algunas terapias biológicas que no se consideran terapias dirigidas debido a que no actúan en un blanco molecular específico [9-11]. Dentro de ellas podemos encontrar:
 - ▼ **Vacunas anticáncer:** contienen antígenos asociados con diferentes tipos de cáncer para aumentar la reacción del sistema inmune al tumor. Algunas vacunas se dirigen a las células cancerosas para destruirlas o para impedir su crecimiento, mientras que otras se dirigen a células sanas para intensificar su habilidad para combatir los cánceres. Estas terapias pueden provocar reacciones alérgicas graves.
 - ▼ **Terapia vírica oncológica:** consiste en la destrucción directa de las células cancerosas a partir del uso de virus. Los virus pueden infectar tanto las células cancerosas como las normales, pero tienen poco efecto sobre las células sanas, mientras que en las células cancerosas los virus se reproducen provocando su muerte. Uno de los retos al utilizar virus es que estos pueden ser destruidos por el sistema inmunitario antes de que tengan oportunidad de atacar un tipo de cáncer. Ningún virus oncolítico ha sido aprobado en Estados Unidos; sin embargo, el H101 (forma modificada de adenovirus) fue aprobado en China, en 2006, para el tratamiento de pacientes con cáncer de cabeza y cuello. Los efectos secundarios de esta terapia pueden incluir síntomas parecidos a la gripe y síndrome de lisis tumoral³.
- ▶ **Ablación:** consiste en la destrucción total de las células cancerosas a través de la aplicación de temperaturas extremas o químicos. Existen diversos tipos de ablación dependiendo de los agentes utilizados para eliminar a los tumores [14].
 - ▼ **Crioterapia o crioblación:** usa frío extremo para destruir a las células cancerosas. Las células son congeladas con líquidos criogénicos (nitrógeno líquido, con temperatura de -195 °C) hasta que mueren. Después del tratamiento el tejido se deshíela formándose una costra, la cual se cae o es eliminada por el sistema inmune después de algunas semanas. Esta terapia es local tratando sólo la zona afectada. Los efectos secundarios incluyen dolor, molestia en el área tratada, sangrado y daño en el tejido sano circundante debido al frío.
 - ▼ **Termoablación:** Consiste en la aplicación de calor elevando la temperatura del organismo por arriba de los 60 °C. Este aumento de temperatura provoca cambios

³ Desequilibrio del metabolismo caracterizado por una alta concentración de ácido úrico, potasio y fósforo en sangre tras la muerte de células cancerosas. Esto puede ocurrir en pacientes tratados con quimio o radioterapia.

fisiológicos en el tejido, como coagulación y carbonización, causando necrosis del tumor. Los efectos secundarios corresponden a quemaduras, inflamación y dolor. Esta técnica se abordará más en detalle en la siguiente sección.

- ▼ **Ablación química:** es la eliminación de los tumores a través del uso de sustancias químicas, que destruyen a las células cancerosas. Para este tipo de ablación se han utilizado inyecciones intratumorales de etanol y ácido acético.

- ▶ **Terapia fotodinámica:** Consiste en usar luz para activar medicamentos que se vuelven citotóxicos al producir especies reactivas de oxígeno destruyendo a las células malignas. El fármaco (agente fotosensibilizante) responde a luz de una cierta longitud de onda específica, produciendo forma excitada del oxígeno molecular provocando destrucción oxidativa, oclusión de vasos sanguíneos, y en algunos casos inflamación que activa una respuesta inmune del cuerpo. Este tipo de terapia se utiliza sobre todo para tratar cáncer de piel, debido a que la luz empleada no puede penetrar al interior del cuerpo. Los efectos secundarios de esta terapia son temporales y pueden hacer que la piel de algunos pacientes sea sensible a la luz hasta por 6 semanas posteriores al tratamiento, también puede dañar el tejido sano cercano a la zona tratada causando quemaduras, inflamación y dolor [12].

- ▶ **Terapia génica:** Esta terapia utiliza los genes para tratar una enfermedad. Comúnmente se remplazan genes defectuosos por genes normales, o se buscan mutaciones en genes que causan una respuesta favorable en ciertos pacientes con cáncer o a respuestas positivas a ciertos fármacos. Por ejemplo, se busca el reemplazo de genes supresores de tumor (detienen la multiplicación celular), el bloqueo de la expresión de un oncogen (estimula la multiplicación celular), inserción de genes supresores de angiogénesis, la introducción de genes que producen una citocina (para estimular el sistema inmune) o la inserción de genes en células cancerosas para hacerlas sensibles a quimio y radioterapia. Todavía es una terapia experimental⁴ [9-11].

- ▶ **Nanoterapias:** uso de nanopartículas para el transporte de fármacos específicos y su liberación controlada en las células cancerosas. Existen diversas nanoestructuras conocidas como nanojaulas que contienen fármacos; éstas son dirigidas al tumor y una vez ahí pueden abrirse (modificando la estructura física o química de la nanopartícula) permitiendo la liberación y entrega del fármaco. Otra opción es el uso de nanopartículas para calentar de forma local a las células cancerosas; que se abordará más adelante [13, 15].

Aunque se han mencionado una gran variedad de terapias diferentes, todas presentan algún tipo de limitación por lo que actualmente se recurre a combinar varios tratamientos para incrementar el éxito en su lucha contra los diversos tipos de cáncer. En general, se

⁴ La Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos de América acaba de aprobar la primera terapia génica comercial en su país. El tratamiento busca un mejor pronóstico para pacientes con leucemia linfoblástica aguda [16].

utiliza alguna de las terapias mencionadas anteriormente en combinación con radioterapia, quimioterapia o en caso extremo con cirugía.

1.3. Termoterapias

Además, de las terapias mencionadas en la sección anterior, existen propuestas que aún siguen en fase experimental o empiezan a ser evaluadas en pruebas clínicas. Una de las propuestas atractivas e importantes es la terapia térmica (o termoterapia). Esta consiste en la administración de calor, proveniente de fuentes externas al cuerpo humano, a un tejido específico con el objetivo de destruir a las células cancerosas o disminuir el tamaño de los tumores. En esta terapia se utilizan temperaturas por encima de la temperatura basal del cuerpo humano, es decir, 37.5 °C, provocando cambios fisiológicos en las células cancerosas y como consecuencia causando su muerte (en la siguiente sección se expondrán estos efectos termobiológicos).

Los tratamientos térmicos modernos de tumores datan de principios del siglo XX, en 1909, cuando Schmidt sugirió el uso de calor para potencializar el efecto de la radioterapia en pacientes con cáncer. En 1937, se celebró la primera conferencia internacional en hipertermia; y fue hasta la década de los 60's cuando las termoterapias se desarrollan de manera más importante a nivel mundial [17-26]. Anualmente cerca de 100,000 pacientes con cáncer son tratados con termoablación [27].

Actualmente, las termoterapias representan una alternativa a los tratamientos estándar anticáncer ya que además de ser efectivos erradicando los tumores, presentan ventajas como la reducción de mortalidad, costos menores, guiado en tiempo real por imagenología, y la habilidad para realizar procedimientos de ablación en pacientes ambulatorios⁵ [28-31]. Además, los efectos secundarios de las terapias térmicas que no sobrepasan los 44 °C son pocos frecuentes y no afectan al tejido sano. Los efectos adversos dependen de la técnica con la cual se induce la elevación de temperatura y de la parte del cuerpo a tratar, pero pueden incluir efectos leves como quemaduras, ampollas, molestias o dolor, inflamación de tejidos, coágulos, diarrea, náuseas y vómitos, y efectos secundarios más graves como enfermedades cardíacas y vasculares, daño en piel, músculos y nervios cercanos al área tratada; sin embargo, muchos de estos efectos son temporales [32].

Existe un vasto número de estudios que demuestran la eficacia de las termoterapias como tratamiento anticáncer, en diferentes tipos de modelos (*in vitro*, *ex vivo*, *in vivo* y estudios clínicos) y tipos de cáncer. Por mencionar sólo unos pocos, se ha utilizado radiofrecuencia para calentar carcinomas de conejos hasta los 47 °C, obteniendo la destrucción completa de los tumores en 75% de los casos [17]. Mediante calentamiento láser también se ha logrado reducir y destruir cáncer de hígado en ratones [33-36]. También, se ha explorado el uso de diferentes nanopartículas para la remisión de tumores, usando nanopartículas magnéticas de óxido de hierro recubiertas de proteínas en un modelo de glioblastoma

⁵ Paciente que visita un hospital por un diagnóstico o tratamiento sin pasar la noche en él.

multiforme de rata, logrando prolongar la vida de los animales al reducir el volumen de los tumores [37]. Además, se ha demostrado la eficacia de nanovarillas de oro en células de astrocitoma [38] o en células N1H-3T3 [39]. Incluso, se ha probado el uso de nanotubos de carbono en cultivos de células RENCA, reduciendo hasta 62 veces la viabilidad al ser irradiados con un láser durante sólo 30 segundos [40]. Por otra parte, se ha empleado luz para inducir calor en humanos con cáncer de hígado obteniendo que en el 95% de los casos se logró necrosis completa del tumor con un margen de seguridad de 5 mm, sin evidencia de recurrencia [41]. Además, se ha demostrado que la hipertermia puede inhibir la angiogénesis en modelos *in vitro* (células endoteliales incubadas por 1 hora a 43 °C) [42].

Las terapias térmicas pueden clasificarse en dos grupos, dependiendo del incremento de temperatura que se utilice: terapias de ablación térmica (termoablación) e hipertermia. Los tratamientos por hipertermia son aquellos en donde se utilizan rangos de temperaturas o dosis de calor “bajas”, alcanzando entre 38-46 °C, mientras que en las terapias por ablación se utilizan temperaturas por encima de los 46 °C, pudiendo llegar hasta los 250 °C o más. Algunos autores también dividen a la hipertermia en diferentes subgrupos: la hipertermia baja, la hipertermia moderada (o media) y la hipertermia extrema, con rangos de temperatura que oscilan entre 38-42 °C, 42-44 °C y 44-46 °C, respectivamente [6, 14, 15, 18-20, 32, 43-45]. La figura 2 muestra el rango de temperaturas utilizados para las diferentes terapias térmicas.

La diferenciación entre hipertermia y termoablación proviene de los cambios fisiológicos que sufren las células o los tejidos dependiendo de la temperatura alcanzada. Diversos estudios en cultivos celulares y tejidos muestran que para rangos de temperatura de entre 40-45 °C las células cancerosas pueden sufrir daño o provocar la inducción de moléculas señalizadoras finalizando en muerte por apoptosis. Por arriba de los 46 °C se observan otros fenómenos biológicos como la desnaturalización de proteínas, coagulación o carbonización de los tumores provocando necrosis, que es una muerte celular mucho más rápida y con respuesta inflamatoria [14, 18, 35, 44-50]. Se ha propuesto que el rango apropiado para la hipertermia debe ser entre 41.5-42 °C, con una temperatura óptima de 42 °C, sin embargo, se ha observado que un rango de temperaturas de 46-55 °C pueden incrementar la proporción de células muertas [17, 51, 52]. La destrucción de tumores en modelos *in vitro* requiere temperaturas entre 42-43 °C, sin embargo, en tumores animales y humanos aumentan a 45-50 °C para contrarrestar el efecto de enfriamiento del tejido debido al flujo sanguíneo, dependiendo de la irrigación del tejido [17].

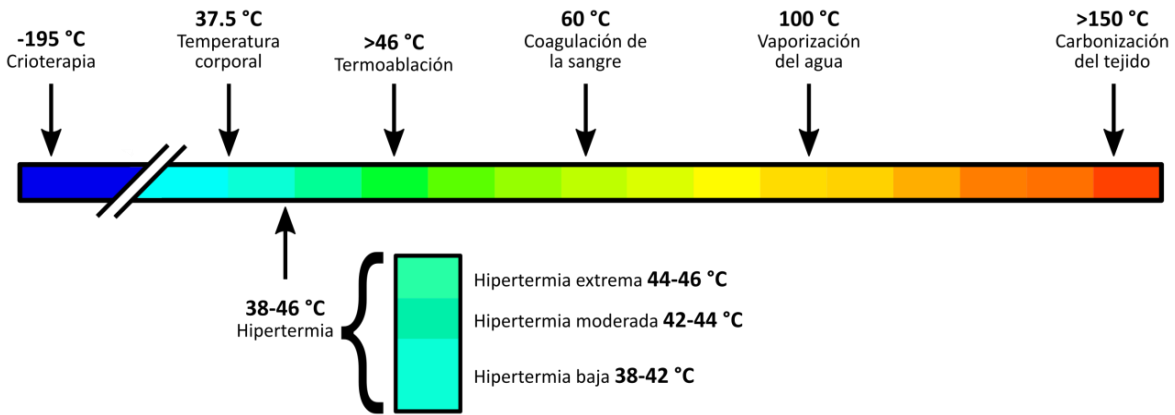


Figura 2. Rangos de temperatura utilizados en terapias térmicas y diferentes fenómenos que se aprecian en un organismo debido al incremento de temperatura.

1.4. Efectos biológicos consecuencia de las termoterapias

Los efectos fisiológicos provocados por un aumento de temperatura, por arriba de la temperatura basal del cuerpo, son muy variados y van desde la liberación de moléculas que pueden inducir muerte celular por diferentes rutas, pasando por daño a estructuras a nivel celular o tisular, hasta efectos a nivel sistémico como la activación de células del sistema inmune. Asimismo, los efectos dependen fuertemente del aumento de temperatura alcanzado, el tiempo en que se administra el calor, o de la zona calentada, es decir, si la terapia es de cuerpo entero o local. A continuación, se presentan los efectos termobiológicos consecuencia de las termoterapias.

1.4.1. Estructuras celulares

El estrés térmico al cual se somete un tejido induce una variedad de respuestas celulares dependiendo de la temperatura, la duración y del tipo de tejido. La dosis de energía térmica necesaria para inducir muerte celular (necrosis) está relacionada con la cantidad de energía requerida para la desnaturalización de las proteínas celulares. Estas biomoléculas son desnaturalizadas por calor, debido a cambios en su estructura cuaternaria, ya que los enlaces que mantienen su conformación son débiles y el calor (energía cinética) los rompe. Generalmente, los efectos citotóxicos son consecuencia directa de la desnaturalización de

las proteínas de membrana, citoplásmicas y nucleares. La tabla 1 resume las consecuencias termobiológicas a nivel celular.

La membrana plasmática es una de las estructuras celulares que más alteraciones sufre por calor, debido a su compleja composición molecular de lípidos y proteínas. Los lípidos que conforman la membrana cambian de una fase cristalina fuertemente empaquetada y ordenada a una fase de gel menos ordenada aumentando su fluidez. Este cambio incrementa la permeabilidad facilitando la difusión dentro o fuera de la célula. El cambio en la permeabilidad tiene repercusiones importantes como la entrada de agua a la célula, que puede provocar eventualmente la muerte celular, también se puede inhibir la difusión facilitada o alterar la concentración intracelular de varios iones (Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+}), resultando en un cambio en el potencial de membrana. Un aumento de la permeabilidad membranal también puede causar una caída en el pH citosólico (acidosis). El calor puede inactivar proteínas de membrana, impidiendo el transporte transmembranal o alterando los receptores de superficie, que son vitales para diferentes rutas de señalización [21, 23, 35, 39, 65, 66]. Además, la alta permeabilidad de las células puede mejorar el suministro de fármacos antitumorales.

Por otra parte, la hipertermia incrementa la expresión del receptor de inositol trifosfato, que regula la liberación de Ca^{2+} . Un incremento intracelular de este ion puede provocar el mal funcionamiento de proteínas y del citoesqueleto, lo que conlleva a la muerte celular. El Ca^{2+} puede desencadenar cascadas de señalización, como vías de la apoptosis o necrosis [21, 23, 35].

La hipertermia también provoca la desestabilización del citoesqueleto. El calor moderado puede llevar a la reorganización de los filamentos de actina; mientras que un exceso de calor colapsa las redes de tubulina, actina, filamentos intermedios y microtúbulos debido a su despolimerización. La ruptura del citoesqueleto cambia la forma de la célula, se pierde la correcta localización de los organelos, el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico se fragmentan y el número de mitocondrias y lisosomas disminuye. La pérdida del citoesqueleto puede provocar anoikis⁶ [23, 35, 39, 66]. El calor también puede desnaturalizar las fibras de colágena de la matriz extracelular⁷ [67, 68].

Otras alteraciones provocadas dentro de la célula debido al calentamiento incluyen cambios en las mitocondrias, como vesiculación de la membrana interna, aumento del espacio intermembranal y la formación de gránulos densos. La hipertermia promueve la fuga de protones a través de la membrana interna de la mitocondria y mejora la fosforilación oxidativa⁸. La pérdida de mitocondrias y un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa son responsables de una caída abrupta en los niveles de ATP. Asimismo, se incrementa la permeabilidad de la membrana interna de la mitocondria, y se pueden generar especies reactivas de oxígeno (ROS) [23, 35, 66, 69]. Cambios en los niveles de ATP y ROS pueden provocar muerte celular. Por otra parte, también puede ocurrir daño en los lisosomas debido

⁶ Muerte celular por desprendimiento de la célula de la matriz extracelular.

⁷ Los tumores se caracterizan por tener una acumulación excesiva y aberrante de matriz extracelular [67].

⁸ Proceso metabólico para producir ATP (fuente de energía de la célula).

a hipertermia; las enzimas lisosomales pueden modificarse y/o liberarse en el citoplasma, causando acidosis [21, 35]. El daño térmico al dañar proteínas y organelos en el citoplasma es capaz de inducir autofagia⁹ [70].

Componentes celulares	Alteraciones funcionales
Membrana celular	<ul style="list-style-type: none"> • Alteraciones en la fluidez, estabilidad y estructura. • Deficiencia en el transporte de iones (Ca^{2+}, Na^+, Mg^{2+}, K^+). • Modificación del potencial de membrana. • Modulación de las bombas y daño del transporte transmembranal.
Citoplasma	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturalización de la estructura y función de proteínas. • Deficiencia de la síntesis de proteínas. • Agregación de proteínas. • Inducción de la síntesis de chaperonas (proteínas de choque térmico).
Citoesqueleto	<ul style="list-style-type: none"> • Desensamble de los polímeros de actina y microtúbulos. • Alteración de los husos mitóticos y la organización del centrosoma. • Cambios en la forma celular.
Mitocondria	<ul style="list-style-type: none"> • Amplificación de la permeabilidad de la membrana interna. • Despolarización del potencial de membrana mitocondrial. • Reducción de la producción de ATP. • Generación de especies reactivas de oxígeno. • Alteración del transporte de Ca^{2+} a través de la membrana mitocondrial.
Retículo Endoplásmico	<ul style="list-style-type: none"> • Estrés debido a la excesiva acumulación de proteínas desnaturalizadas.
Núcleo	<ul style="list-style-type: none"> • Alteración en la síntesis de ADN/ARN. • Inhibición de las enzimas reparadoras del ADN. • Alteración en la conformación del ADN. • Modificación de la expresión de genes y señalización extracelular.

Tabla 1. Cambios en la fisiología celular inducidos por hipertermia. Tabla modificada de [23] y [51].

⁹ Autofagia es el mecanismo celular en el que vesículas secuestran proteínas y organelos del citoplasma dañados o envejecidos (obsoletos) para degradar y reciclar estos componentes en el lisosoma, y generar energía [5, 70].

Otros efectos biológicos debido al estrés térmico dentro de la célula son daños a nivel nuclear y en el procesamiento del ARN y ADN. El calor destruye el nucléolo. La síntesis y polimerización de ARN y ADN decrece. La síntesis de proteínas y ARN puede ser inhibida durante el calentamiento, el empalme de ARN es afectado fuertemente por choque térmico. La doble hélice del ADN se rompe debido a la desnaturalización proteica. También, se desnaturalizan e inactivan las enzimas encargadas de reparar al ADN, como la ADN-polimerasa y enzimas ligantes. Los procesos de replicación y transcripción del ADN se ven afectados. Además, las proteínas desnaturalizadas precipitan en la cromatina nuclear. Asimismo, se ha observado la sobreexpresión e inhibición de ciertos genes, como los de la familia de las proteínas de choque térmico (HSP) [21, 23, 35, 51, 66].

Por otra parte, las células también exhiben una variación a la temperatura dependiendo de la fase del ciclo celular en la que se encuentren. Las células en división son las más sensibles al calor. Durante la fase G1 mueren inmediatamente después de la hipertermia. Durante la fase S de la mitosis, las células son más susceptibles al calor, debido a que el ADN está siendo sintetizado. Nuevos fragmentos de ADN pueden unirse incorrectamente o contienen cromatinas aberrantes, en este caso la célula muere por el daño producido en los cromosomas. La hipertermia también causa alteración en los husos mitóticos y la organización del centrosoma [21, 23, 51].

1.4.2. Muerte celular

Como se mencionó en las secciones pasadas, la motivación principal de usar calor como terapia es la destrucción parcial o total de un tumor, es decir, que las células que constituyen al tumor mueran. Una vasta cantidad de investigaciones muestran que la necrosis no es la única vía por la que una célula puede morir debido al calor. El efecto citotóxico de la hipertermia puede inducir rutas de señalización que resultan en muerte por apoptosis [22, 51]. La muerte celular, apoptosis o necrosis, depende en parte de la naturaleza de la señal de muerte, el tipo de tejidos, la etapa de desarrollo del tejido y el medio fisiológico, así como también del tipo de estímulo y/o el grado del estímulo. En algunos casos el estímulo determina si las células mueren por apoptosis o necrosis. A dosis bajas, una variedad de estímulos dañinos tales como calor, irradiación, hipoxia y fármacos anticáncer pueden inducir apoptosis, pero estos estímulos pueden resultar en necrosis al administrar dosis altas [71]. Diversas investigaciones tanto en cultivos celulares como en tejidos demuestran que temperaturas por arriba de los 41 °C pueden inducir muerte celular por apoptosis; mientras que una exposición a temperaturas por arriba de los 50 °C está asociada con muerte celular por necrosis, que es mucho más rápida [47, 52].

- **Necrosis:** Además de los estudios que ya se mencionaron en las secciones anteriores, existe una vasta evidencia que demuestra la inducción de necrosis como un efecto de las termoterapias. Por ejemplo, en cultivos las células mueren por necrosis al elevar su temperatura a más de 52 °C; en este estudio se sugiere la muerte debido a la pérdida

de la integridad de membrana celular [38]. Por otro lado, también se ha demostrado la regresión completa de los tumores debido a necrosis al ser calentadas por 30 min a 43.5 °C [57], la inducción de necrosis debido a termoterapia en hígado de ratón [35] y necrosis progresiva tanto en tejido normal como canceroso cuando se alcanzan temperaturas de 45 °C, en tejidos de perros, ovejas, y cerdos [56]. Asimismo, se han hecho distintas pruebas en humanos, por ejemplo, en pacientes con tumores viscerales, se han observado que al calentarlos durante 15 minutos a 50 °C existe necrosis coagulativa [56].

- ▶ **Apoptosis:** La hipertermia es capaz de inducir apoptosis en muchas líneas celulares y en tejidos vivos por diferentes vías [23, 51, 72]. La hipertermia incrementa la muerte celular apoptótica a través de la activación de TNF α , que es una citocina que contribuye en procesos fisiológicos y patológicos y desempeña un papel fundamental en la iniciación de la activación de cascadas de otras citocinas y factores de crecimiento en proliferación, apoptosis e inflamación a través de activación de fosfolipasas, cinasas MAP y NF- κ B. TNF α también induce la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) resultando en apoptosis. Esta citocina también puede inducir necrosis [72-74].

Wang y sus colaboradores demostraron que la concentración de TNF α aumenta al inducir un incremento de temperatura (42 °C) en glioma C6 de rata, provocando así un aumento en las células muertas por apoptosis en comparación al grupo control [72]. De manera similar, Zhang y su equipo encuentran un máximo en los niveles de TNF α 60 min después de tratar células de glioma C6 a la misma temperatura [75]. Además, se ha observado que junto con TNF α , la hipertermia puede modificar los niveles de otras moléculas de señalización de muerte celular. Se ha reportado un incremento en la expresión de cinasa MAP38 y una disminución en los niveles de NF- κ B. También se ha reportado un aumento en los niveles de ROS [72]. Asimismo, se ha reportado que la hipertermia puede alterar la expresión de los genes Bax y Bcl-2 [23, 76, 77], los cuales participan en la regulación de eventos apoptóticos mitocondriales [71]. También, se han observado alteraciones en mitocondrias como cambios en el potencial de membrana que puede llevar a la permeabilidad de la membrana exterior de la mitocondria resultando en liberación de citocromo C, que activa caspasa 9 y un mecanismo dependiente de Apaf-1; caspasa 9 activa la caspasa 3 que conducen a la apoptosis [74, 76, 77].

1.4.3. Sistema inmune

Además de los diferentes efectos biológicos ya mencionados, la terapia hipertérmica también estimula una respuesta del sistema inmune, lo que no resulta extraño ya que el calor es un daño físico en el cuerpo del paciente. Después de la aplicación de la terapia hipertérmica se ha observado inflamación, enrojecimiento e hinchazón, molestia y dolor en la zona tratada, sugiriendo que los cambios inflamatorios inducidos por el calor están

asociados con modificaciones en los niveles de citocinas [17, 21, 35, 44]. En algunos casos, el calor estimula el sistema inmune y puede inhibir el crecimiento de tumores. Estudios en cultivos celulares y en hipertermia de cuerpo entero han demostrado diferentes reacciones inflamatorias que pueden contribuir a la muerte de células tumorales y sanas. Además, la hipertermia puede causar alteraciones en células del sistema inmune como linfocitos, natural killers (NKs), células Kupffer, macrófagos y células T [35, 78].

Una mayor respuesta inmune se ha observado principalmente en terapia hipertérmica de cuerpo entero, probablemente debido a que es una terapia sistémica. En pacientes tratados en baños térmicos se ha notado la elevación en los niveles de interleucinas 1, 6, 10 y de TNF α . Además, se ha observado que las células T disminuyen mientras las NKs incrementan en número conforme se desarrolla la terapia; sin embargo, las NKs mueren por apoptosis y el rango de apoptosis incrementa significativamente al día siguiente a la terapia, comparado con los rangos anteriores a la terapia. También, se han reportado alteraciones en subpoblaciones de linfocitos en sangre y apoptosis en células CD4-T durante la hipertermia [21, 35, 51, 78].

Por otra parte, en estudios *in vitro* se ha reportado el incremento de la proliferación de NKs acompañada de la estimulación de HSPs¹⁰ [51] y la inducción de apoptosis en linfocitos sanos [78]. En estudios de hipertermia local, se ha observado la actividad de macrófagos y células T, que son estimuladas rápidamente por la termoterapia [35].

1.4.4. Niveles de oxígeno y pH

El suministro de oxígeno, nutrientes y la acidez de un tumor están íntimamente relacionados con el flujo sanguíneo. La vasculatura tumoral anormal, favorece la hipoxia (niveles bajos de oxígeno), la acidosis (microambiente ácido debida a un pH bajo) y desprovee de energía al ambiente intratumoral por falta de nutrientes [21, 22, 35, 42, 51, 53, 60]. Los cambios ocurridos en el tumor debido al calentamiento, como reducción del flujo sanguíneo, hinchazón endotelial, hemorragias y microtrombosis, intensifican los fenómenos de hipoxia y acidosis. Además, se ha demostrado que la hipertermia incrementa el metabolismo y repercute en el consumo del oxígeno [21, 57]. También, se ha reportado que el calor induce un cambio en el pH de los tejidos; por ejemplo, el pH disminuye de 6.92 a 6.71 en un tumor SCK de ratón cuando es calentado a 43.5 °C por 30 min; el pH cambia debido a un incremento de metabolitos ácidos como el ácido láctico [53].

¹⁰ HSP: heat shock protein o proteínas de choque térmico. Las células han desarrollado mecanismos para protegerse ante una serie de daños, como el calor, evadiendo así la muerte. El calor provoca estrés en las células, por ello éstas activan una vía de señalización que conduce a la expresión transitoria de HSPs. La expresión de estas proteínas permite sobrevivir a las células en condiciones desfavorables. La función principal de las HSPs es ayudar en el re-plegamiento correcto de proteínas mal plegadas, recuperando su forma nativa, o asistiendo en su eliminación si fueron dañadas irreversiblemente (que provocaría una pérdida funcional de la proteína) [23, 66, 79, 80].

No obstante, la hipoxia y la acidosis también han sido utilizadas para acelerar y aumentar los efectos terapéuticos anticáncer. Potenciar estos fenómenos mediante hipertermia ha permitido que, en combinación con las terapias convencionales, se obtenga una reducción significativa del tamaño del tumor. Un ambiente ácido a temperaturas elevadas puede potenciar la respuesta de células cancerosas a ciertos fármacos; mientras que los cambios en oxigenación mejoran la radioterapia¹¹ en combinación con hipertermia. La hipertermia en combinación con quimioterapia incrementa el éxito para destruir muchos tumores debido a que el calor altera la farmacodinámica y farmacocinética de las drogas anticáncer [23, 44, 45, 51, 53]. Hipertermia y radiación actúan sinérgicamente, induciendo un incremento en la muerte celular, incluso a temperaturas bajas; células hipóxicas, con deficiencia nutricional o pH ácido, son más sensibles a la combinación de calor y radiación. La hipertermia también puede provocar vasodilatación, y con ello aumenta la microcirculación local del tumor, que produce un flujo sanguíneo en su centro, esto mejora la oxigenación, haciendo radiosensible al tumor; la radiosensibilización disminuye los tiempos de radioterapia. Además, el aumento de la circulación en el tumor también mejora la entrega de fármacos en el tumor haciendo más eficiente la quimioterapia [15, 24, 43-45, 61-63].

Estudios de hipertermia en combinación con radioterapia o quimioterapia han sido evaluados en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer como sarcoma, melanoma y cánceres de cabeza y cuello, cerebro, pulmón, esófago, seno, vejiga, recto, hígado, cuello uterino. La mayoría de estos estudios han mostrado la reducción significativa del tumor y/o la reducción en el número de dosis, por ejemplo, se ha observado que la combinación de la hipertermia con la radioterapia ayuda a la regresión completa del tumor en 60-70% [62]. En contraste, no se ha demostrado un aumento significativo en la supervivencia de los pacientes en algunos de estos estudios [18, 32, 61, 63, 64].

1.4.5. Flujo sanguíneo

Cuando un tejido sano es sometido a calentamiento, unos pocos grados centígrados por encima de su temperatura, existe un considerable incremento en el flujo sanguíneo, acompañado por vasodilatación y un aumento en la permeabilidad de la pared vascular; mientras que un exceso de calor puede ocasionar la ruptura de las vasculaturas seguidas de necrosis del tejido [21, 53]. Por otro lado, la vasculatura anormal de un tumor hace que éstos sean más susceptibles a la aplicación al calor que los tejidos normales, debido a la alta densidad de vasos sanguíneos que poseen y que son heterogéneos y tortuosos contribuyendo a una red circulatoria ineficiente. La vasculatura se hace más caótica en el centro del tumor, haciendo que el flujo sanguíneo en esta parte sea mínimo. Además, el flujo en tejido normal adyacente al tumor es mayor que el flujo en tejido normal lejano, debido a la angiogénesis [21, 42, 53, 54].

¹¹ El oxígeno es un radiosensibilizador. Se cree que el oxígeno aumenta la generación de radicales libres al ser utilizados en radioterapia.

Gracias a la ineficiente red vascular en un tumor, la disipación de calor es mucho más lenta que en un tejido sano, ya que el flujo sanguíneo sirve como disipador del calor por procesos convectivos. Estudios teóricos muestran que el flujo sanguíneo determina la extensión del daño durante la aplicación de calor. El efecto neto del calor en las microvasculaturas de un tumor está determinado por el equilibrio entre la conducción térmica y la disipación. Por este motivo, los tumores actúan como reservorios de calor, haciéndolos más sensibles a incrementos de temperatura, presentando un umbral de daño más bajo que los tejidos normales, ver figura 3. Como la vasculatura varía considerablemente dependiendo del tumor, la respuesta a la hipertermia es específica de cada tumor, sin embargo, los tumores pueden ser destruidos selectivamente a temperaturas de 41-47 °C [21, 35, 38, 42, 43, 53, 55, 56].

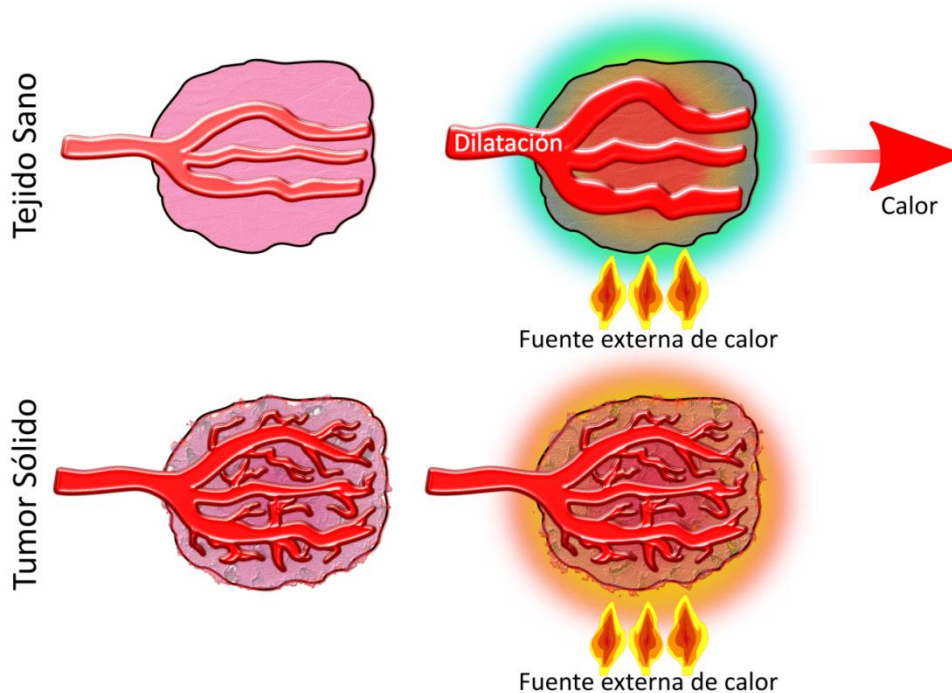


Figura 3. Los tumores actúan como reservorios de calor. Al calentar un tejido sano los vasos sanguíneos se dilatan incrementando el flujo de sangre, por lo que el tejido se enfría. En cambio, en un tumor los vasos no se dilatan, y en algunos casos éstos colapsan, en consecuencia, el tumor no puede librarse del calor y, por lo tanto, actúa como una trampa de calor. Imagen adaptada de [32].

Diversas investigaciones han evaluado el efecto de la hipertermia en la microcirculación de los tumores. Por ejemplo, se ha estudiado el cambio en el flujo sanguíneo en sarcoma de pie de rata, observando que el flujo después de 1 hora de tratamiento a 42 °C se reduce progresivamente hasta llegar a cero, regresando a valores normales después de 12 horas; mientras que para un tejido sano el flujo regresa a la normalidad 60 min posteriores al tratamiento [17]. También se ha reportado que el flujo sanguíneo en sarcomas de rata se reduce a la mitad tras 40 min de calentamiento a 41 °C, y para tratamientos de 30 min a 42-

44 °C se notó una oclusión de larga duración acompañada de la ruptura de vasos sanguíneos y hemorragia [53]. Por su parte, Karner y sus colegas indican que el flujo sanguíneo durante hipertermia aumenta para temperaturas de 42.5 °C o menores, mientras que para temperaturas mayores a 43 °C disminuye [57]. En contraste, también se ha reportado que el flujo permanece casi inalterado durante el tratamiento hipertérmico en varios tipos de tumores; sin embargo, horas después de la terapia el flujo disminuye [21].

También, se ha aprovechado reducir el flujo sanguíneo para incrementar el daño causado por el calor. De esta manera, Nikfarjam y sus colaboradores aumentan hasta en 20% el tamaño de la lesión (necrosis) al inducir una oclusión en la vasculatura del hígado [35, 55]. Recientemente se ha reportado, la evacuación prequirúrgica de fluido (componentes císticos) en tumores cerebrales humanos mediante aspirado, para aumentar el efecto de la terapia térmica, obteniendo mejores resultados [58].

No sólo se ha demostrado la variación del flujo sanguíneo en varios tumores, sino que diversos estudios han reportado otras consecuencias en las microvasculaturas de los tumores debidas al daño térmico. Por ejemplo, para temperaturas entre 42-44 °C se ha documentado hinchazón y/o degeneración endotelial, cambios en el fluido plasmático intersticial, microtrombosis debido a la activación de hemostasia¹² y cambios en la viscosidad de la membrana de células sanguíneas, trombosis ocasional, petequias¹³ y estasis venosa¹⁴. Todo esto resulta en un decremento del flujo sanguíneo [35, 51, 53, 57]. También, se ha observado que la hipertermia induce la destrucción completa y uniforme de la microvasculatura con hemostasia [34] y áreas de infarto en la periferia de las zonas tratadas causadas por isquemia debida a oclusión vascular [35]. Karner y su grupo documentaron muerte celular en fibrosarcoma en ratones debido a una isquemia prolongada después de 30 minutos de calentamiento a 43.5 °C [57]. Otras investigaciones han advertido la inhibición del crecimiento de un tumor (adenocarcinoma en ratones) asociada con la reducción del número de microvasculaturas y necrosis debida a isquemia [42].

Por arriba de la temperatura hipertérmica, rangos de 50-80 °C, una gran variedad de proteínas son afectadas, en particular la colágena que se desnaturaliza a aproximadamente 75 °C. La desnaturalización de la colágena perivascular resulta en un colapso parcial de los vasos. La desnaturalización de proteínas también incrementa la viscosidad de las proteínas plasmáticas, ayudando a la hemostasis [59]. Además, por encima de los 60 °C se observa la coagulación de la sangre, provocando necrosis en el tejido [28].

¹² Proceso por el cual los vasos sanguíneos detienen una hemorragia debido a la formación de coágulos.

¹³ Lesiones pequeñas de color rojo debido a sangrado dentro de la piel.

¹⁴ Circulación lenta o estancamiento de la sangre.

1.5. Métodos y técnicas de administración de calor en termoterapias

Las termoterapias no solo pueden clasificarse en función del daño biológico que pueden causar, sino que también suelen clasificarse dependiendo de la forma en la que se administra calor al tumor. Esta clasificación toma en cuenta el tamaño de la zona tratada y las dimensiones de la fuente de calor utilizada. Se considera aplicación local de calor si el tumor está localizado o limitado. Por otro lado, la aplicación es general si un cáncer ya se encuentra diseminado en todo el cuerpo (metástasis) [6, 18, 24, 32, 45]. A continuación, se especifican algunas de las características de estos tipos de termoterapias.

1.5.1. Termoterapia general

Este tipo de administración de calor también se denomina de cuerpo entero o sistémica. Este método utiliza la sangre del paciente para transmitir el calor a todo su cuerpo y con ello llegar a los tumores. Se utilizan diferentes técnicas para calentar el cuerpo del paciente como baños de agua caliente, vapor, incubadoras térmicas, mantas eléctricas o llenas de agua caliente, a través de la inducción artificial de fiebre mediante drogas o toxinas, etc. El calentamiento de la sangre puede ser extracorporal (la sangre se calienta fuera del cuerpo) o intracorporal (la sangre se calienta dentro del cuerpo). Con estas técnicas se consigue una fuente de calor profunda y homogénea, sin embargo, si se aplica mal se puede sobrecalentar la piel y la penetración del calor en el tejido puede ser poca. Para calentar el cuerpo del paciente se recurre a sedación o anestesia local. Este método es usado para tratar cánceres metastásicos que se han diseminado por el cuerpo del paciente. Emplea temperaturas menores a 42 °C, por tiempos prolongados de tratamiento; por ejemplo, para hipertermia extrema la duración de la terapia es de 60 minutos, mientras que para hipertermia moderada el tratamiento llega a durar entre 3 y 4 horas [32, 45]. Este tipo de método es raramente utilizado pues modifica la fisiología entera del organismo y se pueden presentar problemas adversos relacionados con enfermedades cardiovasculares (debido a la formación de coágulos), de pulmón, hígado o cerebro [6, 24, 61, 62, 81].

1.5.2. Termoterapia parcial

Este método consiste en la aplicación de calor en un área limitada del cuerpo. En estos métodos la sangre tiene un efecto contrario al de la hipertermia de cuerpo entero, en este caso, el flujo sanguíneo actúa con un disipador del calor local. Dependiendo de las técnicas utilizadas para calentar la zona a tratar también se llegan a utilizar disipadores artificiales,

como bolsas de agua, para proteger el cuerpo de una sobredosis de calor. Se pueden diferenciar dos tipos de terapias parciales: la regional y la local [6, 18, 24, 32, 45, 61, 63, 81].

- ▶ **Termoterapia regional:** consiste en el calentamiento de grandes áreas de tejido, como una cavidad del cuerpo, un órgano particular o una extremidad. Dependiendo de la zona calentada y de la técnica que se utilice para administrar el calor, las terapias regionales también pueden subclasificarse como:
 - ▼ **Superficial:** la zona a tratar son tumores superficiales, se encuentran en la piel o debajo de ella. Se utilizan fuentes de calor en contacto con la piel o fuentes de radiación muy grandes.
 - ▼ **Endocavitario o intraluminal:** se tratan tumores que están dentro o cerca de las cavidades del cuerpo, como el esófago, recto, próstata (uretra o recto), cérvix (vagina). Se emplean diferentes técnicas como sondas dentro de la cavidad que se dirigen hasta el tumor.
 - ▼ **Profunda:** utilizado para tratar cánceres dentro del cuerpo alojados a menos de 3 cm de la superficie, como cáncer de cuello uterino, vejiga, pelvis o abdomen. Se utilizan sondas o aplicadores los cuales son colocados alrededor de la cavidad del cuerpo u órgano a tratar.
 - ▼ **Perfusión local:** se utiliza la sangre del paciente para tratar cánceres de extremidades, hígado y pulmón. Parte de la sangre del paciente se extrae, se calienta y luego se bombea (por perfusión) de regreso a la extremidad u órgano.
- ▶ **Termoterapia local:** el calor se aplica en un área muy pequeña del cuerpo, como un tumor. Este método es empleado para tumores pequeños con tamaños menores a los 6 cm. Se utiliza para tratar tumores en lugares profundos del cuerpo, como tumores cerebrales, de cabeza y cuello, próstata, mama, hígado, riñón, pulmón y hueso. La técnica permite tratar al tumor con temperaturas aún más elevadas que las técnicas externas, pudiendo alcanzar temperaturas de ablación. El calor se lleva hasta el tumor por medio de sondas o agujas. Es un procedimiento invasivo.

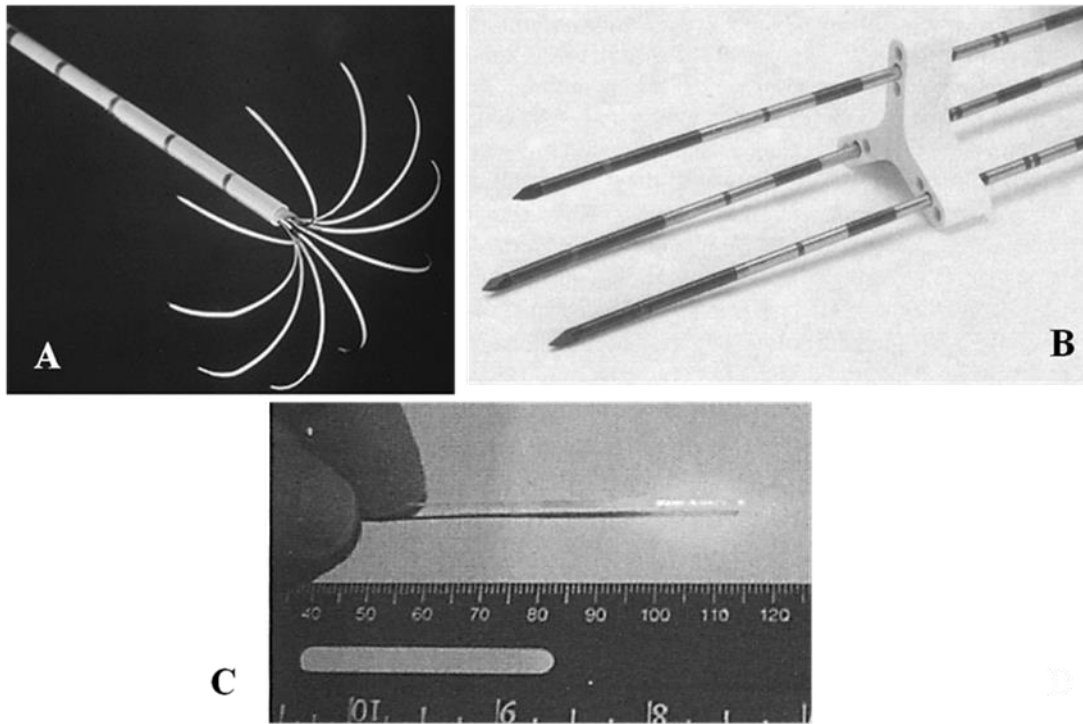


Figura 4. Dispositivos utilizados para inducir hipertermia local. (A) Aguja de radiofrecuencia (tipo sombrilla), (B) sonda multiaguja de microondas y (C) punta de fibra óptica con difusor. Imágenes tomadas de [14].

Para inducir calor en un tumor se emplean diferentes fuentes térmicas que pueden ir desde baños térmicos de agua caliente, perfusión con agua caliente u objetos calientes en contacto directo con la zona a tratar hasta métodos más sofisticados como antenas minúsculas que permiten calentar la zona afectada de forma localizada, permitiendo calentar regiones menores a dos milímetros [43, 44]. Además, se utilizan diferentes técnicas para administrar calor mediante los cuales se suministra algún tipo de energía que se transforma en calor, por absorción del tejido, y aumenta la temperatura del área tratada. Se pueden usar diferentes fuentes de energía para administrar calor por ejemplo: microondas, radiofrecuencia, luz infrarroja, ultrasonido, corriente eléctrica, campos magnéticos o fuentes de calor en contacto. De esta manera, existen antenas de microondas, electrodos de radiofrecuencias, fibras ópticas láser, transductores ultrasónicos, alambres resistivos, acopladores capacitivos, semillas (partículas) magnéticas, inductores magnéticos y tubos o mantas de agua caliente. En la figura 4 se pueden observar diferentes aplicadores de tamaños minúsculos (con dimensiones de algunos milímetros) que permiten liberar el calor en regiones espaciales muy pequeñas reduciendo el daño tejido sano circundante. En general, se elige utilizar aplicadores percutáneos en forma de agujas [6, 9, 10, 14, 15, 21, 24, 27, 28, 32, 36, 43, 45, 46]. La tabla 2 resume algunas de las características de los métodos empleados actualmente en termoterapias.

Método	Temperatura alcanzada (°C)	Región calentada	Método de inducción de calor	Invasión de la técnica	Técnica de contacto	Tiempo del tratamiento (min)
Cuerpo entero	38-42	Calentamiento de la sangre	<ul style="list-style-type: none"> Baños de agua caliente Vapor Inyecciones de agua caliente Incubadoras térmicas Mantas eléctricas o de agua caliente Radiadores infrarrojos Inducción artificial de fiebre mediante drogas o toxinas 	No invasivos	Contacto	120-720
Local/ regional	40-45	Calentamiento del tejido	<ul style="list-style-type: none"> Microondas Ultrasonido Luz infrarroja Radiofrecuencia Objetos calientes Alambres resistivos 	No invasivos, mínimamente invasivos	Contacto / no contacto	10-90
			<ul style="list-style-type: none"> Radiofrecuencia Microondas Ultrasonido Luz infrarroja Objetos calientes 	Invasivos / mínimamente invasivos	Contacto / no contacto	
			<ul style="list-style-type: none"> Radiofrecuencia Microondas Ultrasonido Semillas magnéticas 	Invasivos / mínimamente invasivos	No contacto	
			<ul style="list-style-type: none"> Líquidos calientes Sangre caliente 	Invasivos / mínimamente invasivos	Contacto	
Termoablación	46-250	Calentamiento del tejido	<ul style="list-style-type: none"> Microondas Radiofrecuencia Luz infrarroja Ultrasonido Objetos calientes Semillas magnéticas 	Invasivos/ mínimamente invasivos	Contacto / no contacto	<30

La eficacia de las termoterapias está relacionada con la dosis térmica administrada, la temperatura que se logra alcanzar durante el tratamiento, la generación homogénea del calor, la duración del tratamiento, así como de las características del tumor y del tejido. [18, 63]. Algunos de los retos principales con los aplicadores de termoterapia local es la transferencia óptima del calor desde el dispositivo hasta el tumor, alcanzar la temperatura correcta y mantenerla por el tiempo que dura la terapia, lograr una distribución homogénea¹⁵ del calor y generar calor en regiones espaciales pequeñas. La liberación adecuada y el control preciso del calor es el principal reto tecnológicamente a superar para las termoterapias. La temperatura que puede alcanzar el tumor a tratar depende de las propiedades físicas no uniformes del tejido, su geometría y el flujo sanguíneo. Por ejemplo, sólo el 50% de los tumores profundamente alojados alcanzan una temperatura de 42 °C cuando se usan electrodos [45].

1.6. Terapia fototérmica: termoterapia local inducida con luz

El problema principal de los dispositivos utilizados hoy en día para la termoterapia regional y/o local es que las fuentes que producen calor mediante radiofrecuencia, microondas, ultrasonido o electrodos pueden causar calor excesivo e irregular, lo que puede provocar quemaduras o daños secundarios al tejido sano que rodea al tumor. Otras desventajas de los métodos mencionados incluyen que, la posición y orientación de las antenas puede causar interferencia (de los campos electromagnéticos) y con ello hacer ineficiente o nulo el tratamiento, y algunos dispositivos de uso externo necesitan de bolsas de agua para evitar daños en la piel del paciente, entre otros [35, 43, 49]. El daño al tejido sano se vuelve muy relevante al tratar tumores en tejido del sistema nervioso central (cerebro o médula espinal) donde se tiene que minimizar el daño térmico. La efectividad de las termoterapias depende de la habilidad para establecer y mantener la temperatura uniforme en el tumor. Una alternativa poderosa para superar estos y otros problemas es el uso de luz. Las terapias inducidas con luz proveen de un control espacio-temporal preciso y son mínimamente invasivas o no invasivas, ya que en algunos casos se pueden alcanzar tejidos profundos desde fuera del cuerpo¹⁶. Además, es posible llevar luz al interior del cuerpo de un paciente a través de una fibra óptica y acceder a lugares más profundos, liberando la luz en el lugar correcto [13].

¹⁵ Los fluidos corporales pueden actuar como reservorios de calor que secuestran la energía térmica, comprometiendo la extensión de la lesión térmica, provocando una distribución asimétrica de calor [58].

¹⁶ La luz visible (400-650 nm) es absorbida rápidamente en los tejidos, mientras luz infrarroja cercana (650-1100 nm) tiene una gran distancia de penetración, alcanzando profundidades de 3 cm en músculo y cerebro, y hasta 10 cm en tejidos como mama [13, 43, 64]. La absorción de los tejidos queda determinada principalmente por la cantidad de hemoglobina y agua que hay en ellos [29, 67].

La luz puede interactuar de diferentes formas con un tejido dependiendo de las propiedades ópticas de éste. Debido a las diversas ventajas que ofrece un láser, éste se ha convertido en la fuente de luz más utilizada en el campo de la biomedicina. Cuando la luz (del láser) se encuentra con un tejido interactúa de diferentes formas y puede sufrir reflexión, transmisión, esparcimiento¹⁷ o absorción, siendo estas dos últimas las más importantes [12]. Dependiendo de algunos parámetros como la longitud de onda y la potencia, la respuesta de los tejidos a la irradiación con luz láser puede clasificarse en interacciones fotoquímicas, fototérmicas, fotoablación, plasma inducido y fotodisrupción [12, 13, 82].

Específicamente, el efecto fototérmico es el fenómeno utilizado para inducir un incremento de temperatura por medio de luz, y su uso terapéutico se denomina fototerapia o *terapia fototérmica* (TFt). El efecto fototérmico consiste en la absorción de la luz y su conversión en calor. La conversión proviene de la excitación y la relajación de los electrones que conforman a las moléculas de un tejido (efectos no radiativos¹⁸ como conversión interna, conversión intersistemas y relajación vibracional). La relajación de los estados excitados causa un aumento en la energía cinética de las moléculas que conforman el tejido, lo que se traduce en un aumento de temperatura. El efecto fototérmico es el principal fenómeno observado de la interacción láser-tejido.

El incremento de temperatura en el tejido depende tanto de las características del tejido como de las del láser. Por ejemplo, depende del coeficiente de absorción del tejido y de sus propiedades térmicas como la conducción y su coeficiente de difusión térmica; también depende de la potencia del láser, el área de irradiación, el tiempo del pulso (láseres pulsados¹⁹) y el tiempo de exposición. Pero no sólo es importante la elevación de la temperatura sino también la distribución de calor generada en el tejido, y ésta también depende de las características del láser y de las del tejido. Existen otras propiedades que deben ser consideradas como el esparcimiento óptico en el tejido, y la distribución espacial de la luz (por ejemplo, si el haz es gaussiano²⁰) las cuales deben tomarse en cuenta para evaluar la distribución espacial del calor. El control preciso de la distribución del calor es importante para lograr un tratamiento altamente local.

Otra cuestión relevante sobre la disipación térmica en la TFt es el tiempo en el que se deposita la energía en el tejido, es decir, debe considerarse el tiempo de duración del pulso láser, ya que, si el tiempo en el que se deposita la energía es mayor que el tiempo de disipación térmica, el tejido puede transmitir calor al tejido vecino, enfriándose por disipación o convección (flujo sanguíneo). En cambio, si el tiempo del pulso es menor que el tiempo de disipación térmica, el calor no se pierde por disipación quedando confinado en el área de irradiación; fenómeno conocido como confinamiento térmico [50]. Un tratamiento

¹⁷ Cuando la luz interactúa (choca) con un objeto de dimensiones microscópicas la luz sufre un cambio en su dirección; debido su refracción y reflexión. La luz se esparce dentro del tejido biológico, debido a que la luz interactúa con las células, biomoléculas de gran tamaño.

¹⁸ No liberan energía en forma de luz. En contraste, otros efectos como la fluorescencia son procesos radiativos.

¹⁹ Un láser pulsado libera luz en tiempos muy cortos (< milisegundos). Un láser no pulsado se denomina láser de onda continua (CW) y siempre está emitiendo luz. Un láser pulsado puede alcanzar potencias pico mucho más altas que un láser continuo, porque concentra energía en lapsos de tiempo muy cortos.

²⁰ Si se observa la sección transversal de un rayo láser y se mide su intensidad en función de la distancia, entonces la distribución de intensidad tiene un máximo en el centro y decae gaussianamente hacia los extremos.

confinado térmicamente es más local que uno no confinado térmicamente, y el tamaño de la lesión es mucho menor. El uso de pulsos ultracortos permite una gran elevación de la temperatura en una zona muy delimitada [36, 64, 82]. Algo similar también aplica para láseres continuos en los que se utilizan tiempos cortos de tratamiento; Xie y su grupo muestran que con el uso de tiempos largos de irradiación (32 s) se disipa más energía provocando un incremento de temperatura menor y aumentando la temperatura en la vecindad, mientras que con tiempos "cortos" (9.6 s) hay un aumento mayor temperatura en menor tiempo y más localizado [83]. Por lo tanto, un tratamiento rápido permite menos lesiones adversas por disipación, confinando el calor a una región más pequeña que conlleva a una lesión más pequeña.

Diversas investigaciones se han realizado para estudiar la importancia de distintos parámetros en la TFFt y cómo influyen en el tamaño de una lesión necrótica de un tejido. Por ejemplo, se ha estudiado el tamaño de la necrosis en diferentes tejidos como hígado de ratón (*in vivo*) o músculo de pavo (*ex vivo*), para diferentes longitudes de onda del láser²¹, demostrando que la ablación y la carbonización del tejido depende de la longitud de onda [33, 36]. También, se ha estudiado la liberación de energía láser en tejido de cerdo para provocar incisiones limpias y sin hemorragias (láser de CO₂) [84]. Asimismo, se ha estudiado el efecto de la perfusión en la TFFt; Nikfarjam y sus colaboradores demostraron que el flujo sanguíneo (normal) hepático impide la expansión de la lesión térmica por efecto de disipación térmica y la lesión por fototermia aumenta cuando se combina la terapia láser con una oclusión del flujo sanguíneo en el hígado [Nikfarjam41]. También, se ha investigado cómo delimitar el calor generado por la irradiación láser, para evitar daño colateral al tejido sano; Xie y su grupo fabricaron un modelo artificial que imita algunas propiedades de los tejidos humanos, observando la importancia de irradiación láser y su disipación; el modelo consistió en un fantasma de alginato con nanotubos de carbono, probando diferentes tiempos de depósito de energía y modelando el fenómeno matemáticamente, logrando demostrar que tiempos cortos pueden confinar el calor obteniendo daño extendido a menos de 1 cm [83].

1.7. Terapia fototérmica en oncología

El tratamiento con luz láser permite controlar y confinar el daño térmico en los tejidos de forma muy precisa, minimizando el daño por calor al tejido circundante. Esto ha motivado el uso de luz como alternativa para generar hipertermia y termoablación de manera muy local y aprovecharla como tratamiento oncológico. La terapia fototérmica permite la destrucción selectiva de células cancerosas, logrando la reducción o destrucción completa de un tumor sin afectar el tejido sano que lo rodea. De manera general, los tumores pueden

²¹ 830, 940, 980, 1064 y 2080 nm.

ser tratados con luz de 3 formas (figura 5). La primera es superficial, exponiendo al tejido a la luz de manera externa y para ello se utilizan láseres en el infrarrojo cercano que permiten que la luz penetre la piel algunos centímetros; esta forma de irradiación se utiliza para cáncer superficial (principalmente de piel) o poco profundo. La segunda forma es de manera interna, es decir, si la luz láser no puede penetrar hasta el tumor, entonces el tejido es expuesto mediante cirugía o pequeñas incisiones en el cuerpo y se enfoca un láser externo sobre el tumor para generar calor. La tercera forma es por medio de una fibra óptica que lleva la luz a las cercanías del tumor o a su centro, técnica comúnmente conocida como termoterapia láser intersticial (LITT); a través de esta técnica se pueden alcanzar tumores alojados profundamente o de difícil acceso [14, 19].

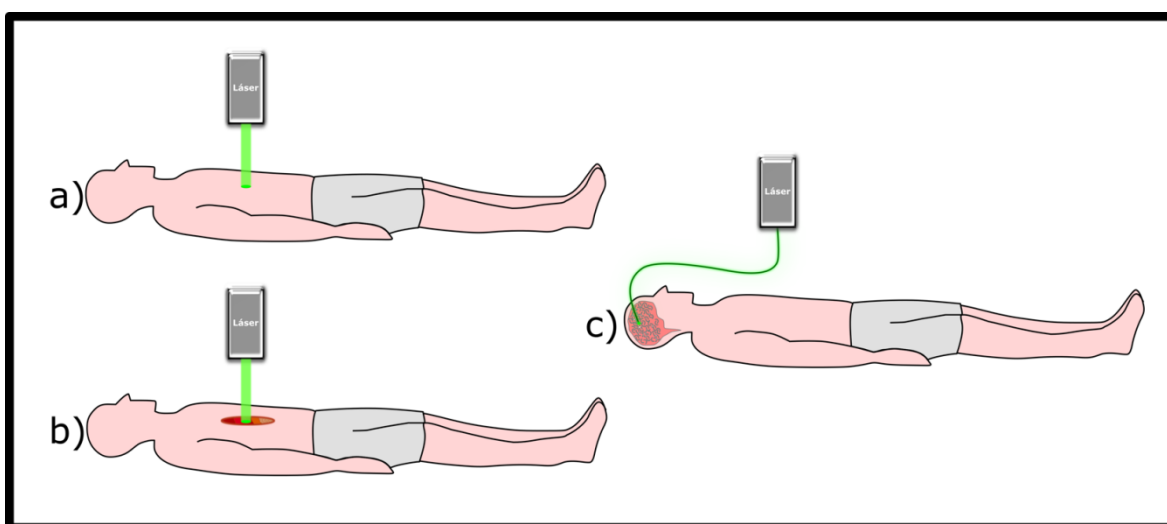


Figura 5. Formas de administración de la luz para llevarla a un tumor. a) Método superficial, la luz láser incide de forma externa sobre la piel del paciente; dependiendo de la longitud de onda la luz puede penetrar algunos centímetros dentro del cuerpo. b) Método interno, la luz llega al tumor por medio de una incisión. c) Método intersticial, la luz puede llegar a cualquier parte del organismo por medio de una fibra óptica, utilizado para tratar tumores profundos o de difícil acceso.

El uso del láser para la destrucción de tumores data de 1965 [19]. Desde entonces se han hecho diversas investigaciones en modelos tanto *in vitro*, *in vivo*, como *ex vivo*, y en diferentes tipos de cánceres animal y humano. Por ejemplo, se ha utilizado luz láser para reducir y destruir cáncer de hígado en ratones [33, 35, 36, 55]. Asimismo, se ha estudiado el uso de la fototermia en humanos con cáncer de hígado obteniendo resultados muy prometedores, donde en el 95% de los casos se logró necrosis completa del tumor con un margen de seguridad de 5 mm, sin evidencia de reincidencia [41]; y en cáncer invasivo de mama con necrosis en el tumor en el 33% y en 3 casos necrosis completa [85]. Por otra parte, también se han estudiado las lesiones que puede causar el láser en piel de ratas y ha sido comparada con la ablación térmica producida por un objeto caliente en contacto [86]. También, existen diversas investigaciones en cerebro pues las fibras ópticas son

compatibles con la neurocirugía esterotáxica [29, 31, 43, 87]. La TFt también ha sido utilizada en cáncer de piel o en zonas cercanas a la superficie del cuerpo como cáncer cervical, vaginal, de pene, boca, nariz u ojo, y en cáncer de páncreas, próstata, cabeza y cuello [10, 43].

En la actualidad, se recurre principalmente al uso de las fibras ópticas para la TFt, debido a su gran flexibilidad y sobre todo su tamaño (< 1 mm); las fibras ópticas permiten llevar la luz a lugares de difícil acceso dentro del cuerpo con técnicas mínimamente invasivas (como su inserción dentro de agujas o catéteres) y sirven para tratar tumores inoperables o alojados profundamente [13, 43]. Al presente, la Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos de América ha aprobado dos sistemas comerciales LITT para su uso clínico, el Visualase® [88] y el Neuroblate® [89] (para más información ver apéndice 1). Estos sistemas están recomendados principalmente para tratar tumores cerebrales y metástasis en cerebro [29, 30, 87, 90, 91]. La liberación de luz a través de una fibra óptica permite conseguir áreas de necrosis (por coagulación²²) bien definidas y también permite la destrucción directa del tumor limitando el daño a nervios o vasos sanguíneos localizados en su vecindad [43]. La región de transición entre el tejido tratado y el tejido sano es aproximadamente de 1 mm [91]. Actualmente, la imagen por resonancia magnética permite guiar a la fibra en la posición exacta, monitorear en tiempo real la temperatura alcanzada y de esta manera determinar los efectos de la TFt evaluando la necrosis durante la terapia [29-31, 43, 58, 88, 89, 92].

La principal limitante de la TFt es la incapacidad de lograr necrosis en un tumor grande. El diámetro máximo que puede ser dañado con una sólo fibra óptica es de aproximadamente 6 cm, dependiendo de su diseño [35, 36, 55]. Por su parte, los sistemas Visualase® y Neuroblate® se recomiendan para tumores no mayores a 2 cm [87]. Por este motivo, se ha buscado modificar la distribución de calor cambiando la distribución de luz que escapa de la fibra utilizando diferentes tipos de fibras ópticas o modificaciones en sus puntas; usando fibras ópticas sin modificar, fibras pulidas, fibras de cuarzo, difusores cilíndricos en sus puntas, o dispositivos con puntas múltiples [43]. Además, se han utilizado diferentes algoritmos que permiten pulsar láseres continuos modificando su duración, o sistemas internos de enfriamiento similares a los utilizados en dispositivos de radiofrecuencias que remueve el calor de la interface entre la punta de prueba y el tejido, minimizando la carbonización o vaporización [14, 90].

²² Después de la TFt efectuada a través de fibras ópticas se han observado tres zonas de daño, un área cercana a la punta caracterizada por un cráter central (zona de mayor daño), después zona intermedia con daño térmico (tejido deshidratado) y por último una zona más externa donde se observa edema. Las primeras dos zonas presentan necrosis por coagulación (ablación térmica) y en la tercera zona se tienen células viables [29, 84].

1.7.1. Uso de nanopartículas en terapia fototérmica

Para generar fototermia con luz, típicamente se utilizan láseres en el infrarrojo cercano, debido a que los tejidos presentan una absorción óptica mínima a estas longitudes de onda²³, permitiendo que la luz penetre mayores distancias dentro del tejido. Sin embargo, esto constituye un problema importante para la Tft, pues para este tipo de tratamientos se requiere que la luz sea absorbida para posteriormente convertirse en calor. En los diferentes tejidos biológicos existen diversos agentes fotoabsorbentes naturales (cromóforos como la hemoglobina) los cuales tienen coeficientes de absorción grandes para longitudes de onda del visible, pero su absorción es poca en el infrarrojo cercano. Por tal motivo, para generar calor en tejidos con poca absorción óptica se utilizan láseres de alta potencia, del orden de watts o decenas de watts, por tiempos grandes de tiempo (minutos); sin embargo, potencias tan grandes pueden generar efecto fototérmico y otros efectos no deseados como fototoxicidad (fotooxidación) o fotodisrupción (cavitación²⁴) dañando a las células sanas [13, 93].

Una solución para disminuir la potencia láser y tiempo de terapia necesarios para inducir el incremento de temperatura deseado es el uso de agentes fotoabsorbentes con coeficientes de absorción grandes para la luz infrarroja. Diversos tintes representan una opción importante para generar calor en Tft; tintes como verde de indocianina, naftalocianinas y porfirinas han sido utilizados para generar efecto fototérmico [13, 19, 60]. No obstante, los tintes no tienen una gran eficiencia al convertir la luz en calor y pueden presentar efectos como el blanqueamiento óptico²⁵ y con ello disminuir aún más su eficiencia para transformar la luz en calor. Recientemente, el uso de nanopartículas (NPs) se ha convertido en una alternativa poderosa para lograr grandes incrementos de temperatura con luz láser de baja potencia. Por ejemplo, las nanopartículas de oro necesitan 10-25 veces menos potencia que tintes para generar calor [19]. Otra opción muy eficiente es el uso de nanotubos de carbono los cuales requieren un tercio de la potencia utilizada para inducir fototermia empleando nanovarillas de oro [64, 83, 93, 94].

Hoy en día, la nanotecnología ofrece diversos tipos de nanopartículas que pueden ser empleadas como nanocalentadores, permitiendo calentar regiones espaciales más pequeñas y mejor definidas [44, 15]. Además, el uso de terapias con nanomateriales tiene diversas ventajas como una gran selectividad de blancos en los tejidos, la acumulación de nanopartículas en los tumores, son mínimamente invasivas, administración rápida y prolongación del efecto terapéutico [13, 64]. Para generar hipertermia o termoablación a partir del uso de NPs se han utilizado principalmente nanopartículas magnéticas y metálicas que se inyectan directamente al tumor y bajo la influencia de un campo magnético externo generan calor provocando muerte celular [15, 37, 83]. Diferentes NPs se han empezado a

²³ 650-1100 nm.

²⁴ Fenómeno que se refiere a la formación de burbujas por la evaporación explosiva del agua, que al colapsar crea ondas de choque muy intensas [95].

²⁵ Fenómeno en el cual un tinte se degrada químicamente perdiendo eficiencia en alguna propiedad óptica. En este caso, el tinte deja de absorber la luz.

utilizar para hacer más eficiente el calentamiento producido por diferentes tipos de energía, como radiofrecuencia, ultrasonido y luz láser [15].

En las termoterapias convencionales (tabla 2) las fuentes de calor utilizadas generan gradientes de calor con un máximo en la superficie del cuerpo humano que decrece con la distancia de la fuente externa (termoterapia de afuera hacia adentro, ver figura 6a) y la mayoría de la energía se disipa en el tejido sano. Por su parte, al hacer uso de nanopartículas éstas absorben la energía originada de la fuente externa de calor e incrementan los efectos térmicos; de esta forma las nanopartículas se convierten en fuentes de calor e invierten la dirección de la pérdida de calor (termoterapia de adentro hacia afuera, ver figura 6b) permitiendo localizar el calor y minimizar los efectos adversos de las terapias térmicas [15].

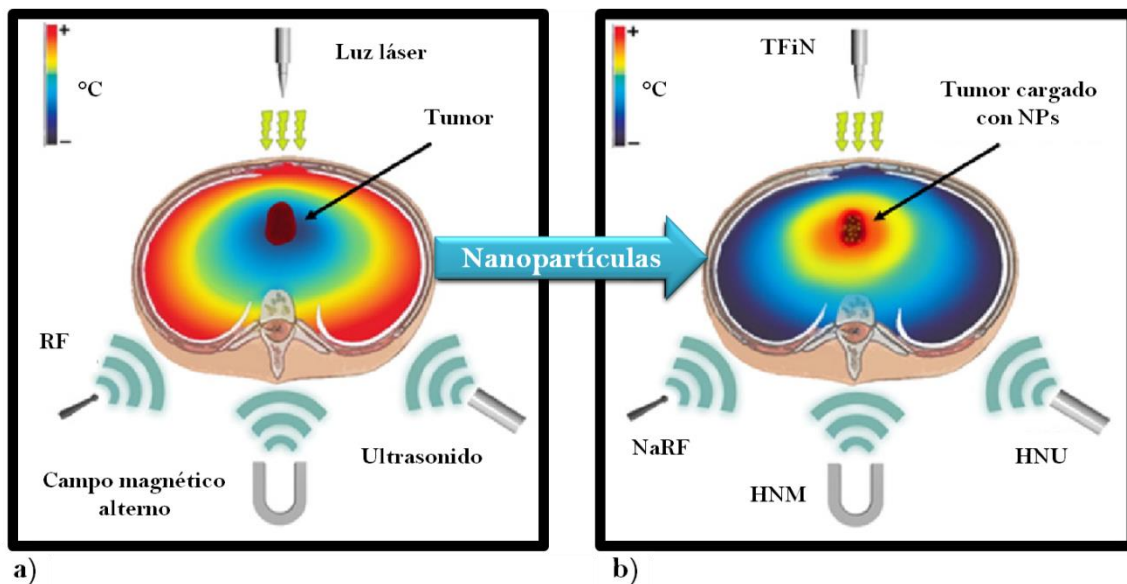


Figura 6. Inducción de calor por medio de nanopartículas. Con el uso de una fuente de calor convencional (radiofrecuencia (RF), ultrasonido, campos magnéticos) el calor fluye de fuera del cuerpo hacia adentro (a) mientras que con el uso de nanopartículas el calor fluye de éstas hacia el exterior (b). Abreviaciones; TFiN: Terapia Fototérmica inducida con Nanopartículas, NaRF: Ablación por Nano-Radiofrecuencia, HNM: Hipertermia Nano-Magnética, HNU: Hipertermia Nano-Ultrasónica, NPs: Nanopartículas. Imagen modificada de [15].

La tendencia actual es combinar tanto la TFiN como la nanotecnología para el tratamiento de tumores malignos, debido a que la combinación de ambas ofrece ventajas sobre las terapias por separado. En este caso, se utilizan NPs fotoabsorbentes en el espectro óptico de la luz infrarroja, obteniendo fuentes de calor más localizadas. La luz utilizada para este tipo de terapias presenta una mínima absorción por parte de los tejidos; de esta manera sólo las nanopartículas se calientan sin dañar el tejido sano circundante [44, 69, 76]. La

temperatura alcanzada en el tumor depende de la eficiencia²⁶ en la conversión fototérmica de la NP, la concentración y distribución de éstas dentro del tumor, la dosis de luz (potencia máxima) y la longitud de onda [50, 69, 76, 96]. A esta terapia la denominaremos *terapia fototérmica inducida con nanopartículas* (TFiN) y con ella se busca inducir un calentamiento rápido en tejido maligno (destruyendo el tumor) mientras se minimiza la difusión térmica (calor excesivo) al tejido sano.

Se ha demostrado la efectividad de la TFiN con diversos nanomateriales para combatir diferentes tipos de cáncer, principalmente nanoestructuras de oro o de carbono han sido utilizados para producir el efecto fototérmico. Las nanopartículas de oro incluyen diversas geometrías como nanoesferas, nanovarillas, nanocascarones y nanocajas; mientras que los nanomateriales de carbono más empleados son los nanotubos de carbono (NTC) de una pared y múltiples paredes, nanocuernos, fullerenos y grafeno. Otras nanoestructuras utilizadas para producir efecto fototérmico incluyen nanopartículas de sílice recubiertas de oro, puntos cuánticos, nanopartículas de óxido de hierro, cobre, molibdeno, tungsteno, paladio, o partículas orgánicas como polímeros (polipirrol, polianilina, polidopamina, melanina) [19, 25, 64, 83, 97-101]. Recientemente, se han propuesto otras estrategias para crear agentes fototérmicos como NPs porosas con tintes dentro de ellas [97] o métodos más sofisticados como el uso de nanocompuestos obtenidos de la mezcla de puntos cuánticos de grafeno (GQDs), texafirina de lutecio (Lu-TP) III y texafirina de gadolinio (Gd-TP)²⁷ [102].

1.7.1.1. Terapia fototérmica asistida con nanopartículas de carbono

Diversos estudios recientes han demostrado la efectividad del uso de nanopartículas de carbono para inducir calor. El uso de nanopartículas de carbono ofrece ventajas sobre las partículas de óxido de hierro utilizadas en terapias magnéticas, pues las nanoestructuras de carbono son insensibles a campos magnéticos, pudiendo ser utilizadas en pacientes con implantes metálicos o rellenos y prótesis dentales. Además, los NTC tienen un espectro de absorción muy amplio, en comparación con NPs de oro, pudiendo utilizar diferentes fuentes de luz [100].

Los NTC han sido empleados en diferentes estudios para destruir células cancerosas. Se han realizado pruebas tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, en diversos tipos de cáncer, y distintos modelos animales, sobre todo en roedores como ratones, ratas, así como injertos de células cancerosas humanas en animales de laboratorio. Estas nanopartículas son administradas por medio de inyecciones vía sistémica o intratumoral, y se les irradia

²⁶ La conversión fototérmica de una nanopartícula depende de su forma, tamaño y material (coeficiente de absorción óptico).

²⁷ Lu-TP es un fotosintetizador utilizado en terapia fotodinámica, Gd-TP es una droga redox (genera ROS), mientras que los GQDs funcionan como agentes fototérmicos. Durante la irradiación del nanocompuesto, las especies reactivas de oxígeno (Gd-TP) incrementan el efecto de la terapia fotodinámica (Lu-TP) que a su vez se ve beneficiada por el calor (GQDs).

generalmente con fuentes externas de luz [64]. Las investigaciones incluyen diversos experimentos que se han llevado a cabo como, inyecciones intratumorales de nanotubos de una sola pared y su irradiación láser para la destrucción completa de un tumor (injerto de carcinoma) en un ratón [64]. También, se ha demostrado la fotoablación de un tumor de riñón, de manera *in vitro* e *in vivo*, mediante el uso nanotubos multipared y su irradiación láser; la irradiación láser de los NTC incrementa la temperatura del tumor hasta los 74 °C, utilizando energías menores a 1 W y sólo 30 s de tratamiento; los investigadores de este estudio observaron una remisión del tumor por un periodo mayor a tres meses en el 80% de los animales tratados [40], ver figura 7. Por otra parte, se ha experimentado con el uso de fibras ópticas huecas para utilizarlas como microagujas, y depositar con ellas nanocuernos de carbono para generar fototermia en vejiga de cerdo (*ex vivo*); el uso de estas nanopartículas de carbono incrementa la temperatura de la muestra en 19 °C [98]. Además, también se han utilizado NTC para eliminación de células cancerosas (HeLa²⁸ y HepG2²⁹) y la regresión de un tumor en un modelo *in vivo* de melanoma murino [100]. Recientemente, se han usado estas NPs para la regresión de un tumor en un modelo murino, a través de la destrucción de la red anormal de matriz extracelular alrededor del tumor (desnaturalización de las fibras de colágena) [68].

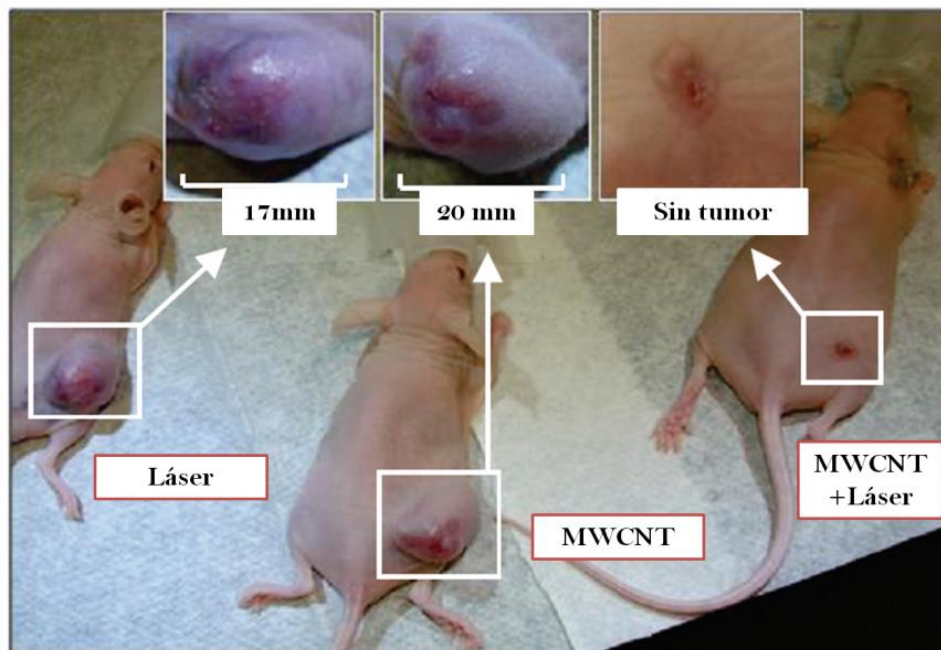


Figura 7. Terapia fototérmica basada en nanotubos de carbono. En la imagen se puede apreciar el efecto de la terapia y dos controles para comparación. MWCNT: nanotubos de carbono de pared múltiple. Imagen modificada de [40].

²⁸ Células humanas de cáncer cervical.

²⁹ Células de carcinoma hepatocelular humano.

La eficiencia de los NTC en TFiN también ha sido objeto de estudio en diferentes investigaciones, pues el incremento de temperatura en el tejido es un proceso complejo. El calor generado por los nanotubos está limitado por la potencia del láser, la penetración de la luz en el tejido, el tejido donde se dispersaron los nanotubos, la concentración de nanotubos en el tumor, la disipación del calor y el solvente en el que se dispersan los nanotubos antes y durante su administración [64]. Algunos investigadores han utilizado diferentes modelos físicos para modelar el proceso de absorción y disipación del calor para cuantificar la mínima zona de daño térmico en un tejido. Xie y su grupo usaron un modelo artificial (alginato) con NTC para estudiar el daño térmico que puede causar la terapia; ajustando diversos parámetros demostraron que los nanotubos son capaces de incrementar la temperatura de la muestra hasta los 25 °C con necrosis extendida a menos de 0.5 mm [83].

Otras investigaciones, han estudiado las propiedades ópticas y térmicas de las nanopartículas de carbono; por ejemplo, se ha demostrado que, los nanotubos de carbono multipared son 20-100 veces más eficientes como nanocalentadores que los nanotubos de una sola pared [40, 64]. Además, los nanotubos de carbono pueden lograr la temperatura de destrucción usando potencias láser menores que para nanovarillas de oro [100]. Asimismo, se ha observado que a bajas concentraciones de nanotubos se minimizan efectos de esparcimiento óptico y de agregación de las nanoestructuras [40]. La dispersión de los nanotubos también es importante para una terapia eficaz; su distribución en el tumor depende de las propiedades fisicoquímicas como su longitud, diámetro, número de paredes, superficie química, flexibilidad [64].

1.7.1.2. *Terapia fototérmica con nanopartículas de oro o terapia plasmónica*

Cuando una nanopartícula metálica es irradiada con luz, sus electrones oscilan y disipan energía por efecto Joule provocando el calentamiento de la nanopartícula; esta oscilación se denomina plasmón. Actualmente, los plasmones son ampliamente utilizados para generar calor en TFiN; a este tipo particular de terapia se le conoce como *terapia plasmónica* [19]. Existen diversas nanopartículas que pueden generar calor a través de plasmones, sin embargo, las nanoestructuras más empleadas para fines biomédicos son las nanopartículas de oro. Estas NPs ofrecen varias ventajas como una gran absorción en el visible e infrarrojo, con coeficientes de absorción mucho más grandes que la mayoría de tintes, y además es posible escoger la longitud de onda de absorción modificando la geometría (tamaño y forma) de la nanopartícula [13, 19, 44, 103]. Algunas de las principales ventajas del uso de NPs de oro son la sencilla síntesis, la baja toxicidad y la fácil bioconjugación superficial con biomoléculas, incrementando su biocompatibilidad. La funcionalización de las nanoestructuras de oro también previene su agregación e incrementan su tiempo de retención en la sangre [19, 69, 96, 103].

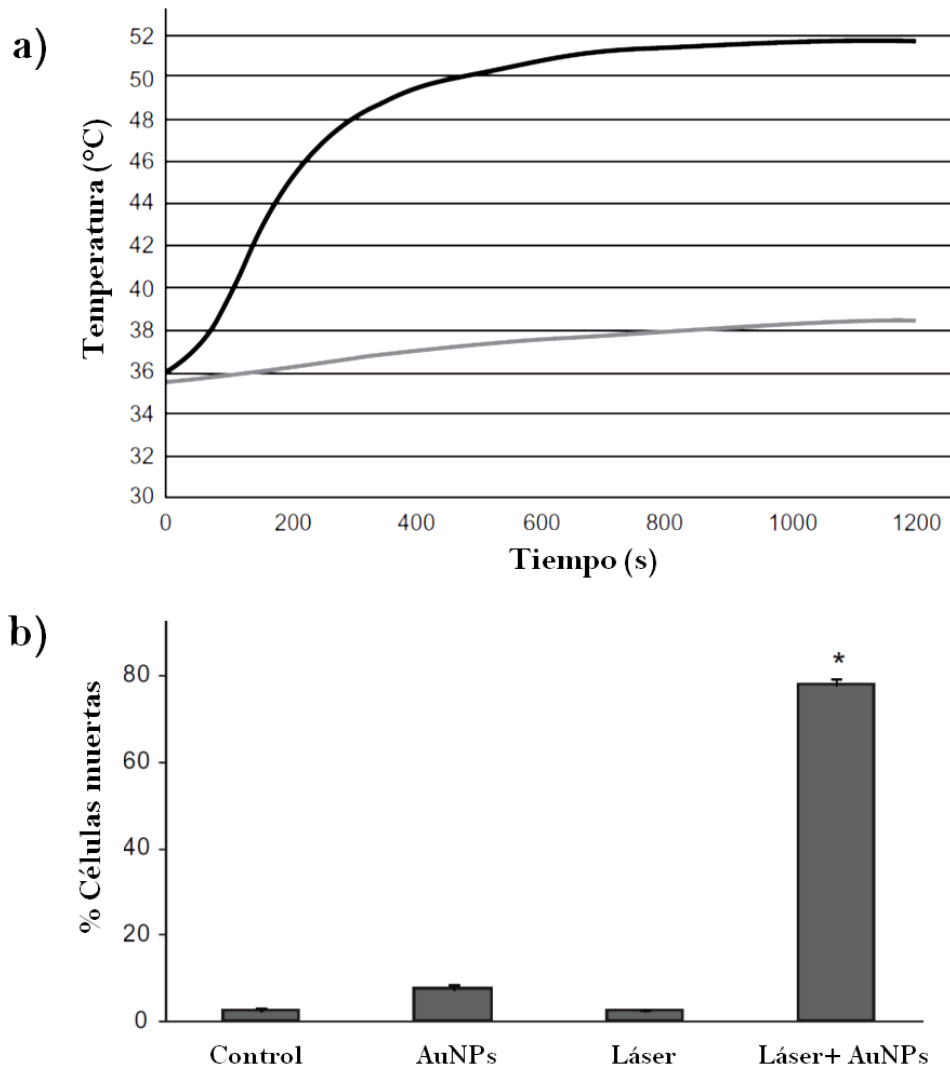


Figura 8. Terapia plasmónica, basada en nanopartículas de oro y luz. a) Incremento de la temperatura en un cultivo de células de astrocitoma humano al ser irradiado con luz láser (808 nm, 1.2 W de potencia y 20 minutos de irradiación); el cultivo fue incubado con (curva negra) y sin (curva gris) nanopartículas de oro (AuNPs). b) Mortalidad de las células después de la terapia. Imagen modificada de [38].

NPs de oro con diferentes geometrías se han utilizado para TFiN, por ejemplo, nanoesferas, nanovarillas, nanoprismas, nanocascarones huecos, nanocascarones de oro con núcleo de sílice, nanojaulas y NPs de oro-sulfuro de oro [96, 103, 104]. La efectividad de estas NPs se ha demostrado en tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*; por ejemplo, se han usado NPs de oro para destruir células tumorales de astrocitoma de humano en un cultivo celular, la terapia plasmónica disminuye la viabilidad celular al comprometer la integridad de la membrana de las células e inducir muerte por necrosis, ver figura 8 [38]. Li y sus colegas estudiaron el efecto de NPs de sulfuro de oro o NPs de oro recubiertas con quitosán

expuestas a luz infrarroja, en un modelo de adenocarcinoma esofágico en rata y en líneas celulares de cáncer de esófago humano, demostrando que existe una disminución de la viabilidad celular y la destrucción del tumor, principalmente a través de apoptosis [105]. Por su parte, Huang y sus colaboradores han utilizado nanovarillas de oro para eliminar cáncer en células epiteliales humanas en cultivos celulares mediante irradiación láser [106]. Asimismo, se ha mostrado la efectividad de la terapia plasmónica en células cancerosas K562 incubadas con NPs de oro, que al ser irradiada con pulsos cortos de luz (con una duración de nanosegundos) mueren; el daño celular depende del número de pulsos, la energía utilizada en cada pulso y del número de nanopartículas que contienen las células [19].

También, se han hecho experimentos con NPs de oro bioconjugadas. Por ejemplo, se ha estudiado el efecto de la TFiN en un modelo murino de cáncer de hígado mediante la inducción fototérmica con nanovarillas de oro recubiertas con polietilenglicol (PEG) [107]. Recientemente, se propuso la funcionalización de nanovarillas de oro con péptidos señal de localización nuclear para inducir la destrucción de tumores HeLa en ratones; gracias a la bioconjugación las nanovarillas se distribuyen en el nucleoplasma y la región perinuclear, mientras que varillas sin péptidos señal sólo se distribuyen en el citoplasma, esto provoca muerte celular por apoptosis debido a la hipertermia moderada intranuclear que daña de forma gradual e irreversible al ADN [99].

También se ha reportado que, para a bajas intensidades de radiación láser, con periodos de exposición de 20-30 min, las nanopartículas de oro pueden generar especies reactivas de oxígeno induciendo efectos citotóxicos, que se pueden alcanzar sin efectos térmicos [44, 103]. Por otro lado, la irradiación láser de NPs de oro a grandes potencias puede provocar muerte celular por cavitación debido a la onda de choque, esto se ha demostrado induciendo la muerte de linfocitos y macrófagos [19, 108].

1.7.2. Limitantes del uso de nanopartículas utilizadas en terapia fototérmica

Hoy en día, existe una gran controversia sobre el peligro latente del uso de NPs como agentes terapéuticos. Concretamente, se ha observado que al administrar NTC en roedores existe una respuesta inflamatoria y la formación de granulomas³⁰ (asociada a asbestos); también se ha reportado la formación de fibrosis³¹ y problemas de toxicidad como estrés oxidativo después de la administración de estas nanopartículas [64, 100, 101]. Asimismo, los NTC también pueden actuar como nanoagujas que se insertan en la membrana celular, penetrando la célula hasta el núcleo, y pudiendo llegar al ADN, adquiriendo un gran potencial genotóxico. En contraste, también existen otros estudios en los que no se ha observado ningún tipo de toxicidad para estas nanopartículas [40, 64]. Por otra parte, NPs inorgánicas como oro y óxido de hierro son particularmente problemáticas porque tienen

³⁰ Un granuloma es una masa formada por células del sistema inmune que aíslan una sustancia extraña cuando el sistema inmune no es capaz de eliminarla.

³¹ Es la formación anormal y excesiva de tejido fibroso en un órgano como consecuencia inflamatorio crónico.

una eliminación lenta fuera del cuerpo y aún se debate sobre sus efectos a largo plazo en el organismo [109]. Además, las NPs de oro no son biodegradables, por lo que no pueden ser digeridas por las enzimas de las células y como resultado hay iones metálicos que pueden ser altamente tóxicos [110].

Antes de utilizar NPs para algún tipo de tratamiento clínico existen diversos aspectos que se deben considerar como su toxicidad (biocompatibilidad), su biodistribución en el organismo, su destino final (si son expulsadas fuera del cuerpo o no) y los efectos a largo plazo que éstas pueden causar dentro del organismo si no son degradadas o expulsadas [101, 111, 112]. Estos fenómenos representan algunos de los retos más grandes y limitantes de la terapia TFiN y de la nanomedicina en general. Además, también existen problemas concretos como la distribución no específica de las NPs y su inadecuada acumulación (dentro del tumor y el tejido sano).

El diseño específico de NPs para aplicaciones específicas se ha convertido en un factor primordial para el desarrollo de terapias anticáncer, pues las propiedades fisicoquímicas de las NPs como su composición, geometría (tamaño y forma), su carga superficial y superficie química (grupos funcionales) afectan su biocompatibilidad, biodistribución y penetración intratumoral [54, 110], ver figura 9. Por ejemplo, la geometría de las NPs afecta su dinámica hemoreológica, su internalización dentro de la célula y su destino en organismo vivos [112]. Asimismo, NPs con alta energía superficial tienden a agregarse afectando su biodistribución [109]. Controlando la geometría, composición y bioconjugación³² de las NPs se puede modificar su biointeracción; por ejemplo, los efectos tóxicos de los nanotubos de carbono se reducen modificando su longitud, diámetro o cambiando químicamente su superficie [64, 101].

Por su parte, la eficacia de la TFiN no sólo depende de la composición y geometría de las NPs, sino que también se deben considerar la localización preferencial y/o retención de las NPs dentro del tumor y el lugar donde éstas se alojan, ya sea si es en el espacio intersticial del tejido, si se pegan a la membrana de las células o se internalizan [69, 96].

Existen dos maneras de administrar las NPs para que éstas lleguen al sitio de interés (tumor). La primera es mediante la administración sistémica, es decir, las NPs se inyectan de manera intravenosa y se esperan algunas horas a que viajen por el torrente sanguíneo y lleguen hasta el tumor. La segunda vía es un camino más simple donde las NPs se inyectan de forma directa en el tumor (vía intratumoral). Debido a esto, la TFiN también depende del tiempo seleccionado correctamente para irradiar al tumor después de la administración de las NPs [107], pues si se hace en tiempos precipitados las NPs podrían no haber llegado al blanco final y el efecto de la terapia sería inadecuado. Por ejemplo, Jiang y su grupo observan que existe una acumulación óptima de las NPs en el tumor (modelo murino de adenocarcinoma) después de 4 horas de inyectadas [101].

Cuando la administración de las NPs es vía sistémica éstas entran al organismo a través del torrente sanguíneo, viajan por el cuerpo a través de la sangre, donde inicialmente

³² Ligandos como moléculas pequeñas, péptidos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, ácidos nucleicos [110].

interactúan con el sistema fagocítico mononuclear (SFM)³³. Fagocitos del SFM (monocitos en sangre, macrófagos del bazo, nodos linfáticos, hígado, pulmones y piel) secuestran las NPs inmediatamente después de la inyección. Este proceso empieza con la opsonización³⁴ de las NPs, que consiste en la adhesión de proteínas de la sangre en la superficie de las NPs, formando una corona proteica que marca a las NPs con receptores específicos de fagocitos. Cuando las NPs llegan a órganos del SFM como hígado, bazo o piel, las NPs son internalizadas mediante la fagocitosis³⁵ [109, 112].

Mientras las NPs viajan por el torrente sanguíneo éstas no sólo son secuestradas por el SFM, sino que también empieza el proceso de depuración (eliminación) de las NPs del cuerpo, en órganos como hígado, bazo y riñones a través de filtración. NPs con tamaños menores a 8 nm son filtradas rápidamente por los riñones y expulsadas del cuerpo por la orina [54, 110, 112, 113]. El hígado por su parte depura las NPs de gran tamaño que no fueron eliminadas vía renal [54, 112]. Partículas con diámetros mayores a 2000 nm son eliminadas por el bazo [110, 112]. Por otra parte, partículas en el rango de 2-5 μm se acumulan en los capilares del pulmón [112]. 24 horas después de inyectar las nanopartículas la gran mayoría de éstas son secuestradas por el hígado, bazo, riñones y piel [109], ver figura 9.

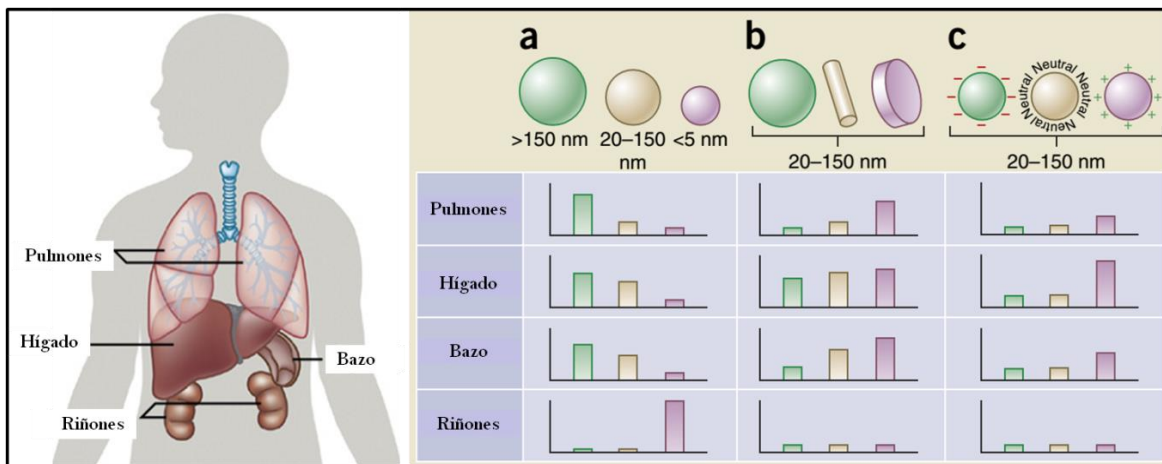


Figura 9. Biodistribución de las NPs en el organismo; las NPs se acumulan principalmente en pulmones, hígado, bazo y riñones. La biodistribución de las NPs en estos órganos dependen de su tamaño (a), forma (b) y carga superficial (c). Imagen modificada de [112].

³³ Consiste en células del sistema inmune (monocitos circulantes y macrófagos) que fagocitan (comen) cuerpos extraños, microorganismos o restos celulares, en este caso a las NPs.

³⁴ La opsonización es dependiente del tamaño, la carga superficial, superficie química e hidrofobicidad de la nanopartícula [54, 110, 112].

³⁵ La geometría y superficie química de las NPs influyen en la fagocitosis. Partículas pequeñas son fagocitadas más fácilmente que las partículas grandes [96, 114].

Las NPs que escapan del SFM, la depuración y la eliminación vía renal, y además logran llegar al tumor, son extravasadas al tejido maligno. Los vasos sanguíneos dentro de un tumor poseen paredes con grandes huecos (fenestraciones) entre células endoteliales, permitiendo que las NPs con el tamaño apropiado³⁶ pasen a través de ellas [54, 96, 109, 110, 112]. Una vez extravasadas las NPs interactúan con el microambiente tumoral que también limita su salida hacia el tejido maligno. No obstante, debido a un drenaje linfático disfuncional o ausente en los tumores, existe una acumulación de NPs (las que lograron extravasar) dentro del tumor (efecto EPR³⁷).

Por otro lado, el microambiente de un tumor no sólo está compuesto de células cancerosas, sino que además existen células del estroma³⁸, monocitos y macrófagos asociados al tumor, una compacta y densa red de matriz extracelular y vasos que conforman un red caótica y tortuosa [5, 54, 96, 109]. Además, dentro del tumor existe una presión del fluido intersticial alta que puede evitar la extravasación de NPs al tumor [96, 112]. La perfusión limitada debida a la vasculatura anormal también representa una barrera para la liberación de las NPs [54]. Asimismo, la vasculatura heterogénea y densa y la desigual red de matriz extracelular afecta la distribución y acumulación de las NPs, resultando en regiones con alta concentración del tumor [96]. Todos estos factores impiden la liberación correcta de las NPs hacia el tumor.

Finalmente, cuando las NPs llegan las proximidades de las células cancerosas, ya sea por administración sistémica o intratumoral, son internalizadas mediante endocitosis³⁹. Una vez dentro de las células las NPs son transportadas por las endosomas⁴⁰ hacia los lisosomas donde son degradadas enzimáticamente. Los restos de NPs no degradadas que permanecen después de la degradación enzimática (como por ejemplo metales nobles) son retenidas en las células y acumuladas en el hígado y bazo [109, 110, 112]. Si las NPs no son atrapadas mediante endosomas, éstas pueden escapar de la digestión enzimática (escape endolisosomal) y entrar en el citoplasma de las células. Una vez internalizadas las NPs pueden interactuar con la célula diana; si escapan de los lisosomas éstas pueden interactuar de forma directa con los organelos de la célula. NPs con tamaños de 20-200 nm presentan la mejor biodistribución y acumulación dentro del tumor [54, 76, 110].

Debido al complejo camino que hay desde el sitio de la inyección hasta el tumor un número reducido de NPs llega a las células diana (ver figura 10). Además, como resultado del SFM y la depuración de las NPs existe una distribución desfavorable entre el sitio del tumor y órganos como el hígado (ver figura 9) [109, 110]. Para contrarrestar este problema, se ha propuesto TFiN a través de múltiples inyecciones de NPs [107, 115]. Recientemente,

³⁶ El tamaño de las fenestraciones en las paredes de los vasos sanguíneos dentro de un tumor oscila entre 100-800 nm, dependiendo del tipo de tumor y su estadio, alcanzando tamaños $\leq 2 \mu\text{m}$ [54, 96, 110].

³⁷ Efecto de retención y permeabilidad aumentada (EPR: enhanced permeability and retention effect). Es la acumulación pasiva de NPs dentro de un tumor.

³⁸ Células de tejido conectivo compuesto de fibroblastos, miofibroblastos, glóbulos blancos, células endoteliales de capilares sanguíneos y linfáticos, pericitos y células de músculo suave [5].

³⁹ Mecanismo de internalización celular, mediante el cual las nanopartículas son rodeadas por la membrana plasmática formando una vesícula que es "engullida" por la célula [5, 110]. La fagocitosis es una forma de endocitosis.

⁴⁰ Vesícula formada en la endocitosis, mediante la cual una célula internaliza las NPs.

Bucharskaya y su grupo reportaron que la concentración de nanovarillas de oro dentro en un tumor aumentan notablemente después de 3 inyecciones intravenosas, y además el incremento de temperatura y la necrosis producida por TFi es comprable con los resultados obtenidos de una inyección intratumoral [107]. Sin embargo, múltiples inyecciones de NPs representan un riesgo pues aumentan la acumulación de éstas en diferentes órganos como el hígado y riñón.



Figura 10. Camino que siguen las NPs desde la inyección hasta su alojamiento en las células diana para las TFiN. Diferentes fenómenos biológicos limitan sustancialmente el número de NPs que llegan a las células de interés.

Todo lo anterior ha llevado al desarrollo de nuevas estrategias para trasladar de manera óptima a las NPs hasta los tumores durante TFiN. Por ejemplo, se ha propuesto recubrir

diferentes NPs con PEG, el cual reduce la toxicidad de la NPs (al minimizar la interacción entre la energía superficial de NP y la membrana de la célula), aumenta el tiempo de circulación de las NPs en el torrente sanguíneo (al reducir la opsonización) y mejora la acumulación dentro del tumor (por efecto EPR) [54, 100, 109, 110, 112]. Por ejemplo, Sobhani y su grupo han reportado la bioconjugación de NTC con PEG para mejorar su biocompatibilidad e incrementar la localización de estas NPs dentro del tumor [100]. El PEG también puede prevenir la agregación de las NPs, sin embargo, esto mejora la fagocitosis [114].

En los últimos años, han surgido otras propuestas para mejorar la biocompatibilidad, la acumulación de NPs dentro de los tumores y reducir los riesgos de éstas dentro del organismo, y usar sinérgicamente con la TFiN. Por ejemplo, se han usado NPs de sílice recubiertas de oro y funcionalizadas con VEGF⁴¹ para la eliminación de un glioma murino [104]. También se han empleado NPs biocompatibles de albúmina de suero de bovino conjugadas con una cianina sensible a pH, que bajo un ambiente ácido (6.2-7.5)⁴² el tinte modifica su estructura química y puede absorber fuertemente luz en el infrarrojo cercano, transformando la NP en un agente fototérmico [60]. NPs de magnesio que sirven como agentes fotoabsorbentes y son biodegradables [111]. Hidrogeles fotoabsorbentes⁴³ que se pueden degradar inyectando un quelante, y las NPs que contiene son secretadas del cuerpo vía secreción renal [115]. NPs de melanina camuflageadas con vesículas provenientes de membranas de glóbulos rojos que mejoran la retención en sangre y aumentan la acumulación en los tumores, además de ser biodegradables [101]. Nanovarillas de oro funcionalizadas con péptidos señal de localización nuclear para que las NPs se internalicen hasta el núcleo de las células [99]. Nanotubos de carbono oxidados recubiertos con PEG como agentes fotoabsorbentes no tóxicos; los nanotubos oxidados presentan menor toxicidad en comparación con los nanotubos y si éstos son recubiertos con PEG se disminuye aún más su toxicidad [100].

Otra opción importante que ha sido presentada en los últimos años es el uso de células inmunes como vehículos para transportar NPs dentro tumores. Por ejemplo, macrófagos cargados con NPs de oro han sido utilizados para transportar activamente estas NPs hasta el tumor en un modelo de glioma murino [96]. También, se han usado estas células para NPs núcleo-coraza de sílice-oro dentro de células tumorales (C6 de rata y esferoides) y en un modelo *in vivo* de cáncer cerebral en ratas [114].

Hoy en día, la terapia fototérmica representa una gran alternativa como tratamiento anticáncer pues permite una terapia más local, eficiente y sin efectos secundarios tan agresivos comparado con las reacciones adversas de otras terapias. Diversas investigaciones han demostrado su efectividad en distintos modelos que van desde cultivos celulares hasta pruebas clínicas exitosas. Además, la tecnología actual permite llevar la luz a casi cualquier parte del cuerpo y así llegar al tumor. Sin embargo, aún hay retos que enfrentar como utilizar láseres de alta potencia, que significa un costo de inversión grande;

⁴¹ Factor de crecimiento endotelial vascular.

⁴² El ambiente extracelular alrededor de las células cancerosas tiene un pH < 6.5 [60].

⁴³ Hidrogel de alginato y calcio para inmovilizar NPs de platino en dendrímeros.

no obstante, la nanotecnología ha permitido diseñar NPs a demanda y su uso hace más eficiente el proceso de conversión fototérmica, permitiendo por ejemplo utilizar láseres de muy baja potencia. No obstante, al utilizar NPs para estos fines se deben considerar que éstas sean biocompatibles (minimizar toxicidad), si es posible sean biodegradables, tengan diámetros entre 30-200 nm para promover larga (retención) circulación y mejorar la acumulación dentro del tumor, también deben tener una alta eficiencia fototérmica.

Planteamiento del problema y objetivos

“Si al principio la idea no es absurda, entonces no habrá ninguna esperanza para la misma”.

Albert Einstein (1897-1955)

2.1 Planteamiento del problema

Los diferentes tipos de cáncer se han convertido en una de las enfermedades con mayor mortalidad para la población mundial; además, cada vez un mayor número de personas se ve afectada por dicho padecimiento. Existe un gran número de tipos de cáncer diferentes, sin embargo, los tumores de sistema nervioso central (principalmente intracraneales) deterioran la vida del paciente de forma muy rápida y grave, además de tener una alta mortalidad. Su tratamiento generalmente consiste en la extirpación parcial del tumor complementado con radioterapia y quimioterapia. Sin embargo, no todos los tumores responden a estos tratamientos; además existen tumores que son de difícil acceso para el neurocirujano o son inoperables por su localización anatómica.

Nuevas alternativas para combatir los cánceres han surgido, su objetivo es la destrucción completa y selectiva del tumor reduciendo los efectos secundarios de la terapia, mejorando así la supervivencia del paciente y su calidad de vida. Una de estas terapias alternas es la terapia térmica, que usa calor para la destrucción de tejido maligno. Además, dependiendo de la cantidad de calor utilizado la muerte de las células cancerosas se puede modular entre apoptosis y necrosis. Existen diversas formas de administrar calor a los tumores; sin embargo, utilizar luz para generar calor (terapia fototérmica) ofrece ventajas como un control muy preciso del calor generado en un área pequeña, permitiendo atacar de forma precisa al tumor y reducir el daño al tejido sano circundante. Además, la luz puede ser transportada por fibras ópticas al interior del paciente permitiendo llegar a lugares de difícil acceso como el cerebro, debido al tamaño reducido de las fibras.

Combinando la terapia fototérmica con nanopartículas es posible tener un efecto aumentado y confinamiento del calor haciendo más eficiente la terapia fototérmica. Sin embargo, las nanopartículas son administradas vía inyección intratumoral o intravenosa, y aún existe una gran controversia por la toxicidad y destino final de las nanopartículas dentro del cuerpo humano debido a la falta de estudios concluyentes.

Este trabajo busca evaluar el daño en tejido biológico después de aplicar terapia fototérmica mediante microcalentadores de fibra óptica. Los microcalentadores utilizan nanopartículas confinadas en la punta de una fibra óptica, aprovechando las propiedades fototérmicas de éstas. El confinamiento de las nanoestructuras permite la aplicación de la terapia fototérmica sin necesidad de inyectar las nanopartículas vía sistémica o en el sitio de interés. Con ello, se busca proponer una solución contra tumores de difícil acceso, como los tumores intracraneales, ya que los microcalentadores de fibra óptica tienen ventajas adicionales como su tamaño, que los hace ideales para ser usados mediante cirugía mínimamente invasiva o a través del uso de catéteres y el uso de nanopartículas permite utilizar potencias ópticas bajas y tiempos de aplicación cortos en comparación con otros sistemas donde se utilizan fibras ópticas para terapia fototérmica.

2.2 Hipótesis

La terapia fototérmica inducida a través de microcalentadores de fibra óptica puede generar calor controlado para inducir muerte celular por apoptosis o necrosis de manera precisa, minimizando el daño al tejido sano.

2.3 Objetivos

2.2.1. *Objetivo general*

Evaluar el uso de microcalentadores de fibra óptica como posibles inductores de apoptosis en un modelo murino *in vivo*, y determinar su potencial como herramienta para tratamientos de terapia fototérmica intersticial.

2.2.2. *Objetivos particulares*

- Fabricar microcalentadores de fibra óptica que sean aptos para aplicaciones biológicas.
- Cuantificar la temperatura producida por los microcalentadores.
- Evaluar el tipo de lesiones que los microcalentadores inducen en tejido de ratón.
- Caracterizar el tamaño de la lesión obtenida en función de los parámetros del láser.
- Verificar que exista muerte celular inducida por el calor generado a través de los microcalentadores.
- Evaluar la posibilidad de inducir apoptosis en cerebro de ratón mediante el uso de los microcalentadores.

Microcalentadores de fibra óptica como inductores de terapia fototérmica

“No he fracasado. He encontrado 10 mil formas que no funcionan”.

Thomas Alva Edison (1847-1931)

3.1. Introducción

Como se mencionó anteriormente, existen diversas técnicas para elevar localmente la temperatura de un tejido y con ello inducir la muerte de las células cancerosas que conforman un tumor. Una forma de termoterapia que ha tomado fuerza en las últimas décadas es la terapia fototérmica (TFt), que consiste en la conversión de luz (láser) en calor. Utilizar este tipo de energía para calentar ofrece ventajas frente a otros métodos, por ejemplo, un control espacio-temporal muy preciso, permitiendo elevar la temperatura de un tejido en regiones ≤ 1 cm y de manera rápida (segundos); además, la luz se puede transportar a través de fibras ópticas, permitiendo alcanzar tumores inoperables o de difícil acceso a través de cirugía mínimamente invasiva. Sin embargo, esta conversión de calor está limitada a la cantidad de luz que pueden absorber las moléculas que constituyen los tejidos; para producir el incremento de temperatura deseado se necesita utilizar láseres de alta potencia (≥ 2 W) y/o tiempos de terapia prolongados (≥ 15 minutos) [43, 88, 89, 116-118]. Los sistemas láser de alta potencia son costosos, en comparación con láseres de baja potencia (≤ 1 W), y generalmente necesitan sistemas de enfriamiento para su correcto funcionamiento. Además, tiempos de terapia prolongados aumentan los riesgos o problemas que pueden ocurrir durante una cirugía.

Una forma novedosa de TFt ha resuelto estos problemas permitiendo utilizar láseres de baja potencia y tiempos de irradiación cortos. La técnica consiste en usar nanopartículas (NPs) como agentes fototérmicos exógenos (Terapia fototérmica inducida con nanopartículas, TFiN). Esta combinación ofrece ventajas como emplear partículas de tamaño nanoscópico que transforman luz en calor de manera muy eficiente, creando nanocalentadores; también se puede elegir la longitud de onda del láser para que el tejido sea transparente a esta luz y sólo sea absorbida por las NPs, evitando el daño al tejido sano que rodea al tumor y que no contenga nanopartículas. No obstante, el uso de NPs también involucra problemas debido a que su administración dentro del organismo es a través de inyecciones intravenosas o intratumorales. Complicaciones relacionadas al uso de NPs para TFiN son su toxicidad, biodistribución, destino final y los efectos a largo plazo en el organismo. Nuevas propuestas buscan solucionar o aminorar los inconvenientes relacionados con estos biofenómenos, por ejemplo, utilizar NPs biodegradables o células que transporten las NPs hasta el tumor.

La terapia fototérmica como alternativa clínica en oncología busca utilizar binomios láser-agentes fototérmicos que sean eficientes y accesibles, es decir, combinaciones de láseres y NPs, que consideren longitud de onda y potencia del láser, los materiales y geometría de las NPs, para maximizar la conversión fototérmica a través del uso de equipos y materiales asequibles, sin olvidarse de la biocompatibilidad y biodegradación de las NPs. Además, es deseable que se pueda controlar la temperatura alcanzada durante la terapia.

En este capítulo se presenta un dispositivo óptico de dimensiones submilimétricas que puede generar calor por efecto fototérmico con materiales y equipo accesibles, además de

ser capaz de contener a las nanopartículas en el mismo dispositivo sin tener que administrarlas al organismo mediante inyecciones. Este dispositivo, que puede ser utilizado para terapia fototérmica, está basado en tecnología de fibras ópticas y nanopelículas de diferentes materiales que convierten de manera eficiente la luz en calor y puede ser utilizado para terapia fototérmica.

3.1.1. Microcalentadores de fibra óptica

El efecto fototérmico inducido mediante nanopartículas ha sido utilizado desde hace algunos años para diferentes aplicaciones además de la terapia fototérmica. Estas aplicaciones van desde calentar muestras, hasta la producción de fuentes de ultrasonido o micromaquinado láser. Una aplicación particular de este fenómeno es la evaporación local de un medio, específicamente la generación de burbujas de tamaño micrométrico en líquidos. Estas microburbujas son utilizadas en diversas aplicaciones [95].

Para lograr la evaporación local de un medio líquido y con ello la formación de las burbujas se ha propuesto adherir NPs fotoabsorbentes en puntas de fibras ópticas. Las NPs absorben la luz que escapa por un extremo de la fibra óptica¹ (FO) convirtiéndola en calor. Las NPs aumentan el efecto fototérmico de manera muy eficiente, alcanzando grandes temperaturas por medio de luz láser de baja potencia (< 1W). Debido a las reducidas dimensiones que tienen las fibras ópticas (diámetros 100-600 μm), éstas actúan como fuentes "puntuales" de calor permitiendo crear dispositivos térmicos altamente localizados. A estos dispositivos se les conoce como *microcalentadores de fibra óptica* (μFO), convertidores optotérmicos de fibra óptica o puntas calientes (de fibra óptica).

Distintas NPs se han empleado para desarrollar μFO , por ejemplo, se han utilizado NTC o NPs de plata para evaporar localmente metanol [119]; también se han usado NTC para generar una microburbuja en agua desionizada² [120], ver figura 11a. La conversión fototérmica es tan eficiente que permite evaporar medios altamente viscosos como aceite de silicón [95, 121].

No obstante, existen otros materiales que pueden ser depositados en las puntas de las fibras ópticas además de nanomateriales para crear μFO . Estos materiales pueden ser películas metálicas, materiales amorfos altamente absorbentes y cristales fotoabsorbentes. Dependiendo del material adherido a las fibras ópticas, incluyendo NPs, las temperaturas alcanzadas por los μFO pueden ir de unas decenas de grados centígrados hasta temperaturas mayores a los 1000 °C.

¹ La fibra óptica consiste en un filamento de sílice con un índice de refracción grande, recubierto de la misma sílice con un índice de refracción menor. Al filamento interno se le conoce como núcleo y el recubrimiento se le conoce como revestimiento. La fibra óptica estándar tiene un diámetro de 125 μm y un núcleo de 8 μm .

² Los autores de este trabajo proponen utilizar la microburbuja para monitorear la temperatura o flujo en un microcanal.

De forma análoga, se han utilizado μ FO con películas metálicas para generar microburbujas en diferentes medios (ver figura 11); por ejemplo se ha demostrado el uso de un μ FO con una película de galio (9 nm) y óxido de silicio para producir microburbujas en nitrógeno líquido [122], un μ FO (basado en una fibra óptica adelgazada³) recubierto con platino (100 nm) para la evaporación local de agua [123] y un μ FO fabricado con una película de titanio (50-300 nm) para producir microburbujas en microcanales⁴ [124].

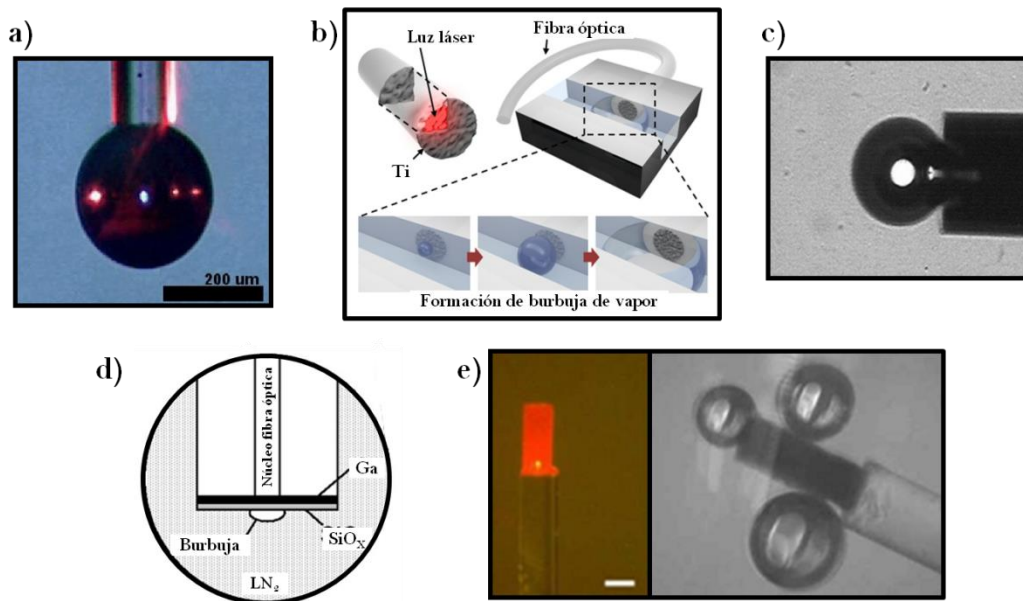


Figura 11: Microburbujas producidas en diferentes líquidos utilizando microcalentadores de fibra óptica. El efecto fototérmico se consigue pegando un material fotoabsorbente en la punta de una fibra óptica. Por ejemplo, se pueden emplear NPs de carbono (NTC) (a), películas metálicas de titanio (b), platino (c) o galio (d), o un cristal de silicio (e). Imágenes tomadas y modificadas de [119, 122-125].

Recientemente, se ha propuesto el desarrollo μ FO con cristales fotoabsorbente fusionado a la punta de una fibra óptica [125, 126]. Este tipo de μ FO pueden alcanzar temperaturas de cientos de grados centígrados; por ejemplo, un microcalentador con un cristal de silicio (10 o 200 μ m de grosor), puede alcanzar temperaturas mayores a 1000 °C en aire [125].

³ Fibras ópticas utilizadas para microscopía óptica de barrido de campo cercano. En estudios teóricos se ha demostrado que una de estas fibras con un recubrimiento de aluminio (100 nm) es capaz de alcanzar temperaturas de 250 °C [127].

⁴ En este caso en particular, la microburbuja es empleada para bloquear el flujo de líquido que fluye a través de un microcanal, funcionando así como válvula permitiendo detener el flujo del microcanal por completo.

También, se han usado elementos amorfos para fabricar μ FO como carbón⁵ [128, 129], dióxido de titanio y óxido de erbio [130].

Los μ FO no sólo han sido empleados para generar microburbujas, también se ha propuesto su uso para diferentes aplicaciones biomédicas, ver figura 12. Actualmente, encontramos ejemplos como un μ FO hecho con NPs de zinc para cauterizar y coagular (60 °C) la arteria de una rata [131], un μ FO hecho con una mezcla de grafito y resina, para mejorar el corte de la piel de una rata (escalpelo láser) [132] y una fibra óptica con un cristal de granate de aluminio-itrio dopado con neodimio (Nd:YAG) que es capaz de calentar agua a 49.5 °C e hígado de cerdo (*ex vivo*) a 79 °C [126]. Además, se han utilizado μ FO con recubrimientos hechos con tinta negra, los cuales han sido aprovechados para activar la expresión de genes en embriones y larvas de pez cebra [133] o perforar la zona pelúcida⁶ de un ovocito con fines de fertilización *in vitro*⁷ [134].

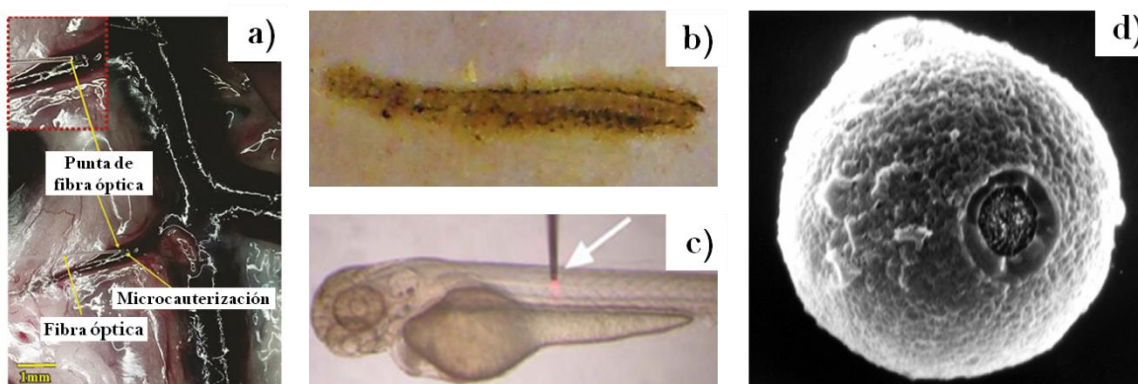


Figura 12: Aplicaciones biomédicas en donde se utilizan los microcalentadores de fibra óptica: a) cauterización local en arterias de rata, b) corte de piel de rata (escalpelo láser), c) activación de genes en pez cebra y d) perforación de la pared de un ovocito para fertilización *in vitro*. Imágenes tomadas y modificadas de [129, 131, 133, 134].

Debido a las características de los μ FO como su conversión fototérmica, la incorporación de nanopartículas en su fabricación, las temperaturas que se pueden alcanzar con láseres de baja potencia y principalmente a su diminuto tamaño, en este trabajo se propone el posible uso de estos dispositivos para generar destrucción tisular selectiva. En las siguientes secciones se presentan el diseño y evaluación de cuatro tipos de μ FO que son estudiados para su uso como herramienta en terapia fototérmica.

⁵El depósito de carbón se hace quemando un pedazo de corcho. La punta de una fibra óptica se pone en contacto directo con el corcho y se hace pasar luz de gran potencia a través de la fibra óptica. Residuos de carbón quedan pegados en la punta de la fibra óptica que entró en contacto con el corcho.

⁶ Es la capa exterior que rodea el ovocito de los mamíferos.

⁷ En esta investigación no utilizan una fibra óptica, sino un capilar de vidrio para crear el microcalentador.

3.2. Metodología

3.2.1. Diseño de microcalentadores de fibra óptica para terapia fototérmica

Los NTC y las NPs de oro son los nanomateriales más utilizados para el desarrollo de herramientas en Tft; además, algunos μ FO han sido fabricados utilizando un depósito de NTC para generar el efecto fototérmico. De esta manera, en este trabajo se propone la creación de μ FO con depósito de NTC y NPs de oro para su posterior uso en terapia fototérmica. Los microcalentadores que se fabricaron y fueron evaluados en este trabajo fueron los siguientes:

1. μ FO con NTC (μ FO-NTC),
2. μ FO con NPs de oro (μ FO-NPAu),
3. μ FO con NTC y cubierta protectora de oro (μ FO-NTC-Au),
4. μ FO con nanopelícula de oro (μ FO-Au).

El primer tipo de microcalentador ya ha sido utilizado para generar calor de forma controlada y localizada [119], por esta razón se planteó replicarlo para evaluarlo como herramienta para Tft.

Por otro lado, debido a los problemas relacionados con toxicidad que pudiera representar el uso de NTC (ver capítulo 1), se propuso sustituir estas nanopartículas por NPs de oro debido a su biocompatibilidad. En este caso se obtuvo un microcalentador similar al μ FO-NTC, pero con NPs de oro.

Por otra parte, se propuso recubrir los NTC del μ FO-NTC con una capa delgada de oro. Con esta capa se buscó proteger los NTC evitando así el contacto directo entre los NTC y el tejido biológico a tratar, reduciendo los problemas de toxicidad. En este caso, se eligió oro como material de protección debido a su biocompatibilidad, su alto coeficiente de conductividad térmica, su gran adhesión a las fibras ópticas, su amplio uso en Tft y su fácil depósito a través de la técnica de sputtering (también conocida en español como pulverización catódica o espurreo)⁸.

Finalmente, también se diseñó un microcalentador con una capa delgada de oro en lugar de utilizar NPs de este metal, similar al μ FO-NTC-Au pero sin depositar NTC previamente. Esta propuesta se hizo en base a que algunos de los μ FO presentados en la sección anterior utilizan una capa metálica delgada en lugar de NPs [122-124]. Nuevamente, el oro se seleccionó como material fototérmico por su biocompatibilidad, su conductividad térmica y su gran adhesión a las fibras ópticas.

⁸ Esta técnica consiste en la deposición de átomos de oro sobre un sustrato, permitiendo el crecimiento de películas de espesor nanométrico.

3.2.2. Fabricación de los microcalentadores de fibra óptica

- ▶ **μFO-NTC:** Los microcalentadores de fibra óptica con depósito de nanotubos de carbono (μFO-NTC) consisten en una fibra óptica recubierta de una película de nanotubos de carbono en su punta. Su fabricación es muy sencilla, y se basa en el depósito ópticamente impulsado de los NTC [95]. Dicha técnica consiste en sumergir un extremo de una fibra óptica (SMF-28e, Corning) en una solución de NTC multipared (Sigma Aldrich, 724769) suspendidos en etanol, ver figura 13. Antes de la inmersión de la punta de la fibra óptica en la solución, ésta fue limpiada y cortada para obtener una superficie plana. A continuación, luz láser fue enviada a través de la fibra. La luz que escapa de la fibra atrae a los nanotubos que están suspendidos en el etanol hasta la superficie de la fibra óptica, donde quedan adheridos. Posteriormente, la fibra se saca de la solución y se deja secar el etanol, obteniendo el μFO. En este caso, se utilizó un diodo láser (Thorlabs, PL980P330J, con $\lambda=975$ nm) como fuente de luz y el depósito de los NTC se hace utilizando una potencia de salida de 137 mW y un tiempo de depósito de 240 s para garantizar una película de NPs adecuada [135].
- ▶ **μFO-NPAu:** Los microcalentadores de fibra óptica con depósito de nanopartículas de oro (μFO-NPAu) son similares a los μFO-NTC. También se utilizó la técnica de depósito de NPs ópticamente impulsadas, sólo que en este caso se sustituyeron los NTC por las NPs de oro (Sigma Aldrich, 742015). Las NPs se encuentran estabilizadas en un amortiguador de citrato, para evitar la formación de cúmulos de NPs. Anterior al depósito la punta de la fibra óptica se limpió y cortó para obtener una superficie plana. El depósito se hace utilizando las mismas condiciones utilizadas para el depósito de NTC ($\lambda=975$ nm, $P=137$ mW, $t=240$ s), ver figura 13.
- ▶ **μFO-NTC-Au:** Los microcalentadores de fibra óptica con depósito de nanotubos de carbono y recubrimiento de oro (μFO-NTC-Au) se fabricaron cubriendo un μFO-NTC con una capa delgada de oro (~10 nm), ver figura 14 y 15a. El oro es depositado sobre los NTC por medio de un equipo de sputtering (Cressington Sputter Coater, 108auto⁹) utilizando una presión en la cámara de 0.1 mbar y una corriente de 40 mA. Previo al depósito la punta de la fibra óptica se limpió y cortó para obtener una superficie plana.

⁹ El equipo sputtering utilizado permite depositar películas de oro con una resolución de 0.1 nm de grosor (dependiendo del manejo del operador).

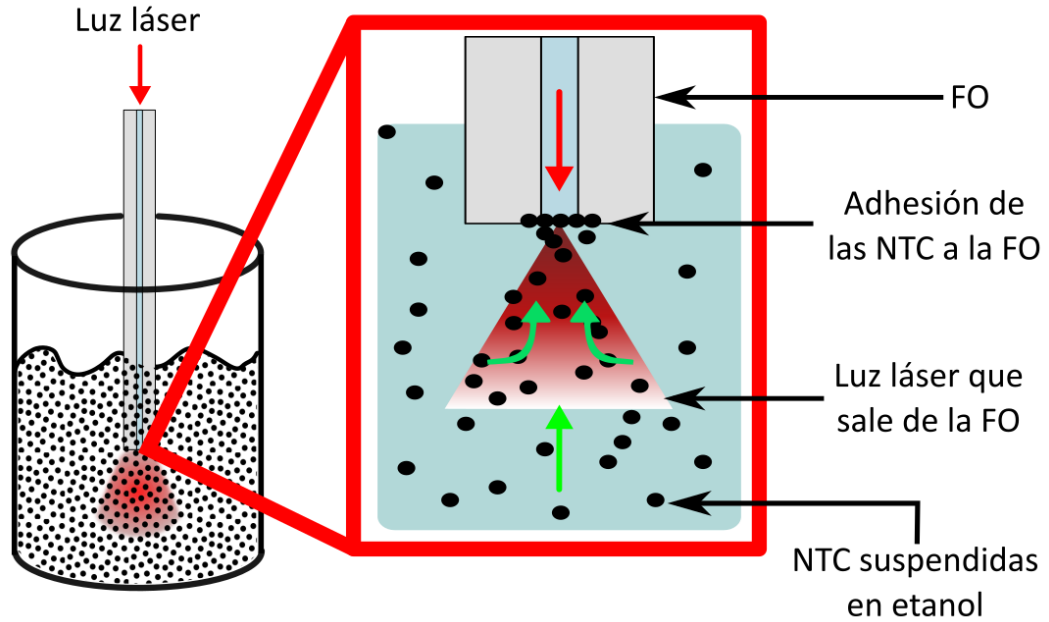


Figura 13: Arreglo experimental para la fabricación de un μ FO-NTC. Los NTC se adhieren a la punta de la fibra óptica. El depósito se hace utilizando un láser de 975 nm y potencia de salida de 137 mW durante 4 minutos. Este mismo arreglo es usado para fabricar los μ FO-NPAu, sustituyendo los NTC por NPs de oro. NTC: nanotubos de carbono, FO: fibra óptica.

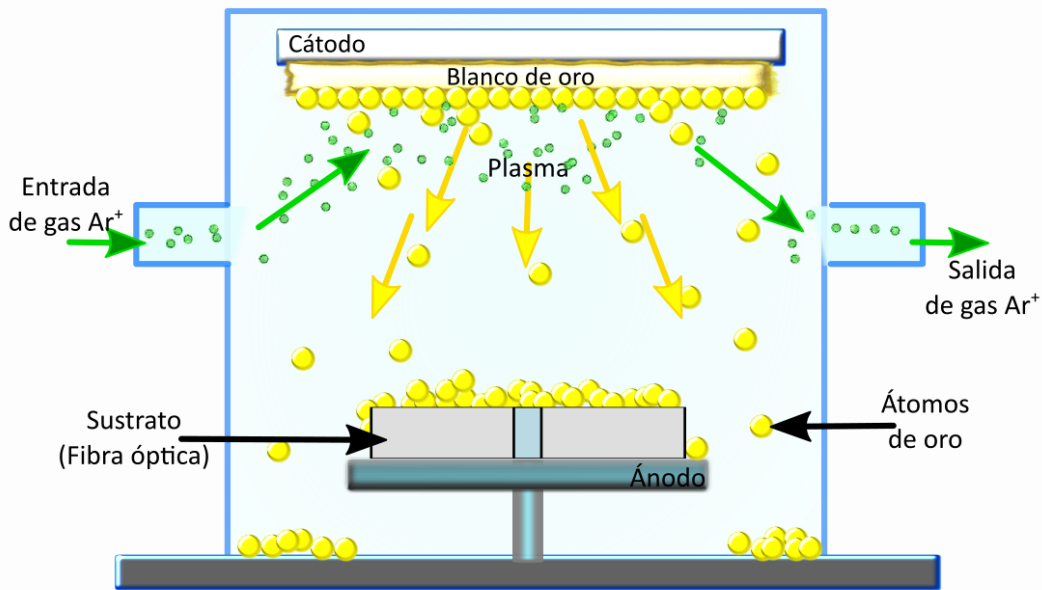


Figura 14. Esquema del depósito de oro por sputtering. El sistema consiste en una cámara de vacío donde iones de gas argón son acelerados debido a la presencia de un voltaje muy intenso. Los iones de argón chocan con un blanco de oro, causando la eyección de material (oro). El material desprendido cae sobre la superficie del sustrato (fibra óptica).

- **μ FO-Au:** Para la fabricación de un microcalentador de fibra óptica con película de oro (μ FO-Au) se depositó una capa delgada de dicho metal sobre la superficie transversal de la punta de una fibra óptica. Anterior al depósito, la punta de la fibra óptica se limpió y cortó para obtener una superficie plana. El depósito de oro se realizó de igual manera que para los μ FO-NTC-Au, depósito de oro (~ 10 nm) a través de un sistema sputtering (0.1 mbar y 40 mA), ver figura 15b.

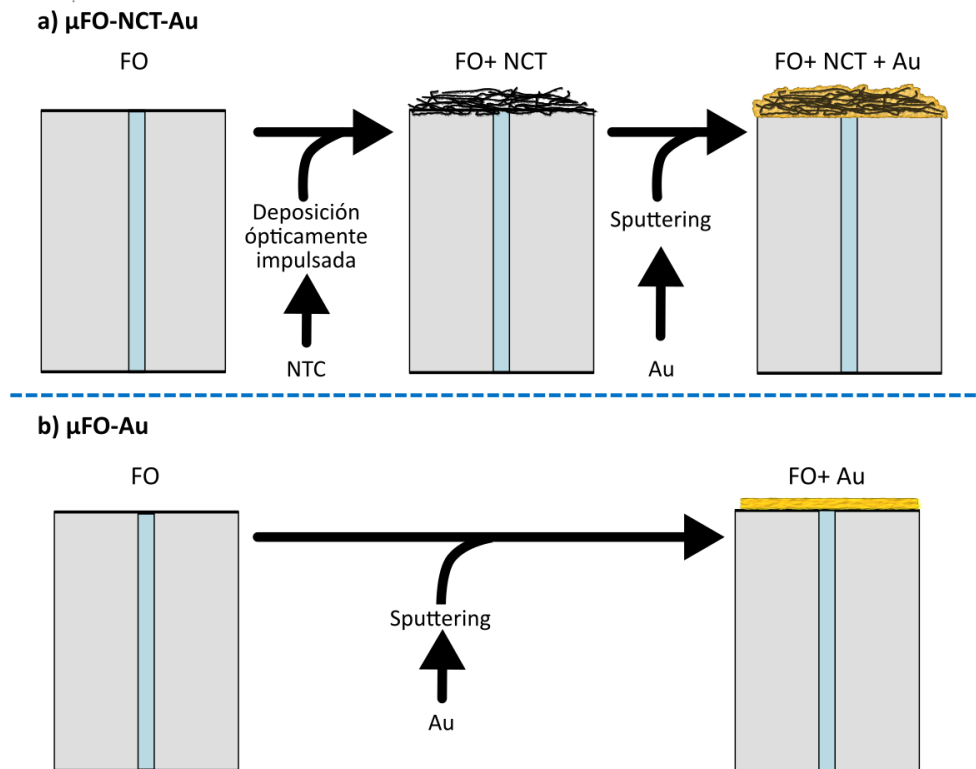


Figura 15. Esquema de la fabricación de los μ FO con recubrimiento de oro. En el esquema se observa la punta de una fibra óptica (FO) y la película fototérmica depositada sobre su punta para la creación de un μ FO-NTC-Au (a) y μ FO-Au (b). El depósito de oro se hace mediante la técnica de sputtering (ver figura 14).

3.3. Resultados y discusión

En la figura 16 se puede observar fotografías de un microcalentador de fibra óptica. La figura muestra un cable de fibra óptica comercial que consiste en una fibra óptica con una conexión (adaptador metálico) en un extremo, y en el lado contrario se tiene la punta de la

fibra óptica (recuadro rojo, figura 16a), a la cual se le depositan NPs y/o recubrimiento de oro (figura 16c). Como se puede notar el microcalentador tiene un tamaño muy compacto, lo que permite introducirlo en agujas de diferentes calibres¹⁰ (figura 16d).

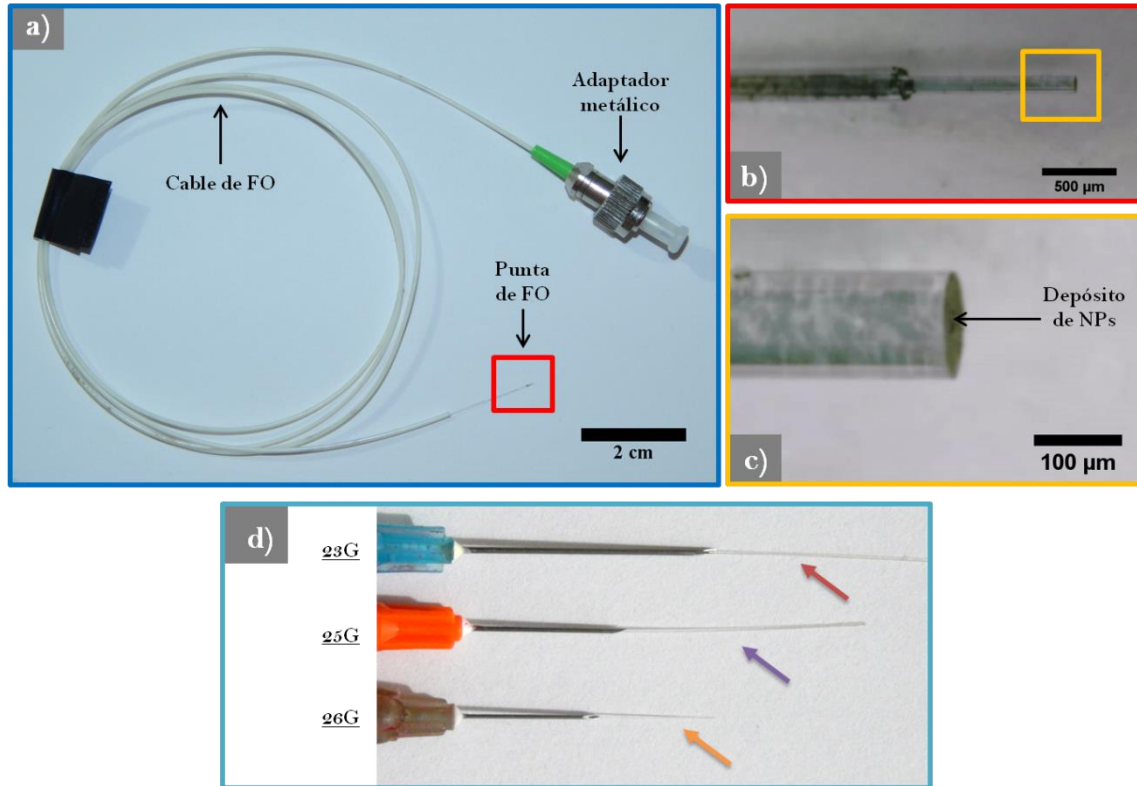


Figura 16. Microcalentador de fibra óptica., consiste en un cable de fibra óptica comercial (a) con un depósito de NPs en un extremo. En (b) y (c) se pueden ver acercamientos de la punta de la fibra óptica (recuadro rojo). El tamaño del microcalentador permite introducirlo a través de agujas de diferentes diámetros (flechas). FO: fibra óptica, NPs: nanopartículas.

3.3.1 Caracterización de las películas fototérmicas en los μ FO

El desempeño de los μ FO depende principalmente de la adhesión que hay entre los agentes fototérmicos utilizados (NPs o película delgada) y las fibras ópticas. Entre mejor sea la adhesión, mejores resultados se obtendrán para llevar a cabo la Tft, debido a que si no existe una buena adhesión no habrá un número suficiente de NPs que conviertan la luz en calor y por lo tanto, el incremento de temperatura no será óptimo u homogéneo; asimismo,

¹⁰ El diámetro de una aguja o catéter se suele medir en gauge (G). 23 G = 0.337 mm, 25 G = 0.26 mm y 26 G = 0.127 mm.

las NPs podrían desprenderse del microcalentador quedando en el tejido biológico, pudiendo causar problemas de toxicidad.

Una vez fabricados los diversos tipos de microcalentadores de fibra óptica, se procedió a la observación de su superficie a través de microscopía electrónica de barrido¹¹ (SEM; JEOL, 7600) para verificar que existiera un depósito de nanopartículas o una película de oro sobre la punta de la fibra óptica. Los resultados obtenidos se pueden contemplar en la figura 17. En ella se puede ver la superficie de los distintos microcalentadores de fibra óptica obtenidos en comparación con la superficie de una fibra óptica sin nanoestructuras.

Como se ha mencionado, la técnica de depósito de NPs ópticamente impulsadas fue la utilizada para la fabricación de los μ FO-NTC. A través de esta técnica las nanopartículas se adhieren al sustrato de sílice (fibra óptica) por fuerzas electrostáticas y de van der Waals [95]. En la figura 17 (segunda fila, columna dos) se observa que los NTC sí se adhieren a la fibra óptica, y que se pegan en mayor proporción en el núcleo de la fibra (círculo verde en la figura). También se puede notar que se pega una gran cantidad de NTC en toda la superficie de la fibra óptica.

Por otro lado, se observó que las nanopartículas de oro, a pesar de ser depositadas por la misma técnica¹², tienen una muy mala adhesión con el dióxido de silicio que conforma a las fibras ópticas, por lo que el depósito se pierde. De 15 muestras que se llevaron al microscopio electrónico de barrido (SEM) para su análisis, en ninguna fibra se observó NPs de oro adherida. Esta es la razón por la cual en la figura 17 no se incluyen micrografías del μ FO-NPAu. Debido a esta mala adhesión partículas-sustrato se abandonó la idea de utilizar estas nanopartículas de oro para el diseño de microcalentadores fibra óptica.

Con respecto a los recubrimientos de oro, se puede mencionar que para el caso de los μ FO-NTC-Au, los NTC son recubiertos por el oro depositado mediante el sistema sputtering. En la figura 17 se puede observar que existe un recubrimiento homogéneo de oro con algunos espacios vacíos sobre el área transversal de la fibra óptica (fila tres, columna dos). Al hacer un acercamiento (fila tres, columna tres) se observan que el oro se pega a los NTC (comparar con NTC sin oro; fila dos, columna tres), en la figura se puede notar el incremento de tamaño de los NTC debido al oro que los rodea. Analizando la superficie de estos microcalentadores con más detalle, se pueden distinguir que existen dos zonas (resaltadas con colores falsos en la figura 18); por un lado, se observan los NTC recubiertos con oro (en morado) y, por otro lado, se nota el recubrimiento de oro que recubre sólo la superficie de la fibra óptica (en verde).

¹¹ Se recurrió a diversos equipos para el estudio de la superficie de los microcalentadores, sin embargo, debido al tamaño de éstos sólo el SEM arroja datos sobre la superficie de las muestras. Los μ FO tienen un área superficial muy grande para ser observados a través de microscopía de fuerza atómica. Además, la medición de los recubrimientos implica varias dificultades técnicas a superar como colocar correctamente los microcalentadores para su visualización o análisis en diferentes equipos.

¹² En trabajos previos se observó que NPs de distintos materiales (como plata y dióxido de silicio) se adhieren a la fibra óptica al ser depositadas mediante la técnica de depósito de partículas ópticamente impulsadas [95]. Debido a estos resultados previos se infirió que las NPs de oro se pegarían a las fibras ópticas, por fuerzas de van der Waals.

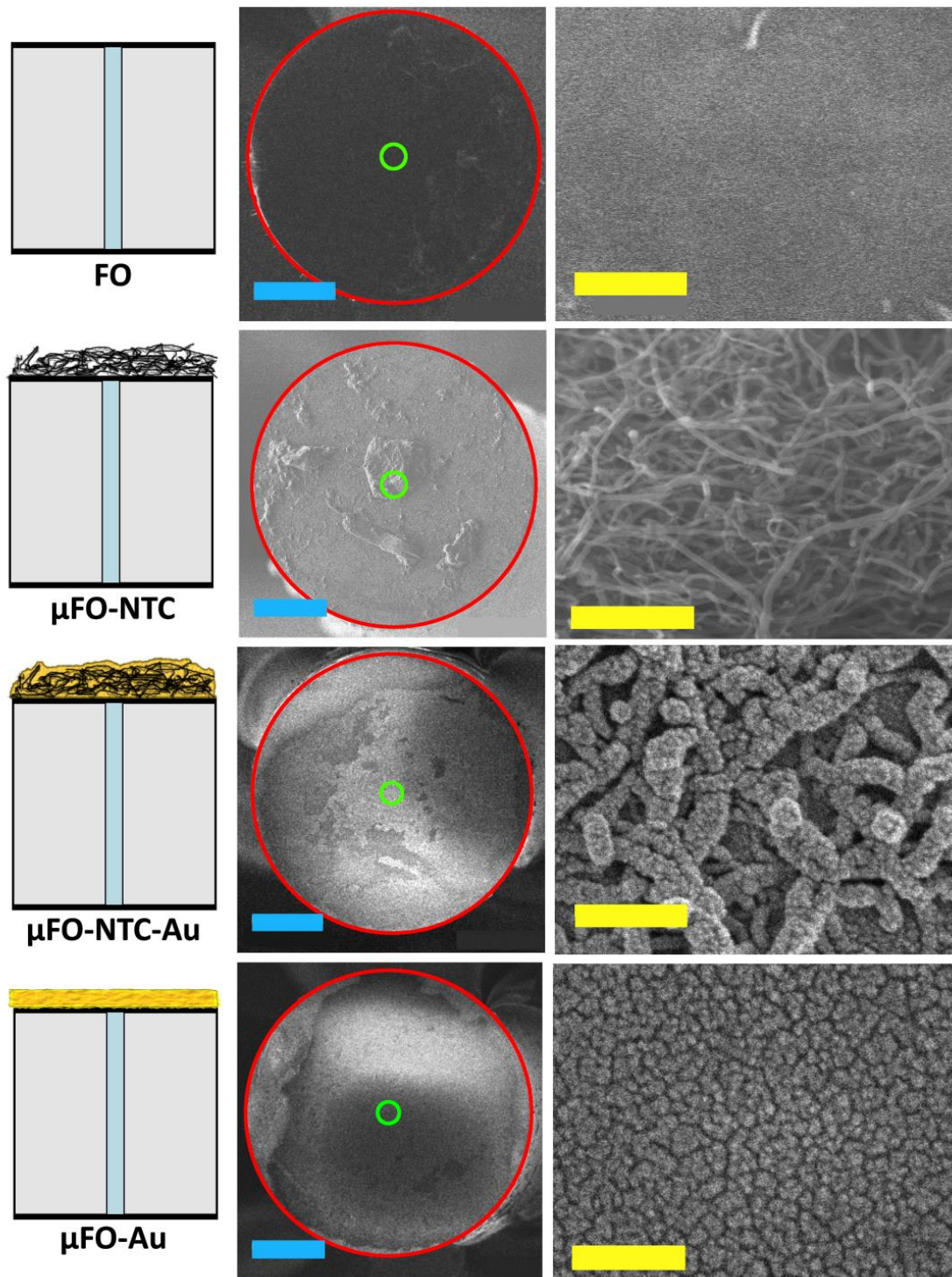


Figura 17. Microscopía electrónica de barrido de la superficie de los μ FO comparada contra una fibra óptica sin nanoestructuras. En la primera columna se puede ver un esquema del μ FO. En la segunda columna se observa una micrografía frontal de la superficie de los microcalentadores. La tercera columna muestra un acercamiento de las nanoestructuras depositadas o el recubrimiento

que tienen los μ FO. El círculo rojo delimita el área de la FO (125 μ m) y con el círculo verde se señala el núcleo de la FO (8 μ m). Barras de escala: 30 μ m (azul) y 250 nm (amarilla).

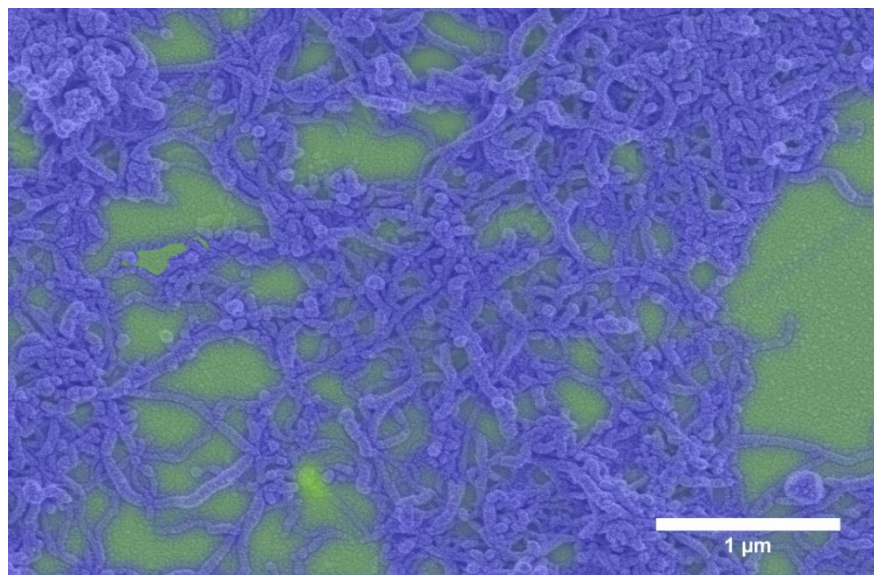


Figura 18. Micrografía SEM de un μ FO-NTC-Au. Se puede observar distintas zonas localizadas sobre la superficie del microcalentador, en morado se distinguen los NTC recubiertos por el oro, en verde se resalta el recubrimiento de oro sobre la superficie de la fibra óptica. La imagen corresponde a un acercamiento de la superficie del microcalentador mostrado en la figura 17, fila tres y columna dos.

Por último, en los μ FO-Au podemos notar un recubrimiento casi homogéneo en la mayor parte de la superficie de la fibra óptica. Sin embargo, si se observa un acercamiento de este recubrimiento, se puede apreciar que el oro no forma una capa uniforme, sino que está compuesta de cúmulos muy grandes y muy próximos (a las que nos referiremos como *nanoislas*). Esto se debe al proceso de depósito del oro; los átomos de oro se unen para formar cúmulos pequeños que crecen en función de la coalescencia con cúmulos vecinos y que forman pequeñas islas¹³, ver figura 17 (fila cuatro, columna tres). En las imágenes se observan islas de tamaño pequeño debido a que sólo se depositaron 10 nm de oro¹⁴ y no hay suficiente material depositado para crear una película uniforme (un recubrimiento liso y uniforme en espesor).

¹³Si se continúa depositando material, entonces las islas pequeñas se unen para formar islas grandes hasta formar una película homogénea, que posteriormente sólo aumenta de espesor.

¹⁴El espesor de la película se monitorea con un sensor piezoresistivo dentro de la cámara de vacío del sistema sputtering.

3.3.2. Pruebas de adhesión

Un aspecto importante que debe ser evaluado para utilizar estos microcalentadores de fibra óptica en terapia fototérmica es si el depósito de NPs o el recubrimiento de oro son permanentes, es decir, no se desprenden material al contacto con el tejido. Para valorar la adhesión material fototérmico-fibra óptica se recurrió a una prueba simple de fricción¹⁵.

La prueba consistió en deslizar la punta de un μ FO contra una toalla de papel libre de pelusas (kimwipe) y que está impregnada con un poco de acetona (figura 19). Esta prueba se eligió porque típicamente las puntas de fibra óptica se limpian de esta manera, el polvo y grasa que pueden estar pegados a la superficie de la fibra óptica se retiran por este método. Además, en trabajos previos se observó que para los μ FO-NTC este método es efectivo para remover una gran cantidad de los NTC de la superficie de la fibra óptica [95]. Posteriormente, a la prueba de fricción la punta del μ FO fue observada nuevamente en el SEM.

Como ya se ha mencionado, para el caso de los μ FO-NTC la adhesión entre los nanotubos de carbono y la superficie de la fibra óptica, se debe principalmente a fuerzas electrostáticas y de Van der Waals, que provocan enlaces físicos y no químicos entre los dos materiales. Debido a esto, los depósitos de nanotubos no son permanentes y se pierden debido a fricción entre el microcalentador y otra superficie (toalla de papel).

Por otro lado, se observó que para el caso del μ FO-NTC-Au el recubrimiento de oro mejora la adhesión entre los nanotubos de carbono y la superficie de la fibra; sin embargo, este recubrimiento no provee una capa protectora permanente, debido a que la superficie de la FO está en primer contacto con los NTC (enlaces temporales) y el oro se encuentra sobre éstos.

¹⁵ Para evaluar la adhesión entre el material depositado y la fibra óptica se buscó algún equipo que nos permitiera hacer ensayos similares a las pruebas de rayado, donde una punta desgasta (raspa) la superficie de un material. Sin embargo, por las dimensiones del microcalentador no se pudieron utilizar las pruebas de rayado estándar (para materiales macroscópicos) porque el μ FO es muy pequeño para ser analizado en esos equipos. Tampoco se pudieron realizar microscopio de fuerza atómica (materiales nanoscópicos) donde la superficie del μ FO es muy grande.

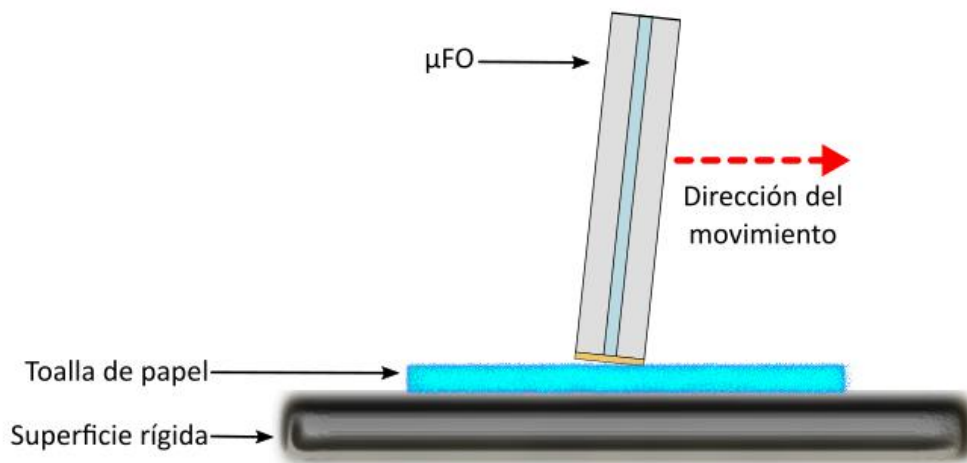


Figura 19. Prueba de fricción para evaluar la adhesión entre las NPs (o recubrimiento de oro) y la superficie de la fibra óptica para los diferentes μ FO.

Finalmente, para los microcalentadores recubiertos solamente por oro, se no observó alteración sobre los recubrimientos después de la prueba de fricción, permaneciendo intactos. Entonces el recubrimiento de oro permite obtener una capa fototérmica permanente sobre la superficie de la fibra óptica. Para verificar esto, se realizó una prueba a través de un equipo de perfilometría (KLA Tencor D-600) donde se realizaron pruebas de rayado, para trayectorias de 50 μ m de largo con todas las configuraciones de fuerza y no se observó daño sobre la superficie.

3.3.3. Pruebas cualitativas de calor

Un punto muy importante que también se verificó fue si los microcalentadores realmente eran capaces de generar calor o no. En esta sección sólo se presenta una prueba cualitativa para demostrar este punto, debido a que en el siguiente capítulo se presentará un análisis más detallado sobre el calor generado por estos dispositivos.

Para que un μ FO sea capaz de generar calor es necesario que una fuente de luz ilumine el recubrimiento fototérmico que se depositó en éste. Entonces, un μ FO es activado, es decir, se calienta cuando se hace pasar luz láser dentro de la fibra óptica que lo compone. La luz láser que viaja a través de la fibra óptica es absorbida por el recubrimiento fototérmico en el extremo del μ FO, resultando en generación de calor en su punta. Para activar un μ FO, el extremo opuesto de éste fue conectado a un diodo láser infrarrojo acoplado a fibra óptica (Thorlabs, PL980P330J, $\lambda=975$ nm). Posteriormente, el láser infrarrojo fue encendido, y con ello el μ FO fue activado.

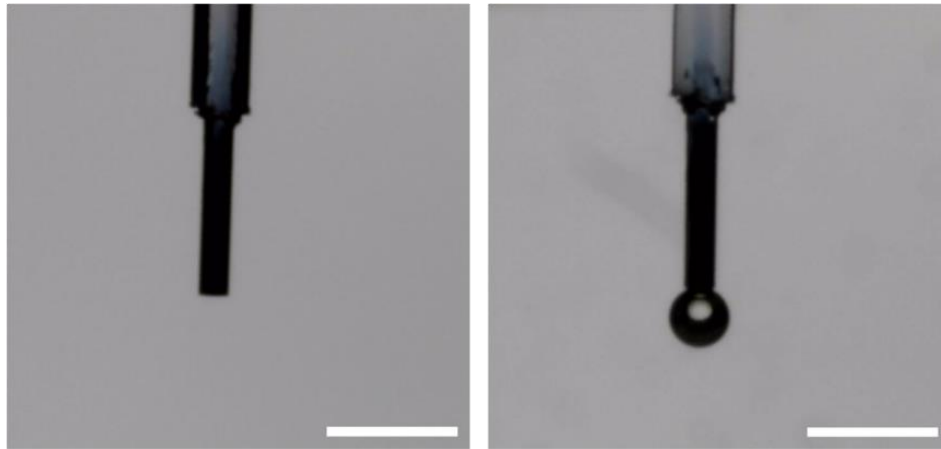


Figura 20. Prueba cualitativa de calor para evaluar la capacidad térmica de los μ FO. Un μ FO fue sumergido en agua y posteriormente fue activado; el calor generado provocó una microburbuja. En este caso particular se observa un μ FO-Au no activado (izquierda) y una burbuja en su punta después de su activación (derecha). Barra de escala: 500 μ m.

En este caso, sólo se hicieron pruebas cualitativas de calor para verificar si los diferentes tipos de μ FO fueron capaces de generar calor. Esto se confirmó sumergiendo cada μ FO dentro de agua, al activar el μ FO el agua fue evaporada localmente generando microburbuja en la punta del μ FO. La figura 20 muestra un ejemplo de la generación de una microburbuja en un μ FO-Au.

3.3.4. Discusión

En general, se observó que se pueden fabricar diversos tipos μ FO a través del depósito de un material fototérmico sobre la superficie de la fibra óptica. Dependiendo del tipo de microcalentador, la adhesión entre las partículas fototérmicas y el sustrato puede ser o no permanente. Para el μ FO-NPAu la adhesión fue nula, mientras que para el μ FO-NTC los nanotubos se adhieren de forma temporal a la fibra, pero pueden desprenderse por contacto entre el microcalentador y otra superficie. Por su parte, el recubrimiento de oro si mejora la adhesión de los NTC en el μ FO-NTC-Au, sin embargo, se observó desprendimiento de la película de NTC y recubrimiento de oro, en menor proporción. Para los μ FO-Au los resultados mostraron que el depósito fue permanente. La tabla 3 resume las características de los μ FO que fueron evaluadas.

Microcalentador de fibra óptica	Generación de calor	Material sobre la superficie de la FO	Pérdida de material en la prueba de fricción	Útil para Terapia Fototérmica
μ FO-NTC	✓	✓	✓	✗
μ FO-NPAu	✓	✗	---	✗
μ FO-NTC-Au	✓	✓	~	~
μ FO -Au	✓	✓	✗	✓

Tabla 3. Resumen de las pruebas hechas a los μ FO para evaluar su posible uso en terapia fototérmica.

Los resultados mostraron que el efecto fototérmico neto en los microcalentadores es reproducible, es decir, todos los dispositivos fabricados fueron capaces de generar calor; sin embargo, debido a las limitaciones técnicas de equipo no fue posible estudiar a detalle y de forma sistemática la reproducibilidad de los recubrimientos en cada tipo de los microcalentadores de fibra óptica, es decir, que todos los μ FO tuvieran recubrimientos con características similares (espesor). En el caso de los μ FO-Au, el espesor de la nanopelícula de oro fue determinado por el sensor del equipo sputtering, y no fue posible medir el espesor de la película en el microscopio electrónico de barrido o en el equipo de perfilometría.

Por otra parte, se observó que existen zonas vacías (sin depósito de material fototérmico) en la superficie de los μ FO. No obstante, lo que realmente importa para llevar a cabo la terapia fototérmica es que el núcleo de la fibra esté recubierto por el material deseado, tal y como se aprecia dentro de los círculos verdes en la figura 17. El efecto fototérmico en los μ FO se da cuando el material fototérmico (NPs o nanopelícula de oro) absorbe la luz que viaja por la fibra óptica. En la superficie de un μ FO la luz escapa de la fibra óptica por su núcleo (8 μ), entonces sólo las NPs que recubren el núcleo son las que se calientan en primera instancia, después las NPs (o nanoislas de oro) calientes transfieren calor a las NPs vecinas, y posteriormente toda el área cubierta por material fototérmico del μ FO se calienta. La figura 21 muestra un esquema de este fenómeno.

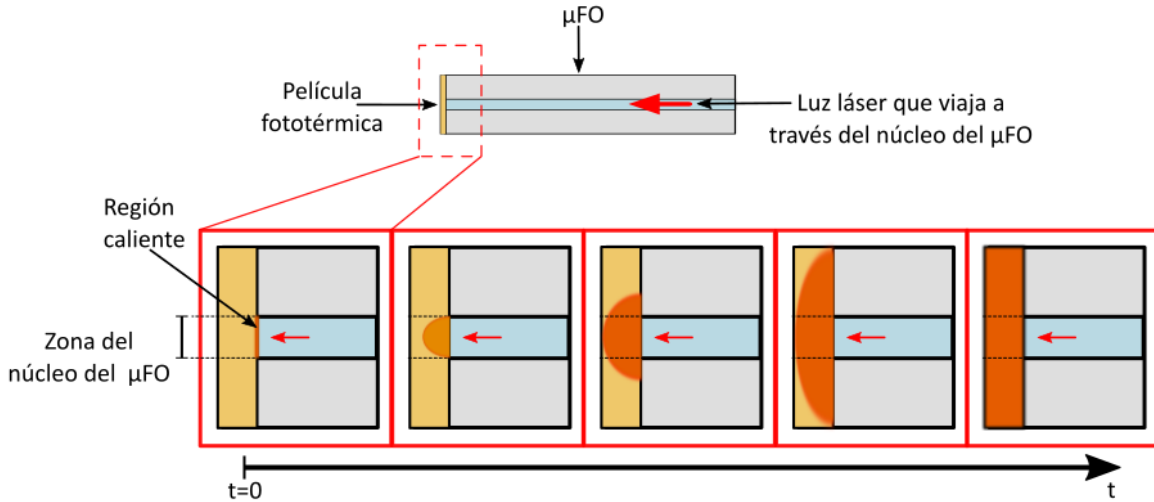


Figura 21. Evolución temporal del calentamiento de un μ FO. Cuando la luz escapa del núcleo de la fibra óptica sólo calientan las NPs que recubren esta región. Posteriormente las NPs vecinas se calientan por transferencia del calor. El calor se conduce por toda la película fototérmica que recubre el μ FO.

Finalmente, de las pruebas realizadas se concluye que el mejor candidato para ser utilizado en terapia fototérmica es el microcalentador con recubrimiento de oro, debido a que éste es capaz de generar calor por efecto fototérmico y el recubrimiento de oro se adhiere de forma permanente a la fibra óptica, evitando así el riesgo de toxicidad por desprendimiento dentro del material al tejido biológico. Además, por la técnica de depósito utilizada, el oro recubre de manera casi completa o en su totalidad la superficie de la fibra óptica, con lo cual se obtiene un calor más homogéneo sobre la superficie del μ FO.

Medición del calor generado durante la activación fototérmica de los microcalentadores de fibra óptica

“La necesidad es la madre de la invención”.

Anónimo

4.1. Introducción

Para que la terapia fototérmica (TFt) sea exitosa se necesita una administración de calor precisa, homogénea y localizada, con esto se incrementa la temperatura del tejido diana correctamente y se puede minimizar o evitar el daño colateral al tejido sano circundante. Los microcalentadores de fibra óptica (μ FO) representan una herramienta capaz de generar calor de la manera antes mencionada. Sin embargo, es necesario determinar la temperatura que alcanza cada μ FO durante la TFt, tanto en la superficie del microcalentador como en su vecindad, ya que esto permitirá determinar los parámetros exactos del láser (potencia láser de activación¹) para una correcta aplicación de calor. La elección del tipo de microcalentador y los parámetros del láser a utilizar durante la terapia deben definirse a través de una curva térmica característica. En particular, es necesario obtener una relación entre la temperatura generada en el dispositivo y la potencia de activación del láser. Con esto es posible determinar los parámetros de operación adecuados para obtener rangos térmicos entre 42-46 °C y con ello inducir apoptosis en las células malignas.

Debido a la reducida dimensión de los microcalentadores (125 μ m de diámetro), cuantificar la temperatura alrededor de éstos no es una tarea sencilla. Para la correcta medición de temperatura en estos dispositivos fototérmicos es necesario un termómetro capaz de cuantificar cambios térmicos a escalas micrométricas (con una resolución deseable de 10 μ m) y que además, sea capaz de generar un mapa de temperaturas, es decir, que el elemento de medición sea lo suficientemente pequeño para tomar mediciones en diferentes puntos y con ello determinar cómo se distribuye el calor en diferentes puntos de la zona caliente. La mayoría de los termómetros que son accesibles comercialmente no tienen la resolución espacial necesaria para ser utilizados en este experimento². Por este motivo, se procedió a utilizar una técnica termométrica empleada para la determinación de temperatura en sistemas micrométricos, dicha técnica se conoce como termometría de fluorescencia inducida por láser (TLIF).

¹ Se hará referencia como *activación de un μ FO* o directamente como *μ FO activado*, cuando se mencioné que un μ FO genera calor. Para que esto suceda es necesario enviar luz láser a través del μ FO, esta luz se caracteriza por tener una potencia óptica asociada. A dicha se le denominará *potencia laser de activación* o simplemente *potencia de activación*.

² Como primera aproximación se exploró utilizar termómetros comerciales de tamaño compacto (dimensiones de milímetros) para medir la distribución de temperatura de un μ FO. Se usaron dos tipos de termómetros un termistor y un RTD, sin embargo, éstos son demasiado grandes en comparación con un μ FO, por lo que no se obtuvieron mediciones de temperatura locales.

4.1.1. Termometría de fluorescencia inducida por láser

Tecnologías nacientes a escalas submilimétricas, tales como los sistemas microfluídicos o plataformas *lab on a chip*, han dado paso al estudio de fenómenos térmicos a microescala, los cuales se vuelven muy relevantes en estas dimensiones espaciales. Para estudiar dichos fenómenos es necesario contar con termómetros diminutos que no sólo midan la temperatura de interés, sino que también permitan visualizar el fenómeno térmico. Entonces, es deseable que un *microtermómetro* cuente con una gran resolución espacial, una resolución de temperatura adecuada y una baja inercia térmica³ para medir rápidamente, siendo la resolución espacial el principal reto de estos termómetros.

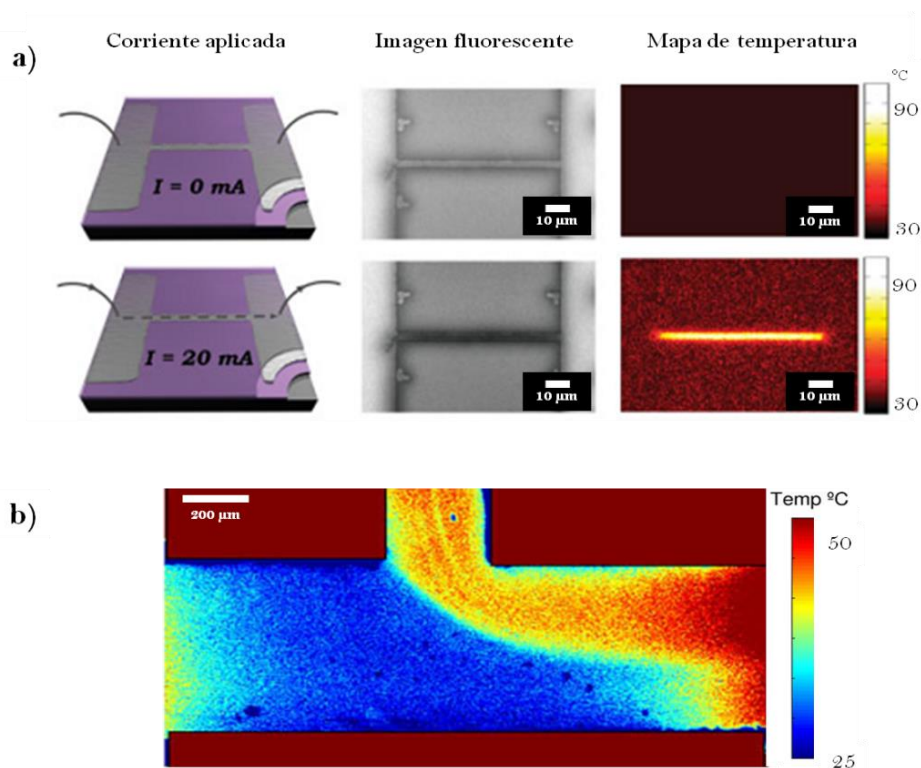


Figura 22. Termometría fluorescente utilizada para determinar la temperatura en sistemas micrométricos. Mapa térmico de (a) un microcalentador resistivo y (b) de un líquido dentro de un microcanal. Barra de escala 10 μm (a) y 200 μm (b). Imágenes modificadas de [136] y [137].

Hoy en día existen diversas técnicas para medir la temperatura a microescala permitiendo obtener mediciones con una gran resolución espacial ($<1 \mu\text{m}$) y una resolución térmica muy aceptable ($<0.1 \text{ }^\circ\text{C}$) [138]. Una de las técnicas más utilizadas, por las diferentes ventajas que ofrece es la *termometría fluorescente* [139]. Dicha técnica emplea una configuración

³ La inercia térmica indica la cantidad la velocidad con la que un cuerpo puede ceder o absorber calor. A baja inercia térmica el cuerpo se calienta o enfría más rápido.

experimental muy sencilla, pues solamente requiere de una cámara de video (CCD o CMOS) comercial con la cual se pueden obtener mapas de temperatura de áreas grandes (milímetros) a un costo relativamente bajo [139, 140]. Esta técnica ha sido utilizada, por ejemplo, para mapear la temperatura dentro de microcanales [137, 140-143], cuantificar la temperatura en la superficie de microcalentadores resistivos [136, 144] o determinar la temperatura en una trampa óptica [145], ver figura 22.

La técnica de termometría fluorescente se basa en medir la fluorescencia de un tinte cuya intensidad decae en función de la temperatura. La fluorescencia del tinte se mide a través de fotografías adquiridas por medio de una cámara de video (ver figura 22a). La resolución espacial de la técnica depende del sistema de magnificación óptica (objetivo de microscopio) y la resolución temporal es definida por la velocidad de adquisición entre cuadros de la cámara (framing rate) [139, 140, 142, 143]. De esta manera, es fácil obtener mapas de temperatura con resolución espacial $< 1 \mu\text{m}$ y con resolución temporal de aproximadamente 30 ms. Cuando la fuente de luz con la que se excita el tinte es un láser, la técnica recibe el nombre particular de *termometría fluorescente inducida por láser* (TLIF) [139, 146].

Existen varios tintes orgánicos utilizados para esta técnica, sin embargo, la rodamina B (rB) es la más utilizada [138, 139, 143, 145]. Generalmente, este tinte es disuelto en algún líquido como agua o algún solvente orgánico (alcohol), pero también puede ser depositado en seco sobre la superficie de interés o ser mezclado con algún polímero para crear películas. La intensidad de fluorescencia de la rB decae 2.3%/K en agua y 1.45%/K en etanol [139, 142, 145]; al utilizarla en seco se evita que su fluorescencia dependa del solvente. Por ejemplo, Löw y su grupo depositan películas en seco sobre la superficie de un microcalentador resistivo (figura 22a) [136]. Asimismo, diversos grupos han incorporado este tinte en matrices poliméricas para la fabricación de películas fluorescentes; se han creado películas de SU8/rB⁴ [144] y polidimetilsiloxano⁵ (PDMS/rB) [140, 141, 146-148].

Para este trabajo, el tinte fluorescente elegido fue la rB, que se incorporó en películas delgadas (membranas) de polidimetilsiloxano (PDMS) para la fabricación de un material óptico sensible a los cambios de temperatura. Estas membranas permiten el manejo de las muestras de forma sencilla; además, al incorporar el tinte en PDMS se evita una dependencia de la intensidad de fluorescencia de las muestras en función del solvente utilizado, por ejemplo, agua, alcohol o algún tampón biológico.

⁴ SU8 es una resina fotosensible muy utilizada para la fabricación de patrones y estructuras de tamaño micrométrico.

⁵ Polidimetilsiloxano (PDMS) es un polímero flexible, transparente y biocompatible ampliamente usado en la fabricación de microcanales y sistemas lab on a chip.

4.2. Metodología

4.2.1. Fabricación de membranas PDMS-rB

En investigaciones previas, se ha propuesto la incorporación de la rodamina B en películas delgadas de PDMS (del orden de cientos de μm de grosor) a través de la adsorción del tinte⁶ por los poros del polímero [147] o la incorporación de la molécula fluorescente en PDMS funcionalizado⁷ [140]. En este trabajo se propuso utilizar agitación mecánica para la incorporación del tinte en la matriz polimérica; este método ha sido utilizado previamente para incorporar NPs de carbono dentro de PDMS [149].

El proceso de fabricación de las membranas termosensibles fue el siguiente. La rodamina B en polvo (Sigma Aldrich, R6626) se incorporó en el material base del PDMS⁸ (Dow Corning Sylgard 184) mediante agitación mecánica. Para los experimentos que se reportan en este trabajo, la rB se agregó al PDMS en una concentración de 0.1% en peso. A continuación, se agregó 1 mL de cloroformo por gramo de PDMS con el fin de reducir la viscosidad del polímero y que la rB se incorporase fácilmente en el PDMS. La mezcla se revolvió a temperatura ambiente con ayuda de un agitador magnético durante dos horas. Posteriormente, la mezcla se continuó agitando a 70 °C para evaporar el cloroformo en su totalidad. Después se agregó el agente curante a la mezcla y se agitó manualmente por 5 minutos. La nueva mezcla fue vertida en un molde y calentada a 60 °C por 24 horas. Una vez solidificada, la membrana fue desmoldada

4.2.2. Control de temperatura

Para poder cuantificar la temperatura de los μFO , primeramente, se debe obtener una curva de calibración que indique cómo se modifica la intensidad de fluorescencia de las membranas de PDMS-rB en función de un incremento de temperatura. Por tal motivo, es importante contar con un sistema que permita controlar la temperatura de la muestra con una buena precisión (<1 °C). En este trabajo se usó un control electrónico (control PID⁹) para calentar y enfriar con precisión una resistencia eléctrica.

El sistema de control térmico utilizado consta de un enfriador termoeléctrico (Thorlabs, TEC3-6), un calentador resistivo (Thorlabs, HT24S) y un termistor (Thorlabs, TH10K), que fueron montados sobre un disipador metálico y aislados térmicamente del medio a través

⁶ Un pedazo de PDMS es inmerso en una solución de rB por 1-2 días.

⁷ Se utiliza alil-glicidil-éter para enlazar químicamente la molécula de rB con las moléculas del PDMS.

⁸ El PDMS consta de dos partes líquidas, un material base (aceite de silicón) y un agente entrecruzante (curante). Los dos líquidos se mezclan en relación 10:1 (base:curante). La mezcla se solidifica a través de calor.

⁹ Mecanismo de control por retroalimentación, donde se calcula continuamente el error entre un valor medido y el valor deseado. Se aplica una corrección dada por los tres coeficientes conocidos como proporcional, integral y derivativo (PID).

de una montura de teflón (ver figura 23a). Una placa metálica (cobre) separa el calentador de la muestra. El calentador resistivo fue conectado a una fuente de voltaje DC (Hewlett Packard, E3631A), mientras que el enfriador termoeléctrico fue regulado por un control PID (Thorlabs, TED200C). Para calentar una membrana de PDMS-rB se aplica un voltaje a la resistencia y el control PID permite ajustar con precisión el valor de la temperatura al valor deseado. El sistema de control térmico permitió controlar la temperatura de la muestra en un rango de 20 a 120 °C con una precisión de 0.1 °C.

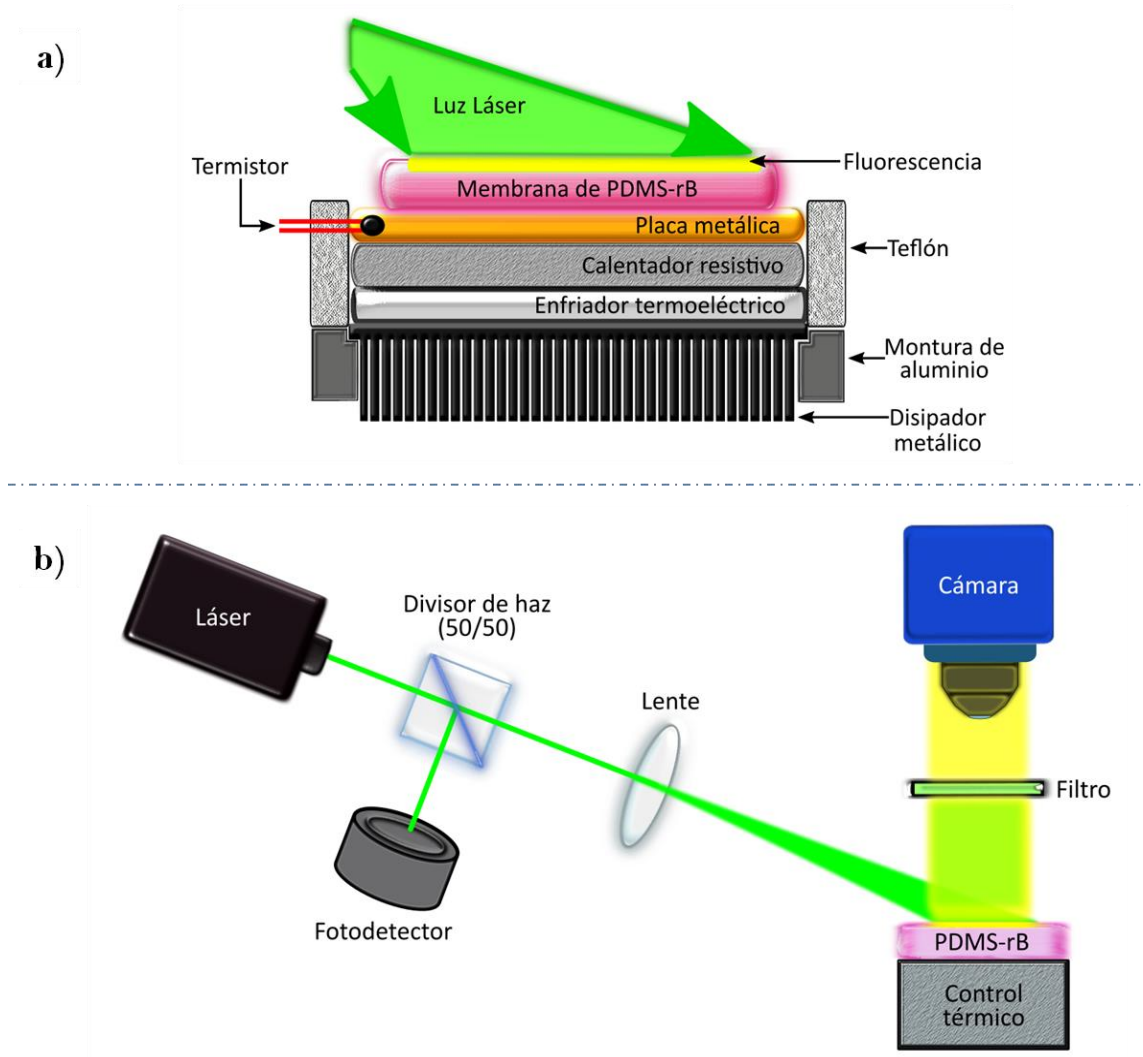


Figura 23. Arreglo utilizado para la determinación de la temperatura en microcalentadores de fibra óptica. (a) Control térmico utilizado para regular la temperatura de la membrana de PDMS-rB. (b) Arreglo TLIF.

Medición del calor generado durante la activación fototérmica de los μ FO

4.2.3. Sistema TLIF

Para la construcción del sistema TLIF se utilizó un láser verde estabilizado¹⁰ (BWTEK, BWI 532 50-E, $\lambda=532$ nm) como fuente de luz para estimular la fluorescencia de las membranas de PDMS-rB. Adicionalmente, se utilizó un divisor de haz (50/50) para dividir el láser verde en dos caminos, ver figura 23b. El primer haz de luz pasa a través de una lente convergente e ilumina la superficie de la membrana de PDMS-rB. El segundo haz de luz láser incide directamente en un medidor de potencia óptico (Thorlabs, PM100D) que tiene un sensor (Thorlabs, S302C) el cual sirve para monitorear la intensidad de luz láser¹¹ con la que se ilumina la membrana. Para disminuir el efecto de las fluctuaciones intrínsecas del láser, la señal de fluorescencia fue medida 5 minutos después de encendido el láser verde.

Para el proceso de calibración la membrana de PDMS-rB fue puesta sobre el sistema de control térmico. La señal fluorescente de la membrana fue capturada con una cámara CMOS (Thorlabs, DCC1645C) y un objetivo de microscopio de 10X. Un filtro notch (Thorlabs, NF533-17) fue utilizado para eliminar la luz del láser verde en las imágenes de fluorescencia, ver figura 23b. La ganancia de la cámara fue fijada en los mismos parámetros para todos los experimentos. La resolución espacial del sistema óptico fue de 2.7 $\mu\text{m}/\text{px}$. En el apéndice 2 se describe con más detalle la instrumentación utilizada para el sistema de termometría de fluorescencia inducida por láser.

4.2.4. Calibración del sistema TLIF

La curva de calibración de la membrana de PDMS-rB se obtuvo adquiriendo fotografías de la fluorescencia de la membrana para diferentes temperaturas, en un rango de 20 a 90 °C con intervalos de 10 °C. Además, entre cada valor de temperatura se esperó 10 minutos, tiempo con el que se asegura que la membrana y el sistema de control térmico alcanzan el equilibrio térmico (la temperatura de la membrana ya no variaba después de este tiempo).

Para minimizar el posible efecto de fotoblanqueamiento¹², el láser fue bloqueado entre mediciones (ver apéndice 2). En cada medición, la membrana sólo fue expuesta a la luz del láser verde por 1 minuto. Diez imágenes sucesivas se tomaron para cada medición. La potencia del láser verde se registró durante todas las mediciones.

Posteriormente, la intensidad de fluorescencia fue analizada considerando la intensidad promedio en cada imagen (500 x 500 píxeles) en escala de grises¹³, y después promediando el valor de intensidad obtenido para las 10 imágenes correspondientes a cada medición.

¹⁰ La potencia de salida del láser varía $\pm 3\%$.

¹¹ Ver nota en el apéndice 2.

¹² Proceso por el cual el tinte fluorescente se degrada debido a que la intensidad del láser con el que es excitado es muy grande o fue irradiada por mucho tiempo.

¹³ La escala de grises representa la intensidad de una imagen, y se calcula por medio de la ecuación ponderada: $I=0.3R+0.59G+0.11B$, donde R, G y B representan los canales rojo, verde y azul respectivamente. En el caso de la fluorescencia de la rB, que es amarilla, el canal azul de la imagen es despreciable.

Esto permitió obtener la razón entre la intensidad promedio (I_{PROM}) y la potencia del láser verde (P_v) para cada medición a una temperatura establecida¹⁴. Todas las mediciones fueron normalizadas usando una razón entre intensidad de referencia y la potencia de referencia del láser verde (I_{REF}/P_{v_REF})¹⁵, es decir:

$$I_N = \frac{I_{PROM}/P_v}{I_{REF}/P_{v_REF}} \quad (1)$$

Finalmente, la curva de calibración para la membrana de PDMS-rB se obtuvo graficando la intensidad de fluorescencia normalizada (I_N) como función de la temperatura.

4.2.5. Medición de temperatura en μ FO-Au

Para determinar la temperatura de un microcalentador de fibra óptica, se probaron diferentes configuraciones, sin embargo, colocar el μ FO en contacto directo con la orilla de la membrana de PDMS-rB fue la configuración que permitió observar la distribución de temperatura en la vecindad del μ FO, ver en figura 24. Antes de empezar las mediciones, se tomaron 10 fotografías consecutivas de la fluorescencia de la membrana a 25 °C, como referencia para el análisis posterior.

Una vez colocado el μ FO se escogió una potencia láser de activación para el láser infrarrojo (Thorlabs, PL980P330J, con $\lambda=975$ nm). Seguido, el láser infrarrojo fue encendido y el μ FO fue activado calentando la membrana de PDMS-rB. Después de 1 minuto de estar activado el microcalentador, se adquirieron 10 imágenes consecutivas para cada medición de la nueva fluorescencia de la membrana. Se observó que después de 1 minuto, que la temperatura para un μ FO activado no tuvo variaciones. Posteriormente, se calculó la temperatura de cada pixel en la nueva imagen de fluorescencia (ver apéndice 2).

Una curva térmica característica del μ FO se obtuvo adquiriendo fotografías de la fluorescencia de la membrana para diferentes potencias de activación del láser infrarrojo, en un rango de 0 a 270 mW con intervalos de 30 mW. Las fotografías de la fluorescencia fueron convertidas a temperatura y finalmente, se graficó la temperatura del μ FO para cada potencia de activación.

¹⁴ Esta razón permite considerar las fluctuaciones intrínsecas del láser verde (ver apéndice 2).

¹⁵ Se escogió una temperatura de 25 °C como referencia para todas las mediciones. La intensidad de fluorescencia y la potencia láser de referencia son los valores correspondientes a 25 °C.

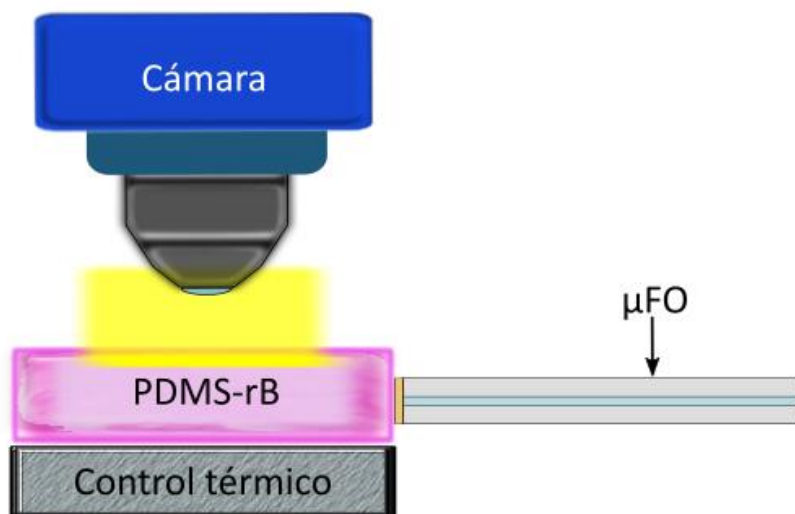


Figura 24. Esquema simplificado utilizado para la determinación de la temperatura en microcalentadores de fibra óptica. El microcalentador se coloca en contacto directo con la membrana de PDMS-rB. Una vez activado el FO se adquiere una fotografía de la nueva fluorescencia de la membrana de PDMS-rB.

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Membranas termosensibles de PDMS-rB

A través del método de fabricación descrito arriba se obtuvieron membranas de PDMS-rB que son termosensibles debido a las propiedades de la rB. Estas membranas tienen un grosor de $300\ \mu\text{m}$ ($\pm 30\ \mu\text{m}$) y un área aproximada de $5\ \text{mm} \times 5\ \text{mm}$. El espesor y el área de las membranas pueden ser controlados durante la fabricación modificando la geometría del molde utilizado.

A simple vista, las membranas mostraron un color rosa homogéneo (ver figura 25a); sin embargo, si éstas se observan bajo microscopio óptico se pudo distinguir la formación de cúmulos de rB en el interior del PDMS, lo que indica que la rB sí queda atrapada dentro del polímero. A pesar de estos aglomerados, al ser iluminadas con el láser verde las membranas mostraron una fluorescencia uniforme (ver recuadro de la figura 25b). El máximo de fluorescencia de la rB está centrado en $563\ \text{nm}$, es decir, las membranas fluorescen en color amarillo.

Aunque la rB se encuentra dentro del PDMS, la matriz polimérica no afectó sus propiedades térmicas. Al calentar las membranas la fluorescencia de la rB disminuyó, este comportamiento es similar a lo observado en reportes anteriores [136, 140, 143]. De esta

manera, podemos concluir que el método descrito para fabricar membranas termosensibles es adecuado para TLIF.

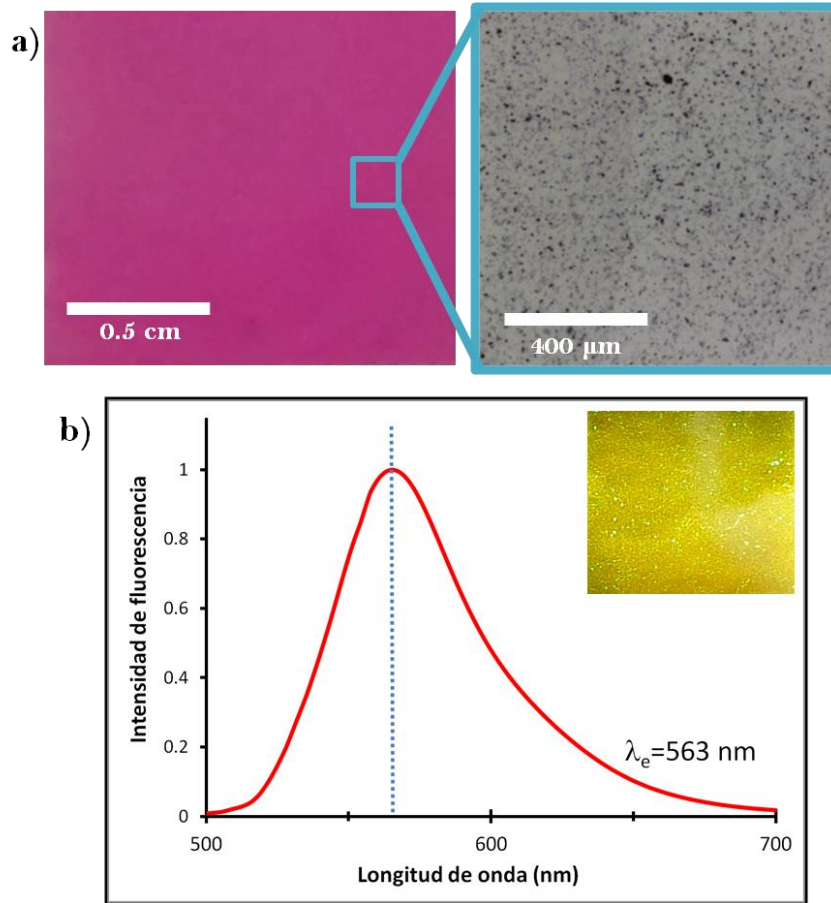


Figura 25. (a) Membranas de PDMS-rB obtenidas. Al hacer un acercamiento se puede observar la formación de cúmulos de rB dentro del PDMS. (b) Espectro de fluorescencia de las membranas; el recuadro muestra la fluorescencia de la muestra. La emisión del tinte está centrada en 563 nm.

4.3.2. Curva de calibración del sistema TLIF

La curva de calibración de la membrana termosensible se obtuvo analizando los cambios en la intensidad de fluorescencia en función de la temperatura. La fluorescencia fue analizada en un área de 1.35 x 1.35 mm, y se calculó el promedio de intensidad en escala de grises de todos los píxeles en esta área (500 x 500 px). La curva se hizo para un rango de 20 a 90 °C. Este rango de temperaturas fue escogido porque las temperaturas requeridas para la terapia fototérmica oscilan entre 40 y 60 °C.

La figura 26 muestra la curva de calibración obtenida. En ésta se puede notar que la intensidad de fluorescencia decae de manera proporcional con la temperatura de la muestra, y que los datos experimentales se ajustan a un modelo lineal ($R^2=0.9907$). Con el modelo ($I_N=-0.0098T+1.2188$) se puede determinar una temperatura desconocida de la muestra utilizando la fluorescencia registrada en cada imagen.

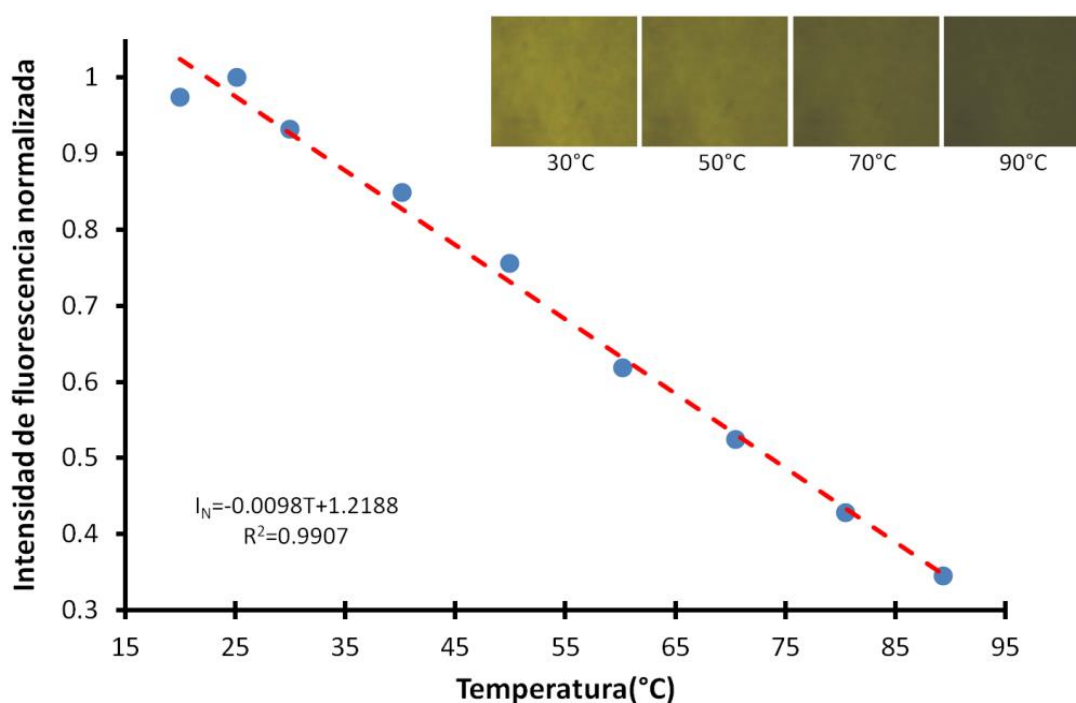


Figura 26. Curva de calibración de una membrana de PDMS-rB. La intensidad de fluorescencia decae linealmente con la temperatura. Los recuadros muestran fotografías de la fluorescencia de la membrana para diferentes temperaturas.

4.3.3. Medición de temperatura y curva térmica característica de un μ FO-Au

Una vez conocida la curva de calibración de una membrana, se procedió a obtener el mapa de temperaturas para un μ FO. Por tal motivo, un μ FO-Au se colocó en el costado de la membrana y se adquirieron las fotografías de la intensidad de fluorescencia para diferentes potencias de activación (láser infrarrojo). En este caso se eligió un μ FO-Au, porque es el mejor candidato para inducir TFt. En la columna izquierda de la figura 27 se puede apreciar una disminución de la intensidad de fluorescencia de la membrana en zonas cercanas al microcalentador (zonas más oscuras), esto se debe al incremento de temperatura en esta región. Al hacer el procesamiento de la imagen (ver apéndice 2) se obtuvieron los mapas de temperatura correspondientes, en los cuales es fácil distinguir el calor generado en la vecindad del μ FO-Au, ver columna derecha de la figura 27.

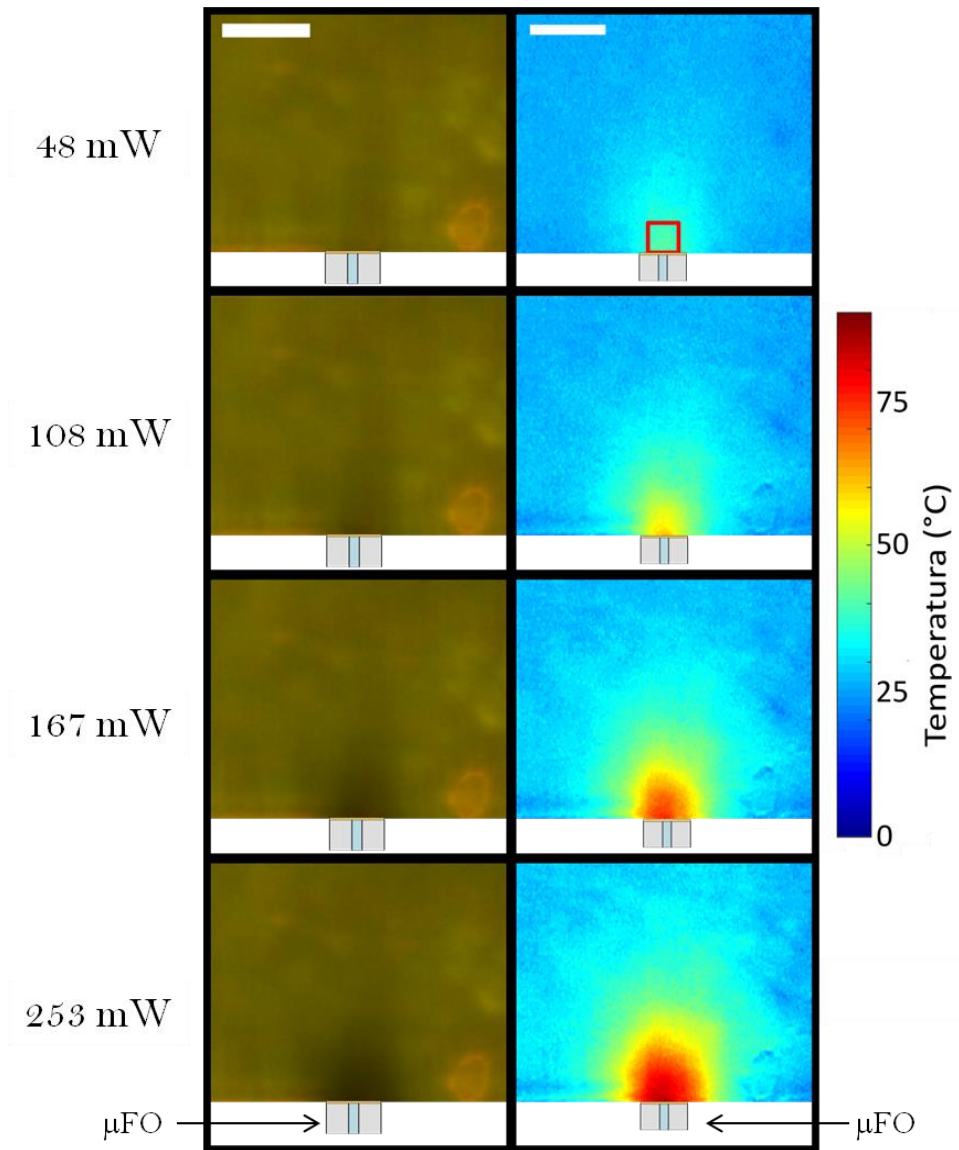


Figura 27. Perfiles de temperatura generados en la vecindad de un $\mu\text{FO-Au}$. La columna izquierda muestra fotografías de la fluorescencia de la membrana de PDMS-rB después de ser calentada por el microcalentador a diferentes potencias láser de activación. La columna derecha exhibe los mapas de temperatura correspondientes, cada pixel en la imagen corresponde a un valor de temperatura. Barra de escala: 200 μm .

A partir de los mapas de temperatura se obtuvo una curva térmica característica de temperatura para el $\mu\text{FO-Au}$. Esta curva se obtuvo midiendo la temperatura promedio en cada pixel de un área seleccionada cercana a la punta del μFO (recuadro rojo de la figura 27, región de 80 μm X 80 μm). La temperatura promedio del área seleccionada se graficó en función de la potencia de activación del láser infrarrojo, ver figura 28. De la gráfica se

puede observar que el calor (incremento de temperatura) generado en un μ FO es directamente proporcional a la potencia activación del láser infrarrojo que viaja a través de éste. De esta manera, la luz láser (infrarroja) que viaja dentro de un μ FO es absorbida por la película fototérmica (recubrimiento de oro) y convertida en calor de forma proporcional a la potencia de activación, es decir, a mayor cantidad de luz mayor calor generado.

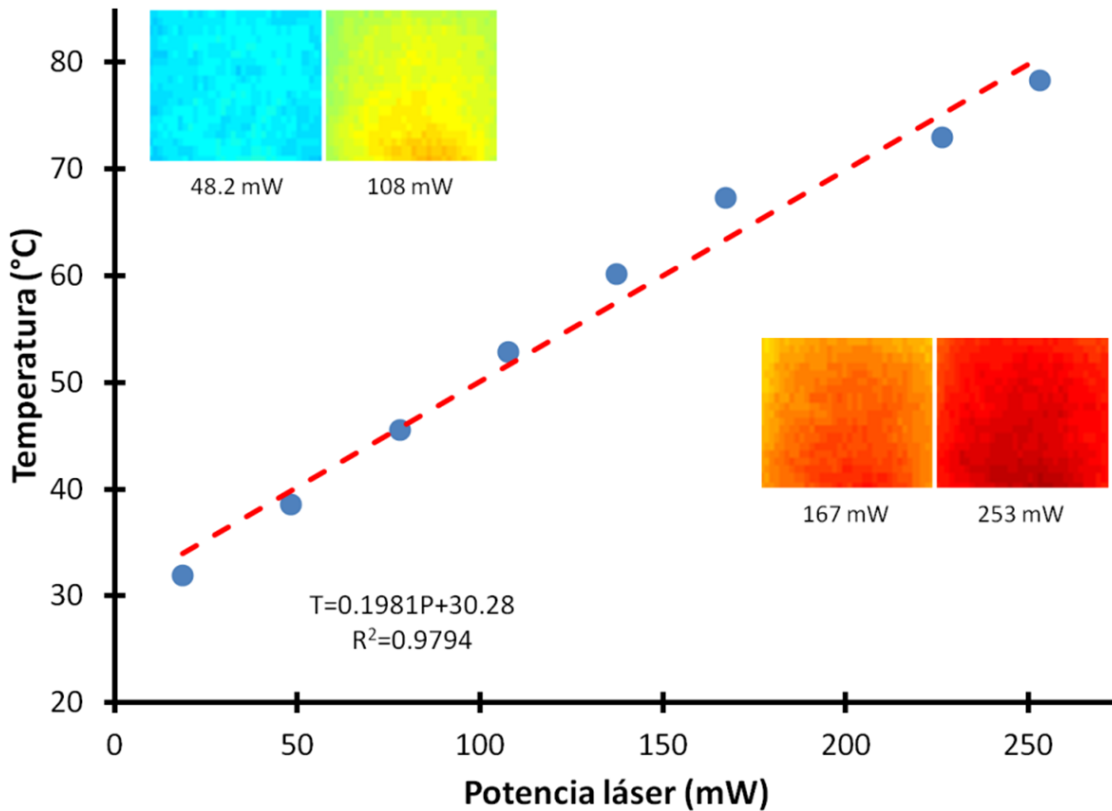


Figura 28. Curva térmica de característica de un μ FO-Au. La curva se obtiene midiendo la temperatura promedio en un área cercana a la punta del μ FO

4.3.4. Discusión

De las figuras 27 y 28 es interesante notar que la región caliente es muy pequeña (menor a 1 mm). En particular, para el caso presentado en la figura y utilizando la máxima potencia que permite el láser (de activación), la temperatura máxima alcanzada fue de 78 °C y el calor producido incrementó la temperatura en una región espacial de 600 μ m X 550 μ m. Esto indica que los microcalentadores pueden llegar a temperaturas suficientemente altas para provocar ablación térmica y con ello necrosis y/o coagulación de sangre en un tejido. Además, el calor generado es muy local, reduciendo el daño térmico en un área menor a un milímetro.

Rango térmico	Temperatura deseada (°C)	Potencia láser de activación del μ FO (mW)	Corriente eléctrica del láser (mA)
Hipertermia	38	38.97	128.17
	40	49.07	144.27
	44	69.26	176.48
	46	79.35	192.57
Termoablación	50	99.55	224.78
	55	124.79	265.04
	60	150.03	305.30
	65	175.27	345.55
	80	250.98	466.30

Tabla 4. Valores de potencia láser necesarios para alcanzar diferentes temperaturas para terapia fototérmica. Valores calculados para el caso del μ FO-Au de la figura 27.

Una vez obtenida la curva térmica característica del microcalentador ($T=0.1981P+30.28$) se puede calcular la potencia de activación necesaria para alcanzar temperaturas hipertérmicas o de ablación térmica, según sea el caso deseado. El láser infrarrojo utilizado para activar el μ FO sólo permite modular la corriente eléctrica suministrada a éste; mediante una curva de calibración del láser infrarrojo¹⁶ obtenida previamente se determinó la corriente eléctrica requerida para establecer cada potencia de activación. De esta manera, es posible asociar una temperatura del microcalentador con la correspondiente corriente eléctrica del láser infrarrojo. La tabla 4 muestra las potencias de activación y las corrientes eléctricas necesarias para diferentes temperaturas deseadas en terapia fototérmica.

Cada microcalentador fue caracterizado por separado para obtener su curva térmica característica. Debido a las características de las membranas de PDMS-rB¹⁷, para cada

¹⁶ Esta curva se obtiene midiendo la potencia de salida del láser infrarrojo en función de la corriente eléctrica suministrada al láser. La potencia láser de activación es directamente proporcional a la corriente, a mayor corriente eléctrica mayor potencia de activación.

¹⁷ La membrana se degrada térmicamente después de caracterizar cada microcalentador.

μ FO se utilizó una membrana nueva, por lo que para cada caso se obtuvo una curva de calibración (membrana) y posteriormente, se adquirió la curva térmica característica. El proceso completo de caracterización se realiza en aproximadamente una hora.

Finalmente, la técnica TLIF también permitió demostrar que las películas fototérmicas depositadas sobre las fibras ópticas son las responsables de generar el calor en los μ FO. Para tal efecto, se obtuvieron mapas de temperatura de un μ FO-Au y una fibra óptica limpia (sin recubrimiento de oro), para diferentes potencias de activación. Para evitar que la luz que escapa por la fibra óptica fuera detectada por la cámara y con ello diera mediciones erróneas, se intercaló un filtro pasabandas entre el filtro nocturno y la cámara. La figura 29 muestra una comparación entre los mapas de temperatura obtenidos para el caso del microcalentador y de la fibra óptica. Es interesante notar que la fibra óptica sin recubrimiento fototérmico no genera calor en comparación con el microcalentador. El PDMS y la rB no absorben la luz infrarroja utilizada [140], por lo que no hay contribución térmica en el caso de la fibra sola, como se observa en la figura 29.

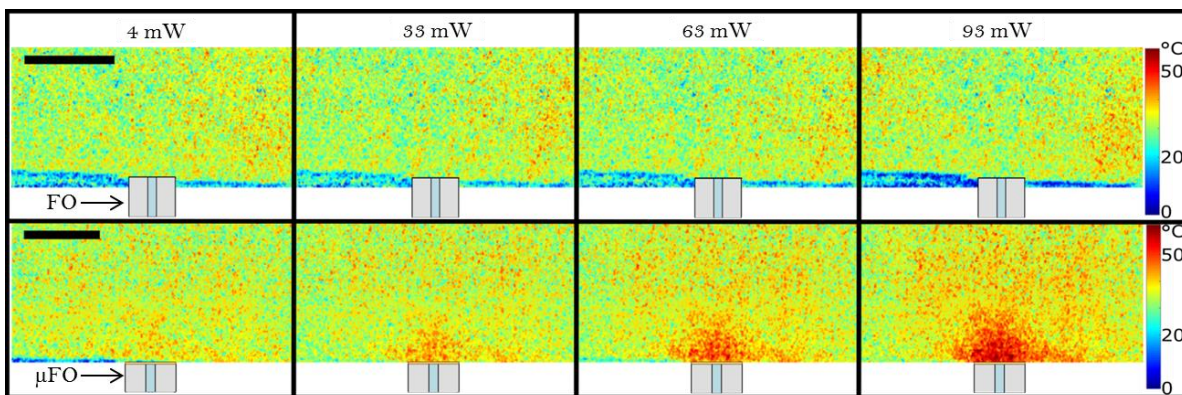


Figura 29. Comparación del calor generado entre una fibra óptica (arriba) y un microcalentador de fibra óptica para diferentes potencias láser. Barra de escala: 200 μ m.

Evaluación preliminar de la terapia fototérmica en un modelo *ex vivo* de hígado de ratón

*“La ciencia, muchacho, está hecha de errores, pero de errores útiles de
cometer, pues poco a poco, conducen a la verdad”*

Julio Verne (1828-1905)

5.1. Introducción

Después de demostrar la capacidad de los microcalentadores de fibra óptica (μ FO) para generar calor localizado, el primer paso a seguir fue evaluar el daño que pueden provocar los μ FO en tejido biológico¹. Conjuntamente, se buscó poder controlar el tamaño de la lesión a través de la modificación de algunos parámetros del láser, pues la eficacia de la terapia fototérmica depende de varios factores que deben ser comprendidos para su correcta utilización y optimización (ver capítulo 1). Debido a las restricciones del equipo láser (láser infrarrojo) utilizado para activar los μ FO, sólo se pudo controlar con precisión un parámetro, que fue la potencia óptica láser; no obstante, también se pudo variar el tiempo de aplicación de la terapia fototérmica.

Para esta evaluación preliminar se escogió un modelo murino *ex vivo*; esto permitió extraer el tejido del animal y, posteriormente, controlar la aplicación de la terapia para realizar varias lesiones térmicas en la superficie del tejido. Particularmente, se seleccionó hígado de ratón como órgano diana ya que es un tejido fácil de extirpar, con una gran superficie y con una vasta irrigación sanguínea. La gran cantidad de sangre dentro del hígado permitió identificar las lesiones de forma más sencilla.

5.2. Metodología

5.2.1. μ FO

Para este experimento se evaluó el uso de μ FO-NTC-Au y los μ FO-Au. Las pruebas se realizaron con 3 microcalentadores de cada tipo (ver detalles de fabricación en el capítulo 3). Además, para efectos comparativos se utilizó también una fibra óptica (FO) convencional sin recubrimiento para aplicar la terapia fototérmica.

5.2.2. Muestras de tejido

5 ratones machos CD1, de 8-10 semanas de edad y con peso de 30-35 g, del bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, fueron utilizados para el experimento. Se siguieron las disposiciones planteadas por la Norma Oficial Mexicana

¹ Durante este experimento aún no se contaba con la versión definitiva de la técnica TLIF, por lo que en ese momento no fuimos capaces de determinar la temperatura para cada microcalentador. Por tal motivo, en esta sección no haremos referencia a la temperatura que alcanzan los μ FO.

(NOM-062-ZOO-1999) en el manejo de los animales. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por las comisiones de investigación y ética de la Facultad de Medicina. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Después, el hígado de cada ratón fue extirpado de la cavidad peritoneal y cortado en cada uno de sus cuatro lóbulos. Los lóbulos se colocaron en una caja de Petri con PBS (tampón de fosfatos) y mantenidos a 4 °C con hielo.

5.2.3. Aplicación de la terapia fototérmica

La terapia fototérmica fue inducida mediante los μ FO, poniéndolos en contacto físico con la muestra de hígado de ratón, es decir, la punta del μ FO se colocó a 90° sobre la superficie del hígado de ratón. Una platina de un eje (desplazamiento vertical) fue utilizada para acercarse con precisión el μ FO a la superficie del tejido (ver figura 30).

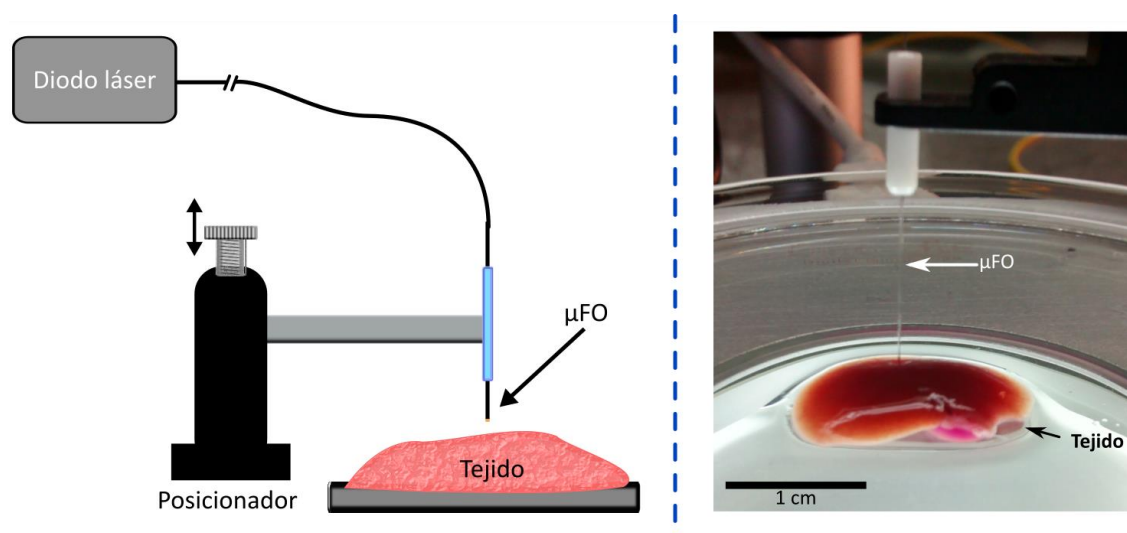


Figura 30. Esquema del arreglo experimental utilizado para generar lesiones fototérmicas en hígado de ratón (izquierda). La platina permite desplazar con precisión el μ FO en dirección vertical. En la imagen de la derecha se puede observar una fotografía del experimento.

Una vez colocado el μ FO sobre la superficie del tejido, el extremo opuesto del microcalentador fue conectado a un diodo láser infrarrojo acoplado a una fibra óptica (Thorlabs, PL980P330J, $\lambda=975$ nm). Posteriormente, se estableció una potencia láser y el láser infrarrojo fue encendido, lo que provoca que el μ FO se caliente. Este procedimiento fue repetido para el caso de la FO sin recubrimiento. Para los dos tipos de μ FO y la FO se probaron diferentes potencias ópticas láser y varios tiempos de aplicación de la terapia. En total 28 combinaciones de potencia láser y tiempo fueron probadas para cada

microcalentador y 17 combinaciones fueron evaluadas para la fibra óptica sola. Debido a limitaciones experimentales cada condición sólo fue evaluada una vez (n=1). La tabla 5 muestra las condiciones experimentales utilizadas.

# μ FO	Tipo de μ FO	Potencia láser (mW)	Tiempo de aplicación (s)
1	μ FO-NTC-Au	70-270	10
2	μ FO-NTC-Au	70-270	60
3	μ FO-NTC-Au	165.5	10-240
4	μ FO-Au	70-270	10
5	μ FO-Au	70-270	60
6	μ FO-Au	165.5	10-240
7	FO	70-270	60
8	FO	269	10-240

Tabla 5. Condiciones experimentales utilizadas para evaluar la terapia fototérmica en un modelo *ex vivo* de hígado de ratón. Se estudiaron las lesiones hechas con μ FO-NTC-Au y μ FO-Au.

5.2.4. Evaluación del daño

5.2.4.1. Medición del diámetro de la lesión

Después de la terapia fototérmica las lesiones fueron observadas y fotografiadas a través de un microscopio óptico convencional (DinoLite, AM7115MZT). Posteriormente, se determinó el tamaño de las lesiones con ayuda del software ImageJ. El tamaño de la lesión se graficó en función de la potencia láser y del tiempo.

5.2.4.2. Histología

Para observar el daño tisular provocado por la terapia se utilizó una tinción de eosina y hematoxilina (H&E). Después de la terapia, el tejido fue fijado en una solución de formaldehído (4%) durante 4 horas, luego el tejido fue pasado a una solución de sacarosa (30%) por una noche. Posteriormente, el tejido fue rebanado en secciones de 5 μ m de

grosor utilizando un microtomo criostato (Leica, CM1860 UV) y las muestras fueron montadas en portaobjetos y teñidas con H&E.

5.2.4.3. Microscopía electrónica de barrido

La superficie del tejido dañado fue observada mediante microscopía electrónica de barrido. Por tal motivo, el tejido fue fijado en glutaraldehído al 0.5% y PBS por 6 horas. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas en etanol (en pasos de 30-100%). Después las muestras fueron secadas en un desecador durante 4 horas. Finalmente, la superficie de las muestras fue observada mediante un microscopio electrónico de barrido (JEOL, 7600).

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Lesiones fototérmicas

El experimento diseñado permitió realizar lesiones térmicas en hígado de ratón utilizando luz. La luz de un láser viaja a través de un microcalentador y calienta una película fototérmica en el extremo de éste; el calor generado es transferido al tejido el cual está en contacto directo con el μ FO, provocando un incremento de temperatura sobre la superficie del hígado y con ello causando daño en un área muy pequeña en el tejido.

La figura 31 muestra fotografías tomadas con un microscopio óptico para diferentes lesiones hechas con los μ FO. Se puede notar que en general las lesiones tienen un aspecto de "cráter", con perímetro circular y en algunos casos se pueden distinguir circunferencias concéntricas dentro de ella (figura 31c). De las fotografías obtenidas no se observó ninguna diferencia significativa entre las lesiones hechas con los μ FO-NTC-Au (figura 31a y 31b) y los μ FO-Au (figura 31c y 31d).

Como comparación se repitieron los experimentos para el caso de una fibra óptica sin recubrimiento fototérmico, ver tabla 5. La imagen 31e expone una lesión hecha con una FO sin recubrimiento; en ella se observa una morfología similar al caso de los microcalentadores, pero de un tamaño menor y con un borde menos elevado. Por otra parte, para verificar que la presión ejercida sobre el tejido después de poner en contacto directo los μ FO con éste no provocó lesiones mecánicas similares a las observadas en las lesiones térmicas, se colocó un μ FO-NTC-Au sin calentar (0 mW) durante 5 min sobre el tejido. La imagen 31f muestra una leve lesión en la superficie del hígado pero diferente en morfología

a las obtenidas por efecto térmico, sin los característicos “cráteres” observados en todas las lesiones mostradas anteriormente.

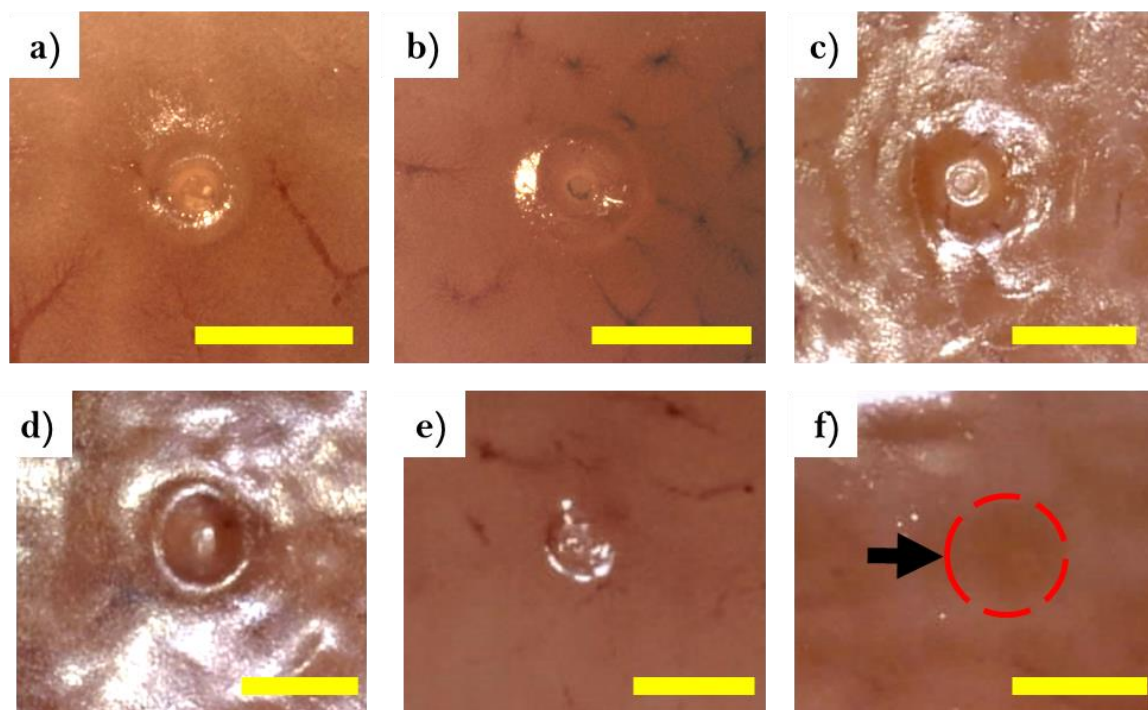


Figura 31. Lesiones térmicas obtenidas después de aplicar la terapia fototérmica. Lesiones hechas utilizando diferentes parámetros y μ FO. a) μ FO-NTC-Au: 165.5 mW, 10 s. b) μ FO-NTC-Au: 269 mW, 10 s. c) μ FO-Au: 165.5 mW, 60 s. d) μ FO-Au: 165.5 mW, 180 s. e) FO: 269 mW, 60 s. f) μ FO-NTC-Au: 0 mW, 300 s. Barra de escala 500 μ m.

Una vez demostrado que los microcalentadores de fibra óptica sí fueron capaces de provocar lesiones en la superficie del hígado, se procedió a estudiar el tamaño de la lesión en función de la potencia láser. Por tal motivo, se provocaron varias lesiones para 11 potencias diferentes del láser (70-270 mW) para los dos tipos de microcalentador; además, se escogieron dos tiempos de aplicación de la terapia (10 y 60 s) para cada serie de valores de potencia láser. Análogamente, también se estudió el tamaño de la lesión en función del tiempo de aplicación de la terapia; en este caso, se estableció una potencia fija (165.5 mW) y se variaron 6 tiempos de la terapia diferentes (10-240 s). La figura 32 muestra un ejemplo del cambio en tamaño de las lesiones obtenidas para diferentes potencias láser, en este caso en particular se trató de un μ FO-NTC-Au y un tiempo de aplicación de sólo 10 s.

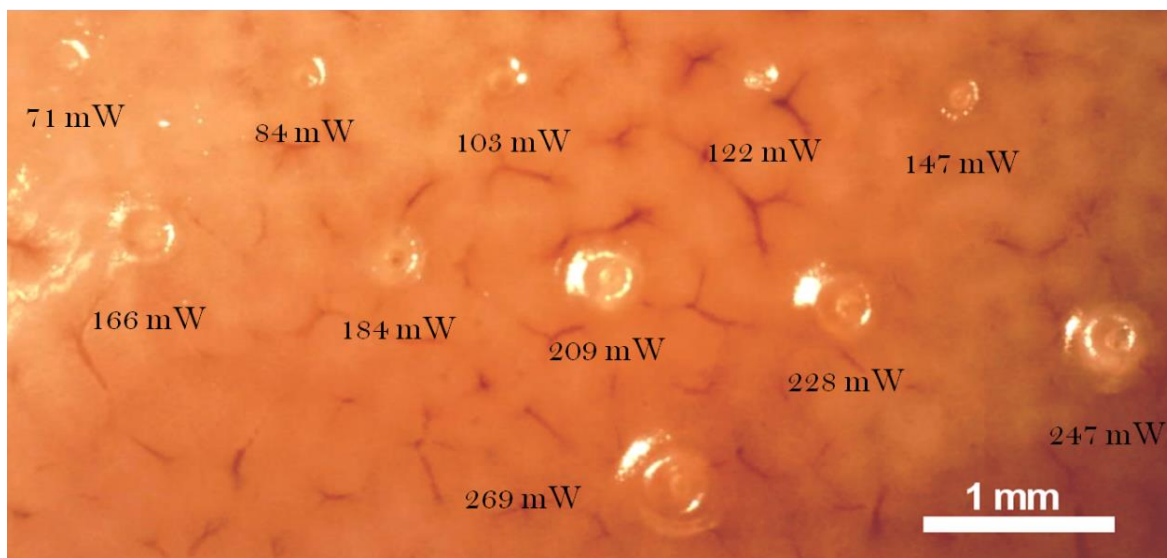


Figura 32. Variación del tamaño de las lesiones térmicas hechas con un μ FO-NTC-Au para diferentes potencias láser y para un tiempo de aplicación del calor de tan sólo 10 s. Imagen tomada de [150]².

Después de cada experimento se midió el tamaño (diámetro) de la lesión con ayuda del software ImageJ. Debido a que en algunas lesiones se observó más de una circunferencia (ver figuras 31 y 32) se optó por medir el diámetro externo como dimensión característica de cada lesión. El tamaño de la lesión se graficó en función de la potencia láser y del tiempo de aplicación de la terapia para los dos tipos de microcalentadores y la fibra óptica. La figura 33 muestra los resultados obtenidos.

En la figura 33 se puede apreciar que el diámetro de la lesión es proporcional a la potencia de láser de irradiación, y que el tamaño de la lesión crece de manera lineal con la potencia. Por su parte, el diámetro de la lesión también crece con el tiempo de aplicación de la terapia y este comportamiento tiene una tendencia logarítmica. Además, se puede observar que los μ FO-NTC-Au provocaron lesiones más grandes que los μ FO-Au, por lo que podemos inferir que los μ FO-NTC-Au generan una mayor cantidad de calor. También es importante notar que las FO sin recubrimiento provocaron lesiones térmicas en el tejido, sin embargo, las lesiones fueron de menor diámetro y sólo se obtuvieron para potencias grandes del láser (>225 mW).

² Ver anexo 1.

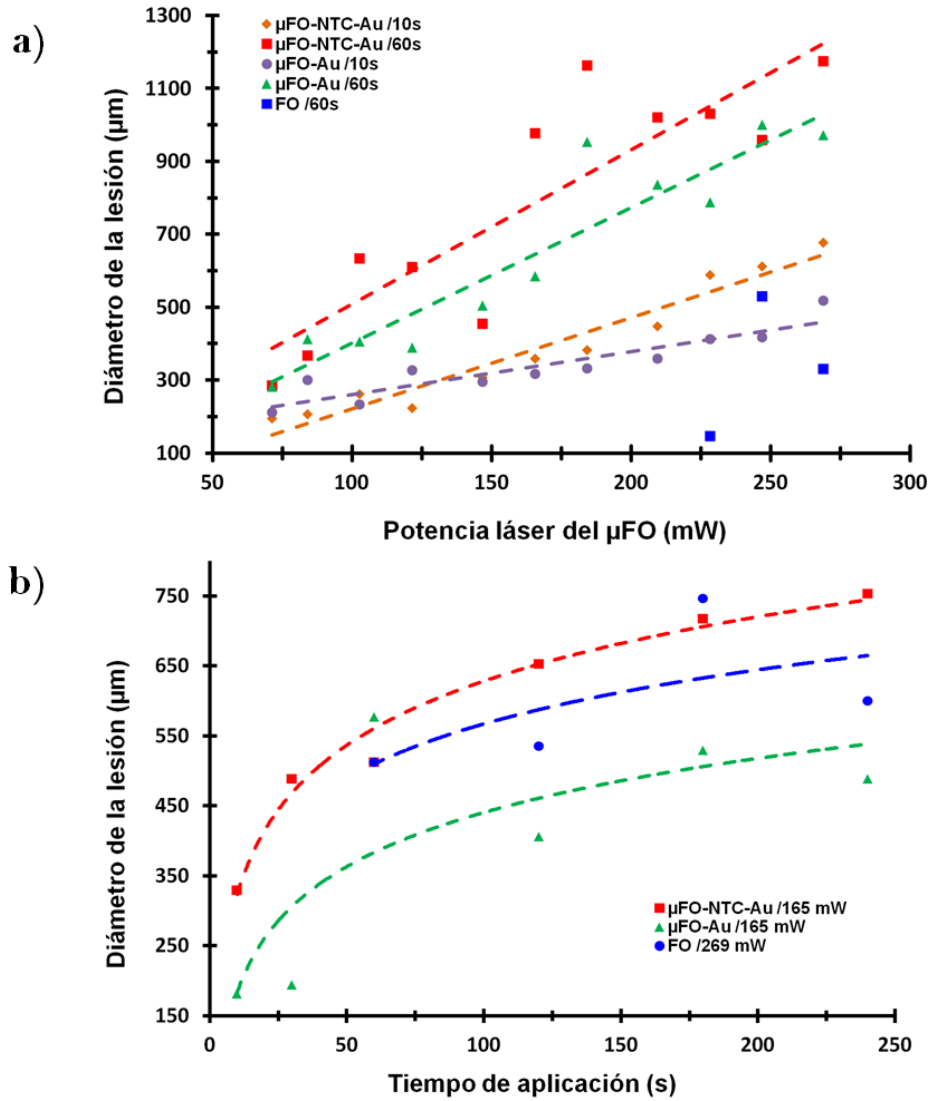


Figura 33. Tamaño de las lesiones hechas con los μFO en función de la potencia láser (a) y del tiempo (b). Imagen tomada de [150].

5.3.2. Histología

Por otro lado, se estudió el daño provocado en el tejido. Primeramente, se observaron las lesiones hechas con los μFO utilizando una tinción H&E³. Para ello, se hicieron cortes histológicos horizontales del hígado, es decir, los cortes fueron hechos paralelos a la superficie del tejido. Los cortes tuvieron un espesor de $5\ \mu\text{m}$ y se hicieron empleando un

³ Esta es una de las tinciones más utilizada en histología. Con ella se puede distinguir el citoplasma y material extracelular de la célula en color rosa mientras que el núcleo celular se colorea en tono azul, morado o violeta.

microtomo criostato. La figura 34 muestra un ejemplo de las lesiones obtenidas en la superficie del hígado; en ésta se puede observar una comparación entre el tejido lesionado sólo por presión (μ FO-NTC-Au, 0 mW) y el daño térmico provocado por el μ FO (μ FO-NTC-Au, 269 mW).

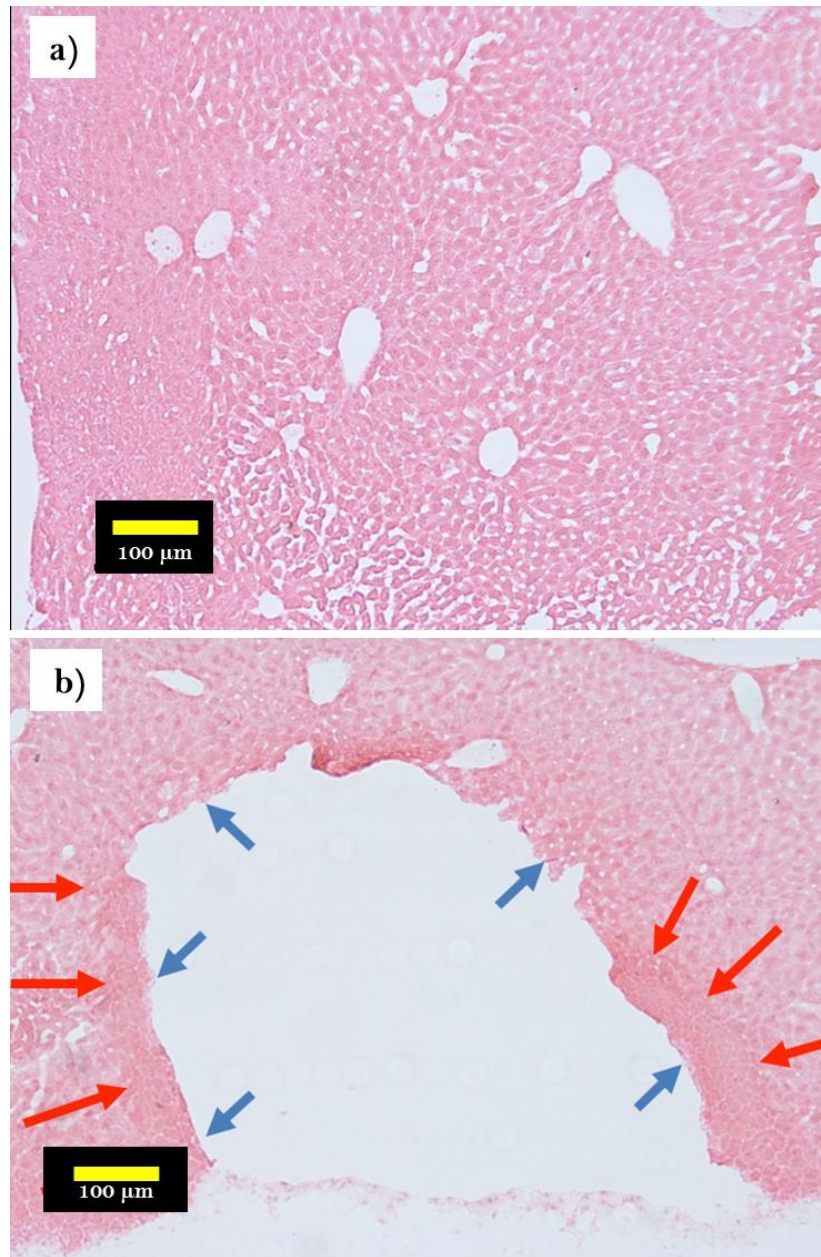


Figura 34. Histología de una lesión térmica provocada con un μ FO-NTC-Au (269 mW y 30 s) en hígado de ratón. a) Tejido intacto después de colocar un microcalentador no activado sobre la superficie del hígado. b) Daño térmico en el tejido posterior a la terapia fototérmica; las flechas azules muestran el límite de la lesión y las rojas señalan el área de necrosis. Imagen tomada de [150].

En la figura 34a se puede observar que el hígado conserva su anatomía normal cuando se utiliza el μ FO sobre la superficie sin utilizar el láser; en la imagen se puede distinguir la estructura íntegra del hígado como el parénquima⁴ hepático, las venas centrales (que se observan como circunferencias vacías de gran tamaño) y las sinusoides hepáticas⁵. Por otro lado, en el caso de la lesión térmica inducida con un microcalentador, se observa que existe una discontinuidad del tejido (flechas azules) que indica la pérdida de éste en el área tratada. Además, alrededor de la lesión se observa una región eosinofílica⁶ (flechas rojas) lo que sugiere necrosis en el área. En la lesión se observó una región bien definida que delimita el borde necrótico del tejido normal, lo que sugiere un proceso necrótico focal; resultados similares han sido reportados en estudios previos [35]. Para las lesiones hechas con los μ FO-Au no se pudieron obtener muestras histológicas como las observadas en la figura 34.

Por otro lado, las lesiones hechas sobre la superficie del tejido también fueron observadas mediante microscopía electrónica (SEM). Con este análisis se pudo observar con detalle la morfología superficial de las lesiones en su región central. La figura 35 muestra los resultados obtenidos para las lesiones hechas con los dos tipos de microcalentadores, así como una comparación de las lesiones obtenidas solamente con las fibras ópticas.

De las imágenes de microscopía es interesante notar que, la morfología de la lesión obtenida con la fibra óptica difiere de manera importante de las lesiones hechas con los microcalentadores, y que las lesiones realizadas con los dos tipos de microcalentadores también presentaron características diferentes entre sí. En la lesión generada con la FO se observó que el hígado conservó su morfología, incluso en el centro de la lesión. En contraste, en las lesiones obtenidas con los μ FO se notaron agujeros que indican las pérdidas del tejido en el área tratada. En las lesiones hechas con los μ FO-NTC-Au se apreció que las paredes de la lesión presentan estrías y, además, se encontró material residual en el fondo de las lesiones. Por su parte, en las lesiones inducidas con los μ FO-NTC-Au, se observaron paredes más "lisas" sin la presencia de estrías y el fondo de la lesión está mejor definido y sin presencia de residuos.

Las características de las lesiones nos indican que el daño provocado por los microcalentadores fue mucho más agresivo y localizado que el generado con una fibra óptica. También, se observó que el μ FO-Au provocó una lesión "mejor definida y más limpia" en comparación con las lesiones hechas con el μ FO-NTC-Au; esto podría deberse a que gracias a los NTC depositados en su punta, este microcalentador alcanza una mayor temperatura.

⁴ Es la parte de un tejido que lo hace funcional. En el caso del hígado consiste en los hepatocitos (células del hígado) [153, 154].

⁵ Vasos que hay entre los hepatocitos [153, 154].

⁶ Se refiere al aspecto del tejido después de una tinción H&E, en el cual el tejido toma un color rosa intenso debido a una gran coloración por el tinte eosina. Las células necróticas son más eosinofílicas (rosas) que las células viables en la tinción H&E [155].

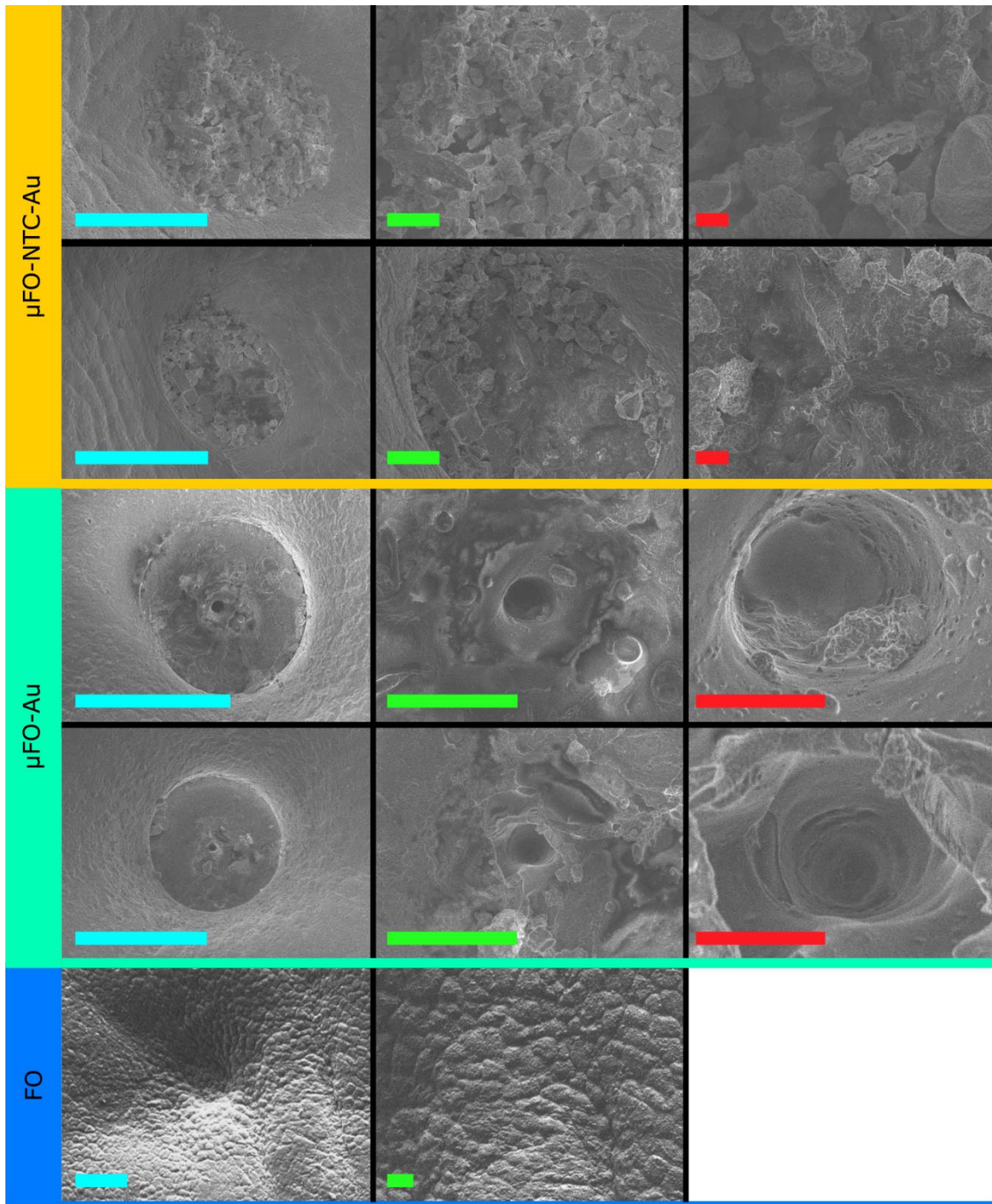


Figura 35. Micrografías electrónicas de barrido de la región central de las lesiones hechas con los diferentes microcalentadores y la fibra óptica. Barras de escalas: 100 μ m (azul), 20 μ m (verde) y 5 μ m (roja).

5.3.3. Discusión

Se observó que existe una potencia láser umbral a partir de la cual se causó daño al tejido. Para potencias láser menores a 50 mW no se observaron lesiones para ningún tipo de μ FO. Esto se debe a que a mayor potencia láser se genera una mayor cantidad de calor en el extremo del microcalentador (ver capítulo 4). En este estudio se encontró que a partir de los 70 mW se provocó daño el hígado de ratón.

Es interesante notar que las lesiones obtenidas con los μ FO son muy locales, obteniendo lesiones que variaron entre 0.2-1.2 mm. Además, controlando la potencia láser del μ FO se puede regular el calor generado y esto permite definir el daño en el tejido, localizando el calor en regiones específicas. Con los μ FO-NTC-Au se obtuvieron lesiones de mayor tamaño para las mismas condiciones experimentales, esto puede deberse a que los nanotubos de carbono en los μ FO tienen una eficiencia fototérmica mayor que el recubrimiento de oro. En investigaciones anteriores, se ha demostrado una mayor eficiencia fototérmica en NTC que para NPs de oro [64, 83, 93, 94].

En el caso de la fibra óptica sin recubrimiento, se observó que a pesar de no tener una película fototérmica también fue capaz de provocar daño sobre el tejido. Estas lesiones se deben a la absorción óptica de los cromóforos propios del hígado; el hígado es un órgano con una gran irrigación sanguínea por lo que contiene una gran cantidad de sangre, entonces la hemoglobina podría absorber la luz láser⁷. Sin embargo, esta conversión fototérmica es poco eficiente pues sólo se observaron lesiones para potencias mayores a 225 mW, además, las lesiones conseguidas fueron más pequeñas en comparación con las lesiones obtenidas utilizando los μ FO para las mismas condiciones experimentales.

A partir de los datos obtenidos, se demostró que el tamaño de la lesión crece linealmente con la potencia del láser. Esto concuerda con los resultados conseguidos en el capítulo anterior, donde se comprobó que el calor es directamente proporcional a la potencia del láser, entonces a mayor potencia láser, mayor cantidad de calor y, por lo tanto, se induce una lesión de mayor tamaño. Por otro lado, se observó que a mayor tiempo de aplicación de la terapia se produce una lesión de mayor tamaño, observando una tendencia logarítmica, la cual puede ser explicada si consideramos que tiempos largos de exposición favorecen la difusión del calor dentro del tejido causando un daño extendido, mientras que en exposiciones cortas no le da tiempo al calor de difundirse, concentrando el daño en una región del tejido.

Por otro lado, en las gráficas de la figura 33 se observa una gran dispersión en los puntos experimentales. Esto fue debido a ciertas limitaciones experimentales que dificultaron la medición de las lesiones. Los μ FO fueron colocados en una platina con desplazamiento vertical, lo que ayudó a controlar el contacto entre el μ FO y el tejido; sin embargo, el arreglo

⁷ La hemoglobina tiene un coeficiente de absorción pequeño para luz de 975 nm, sin embargo, la densidad de potencia óptica (potencia/área) que se genera a la salida de la fibra óptica puede ser muy elevada debido al tamaño del núcleo de la fibra óptica. El efecto fototérmico no sólo depende de la absorción óptica del tejido, sino que también depende de la densidad óptica.

experimental utilizado no permitió establecer con precisión el momento de contacto o la fuerza de contacto entre un μ FO y el tejido. Además, debido al grosor y la curvatura de tejido se tuvieron problemas de iluminación homogénea durante la captura de imágenes en el microscopio; esto provocó dificultades al definir las fronteras de la lesión. Asimismo, se contó con un número limitado de microcalentadores, por lo que no pudieron realizarse mediciones repetidas para las mismas condiciones experimentales, por lo que no se pudo llevar a cabo un análisis estadístico.

En algunas ocasiones, se observó que el tejido fue carbonizado en el centro de la lesión (ver figura 36); sin embargo, como se puede ver en la figura se trata de carbonización muy local. Cuando el tejido se carboniza se observó además que éste se adhiere al μ FO, resultando en un cambio de la geometría de la lesión después de retirar el μ FO; este cambio de geometría también influyó en la medición del tamaño de la lesión (ver figura 36b). Es interesante mencionar que la carbonización del tejido ocurre a temperaturas mayores a 200 °C [82, 151]. Sistemas láser comerciales usan un sistema de enfriamiento en la punta de prueba (ver apéndice 1) para evitar la adhesión entre la punta y el tejido [152].

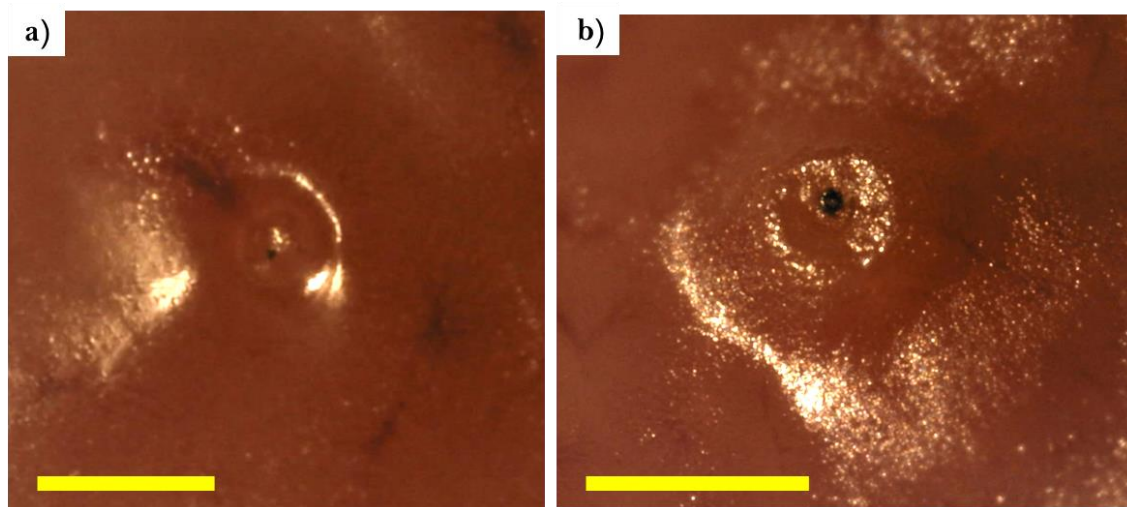


Figura 36. Carbonización local del tejido inducido con un μ FO-NTC-Au, para (a) 147 mW y 60 s y (b) 165 mW y 30 s. La carbonización ocurre para temperaturas mayores a 200 °C. Barra de escala: 500 μ m.

El aspecto de la lesión mostrada en la figura 34b pudo deberse a la pérdida de tejido debido a carbonización (región que se perdió durante la técnica H&E) y/o a la dirección de corte del tejido. Además, de la histología se observó una zona necrótica de alrededor de 100 μ m de ancho en su periferia (zona eosinofílica) de la lesión, sugiriendo un daño local en el tejido. Debido a la dirección del corte del tejido no se pudo cuantificar la profundidad del daño causado. Además, una limitante al hacer el estudio histológico de las lesiones fue que debido al diminuto tamaño de éstas fue difícil localizarlas en los bloques de material

congelado⁸ durante los cortes histológicos en el micrótopo criostato. En el futuro este estudio debe ser complementado con cortes coronales (verticales) a las lesiones y utilizar una tinción adicional que pueda dar mayor información sobre el daño en el tejido⁹, pues en estudios anteriores donde también se ha utilizado una tinción H&E se observó un área de daño pobremente definida o sin daño aparente después de la aplicación del calor [35, 36].

Por otra parte, las imágenes de microscopía electrónica permitieron verificar que el calor generado durante la terapia fototérmica es extremadamente local, pues el diámetro interno de la lesión (ver figura 35) corresponde con el tamaño del μFO (125 μm). Este análisis también demostró que los $\mu\text{FO-Au}$ son mejor opción (ver tabla 3, capítulo 3) para la inducir la terapia fototérmica pues generan lesiones sin residuos en su interior y con bordes más definidos; además, el agujero más pequeño e interno dentro de las lesiones hechas con este tipo de microcalentador (tercera columna de la figura 35) equivale al tamaño del núcleo de la fibra (9 μm), demostrando que el calor se genera en el material depositado sobre el núcleo de la fibra y después calienta toda la superficie del microcalentador¹⁰. Todo esto apunta a que los microcalentadores con recubrimiento de oro producen calor más confinado que los $\mu\text{FO-NTC-Au}$.

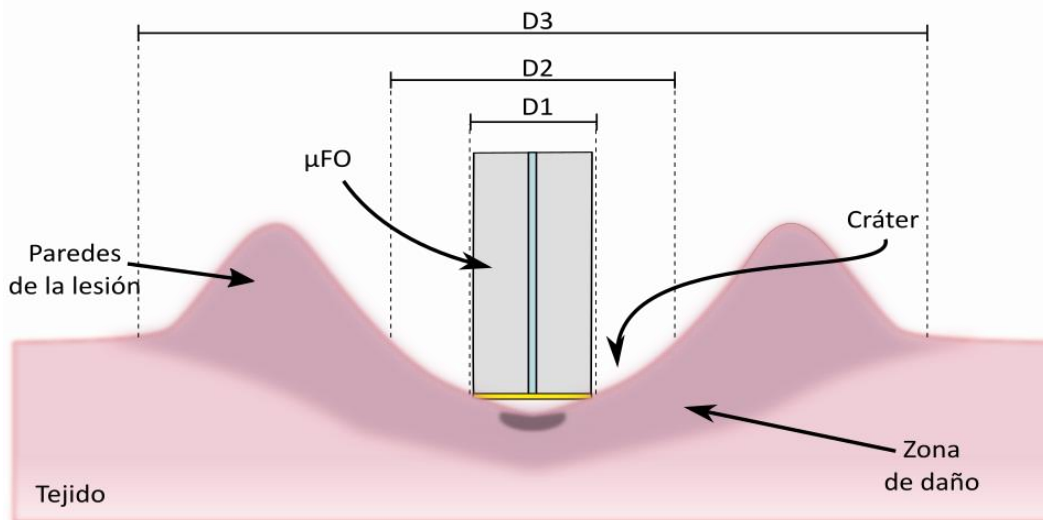


Figura 37. Esquema de la geometría de las lesiones superficiales en hígado de ratón obtenidas con los microcalentadores. Las lesiones tienen una forma de cráter donde el diámetro más interno corresponde al tamaño del μFO .

⁸ Se utiliza un compuesto de glicoles y resinas solubles en agua, llamado Tissue Tek®, que se congela a temperaturas < -10 °C.

⁹ Nikfaramj y su grupo utilizan una tinción NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide diaphorase staining) para observar actividad mitocondrial y con ella diferenciar el tejido viable del no viable [35, 36, 55].

¹⁰ Esto concuerda con lo expuesto en el capítulo 3, ver figura 19.

Para el caso de los μ FO-NTC se observó material residual en el fondo de la lesión (ver figura 35). Este material podría corresponder con residuos de carbón (carbonización local), debido a que, gracias a los NTC, este tipo de microcalentador alcanza temperaturas muy elevadas; sin embargo, es necesario realizar un análisis más riguroso sobre esto.

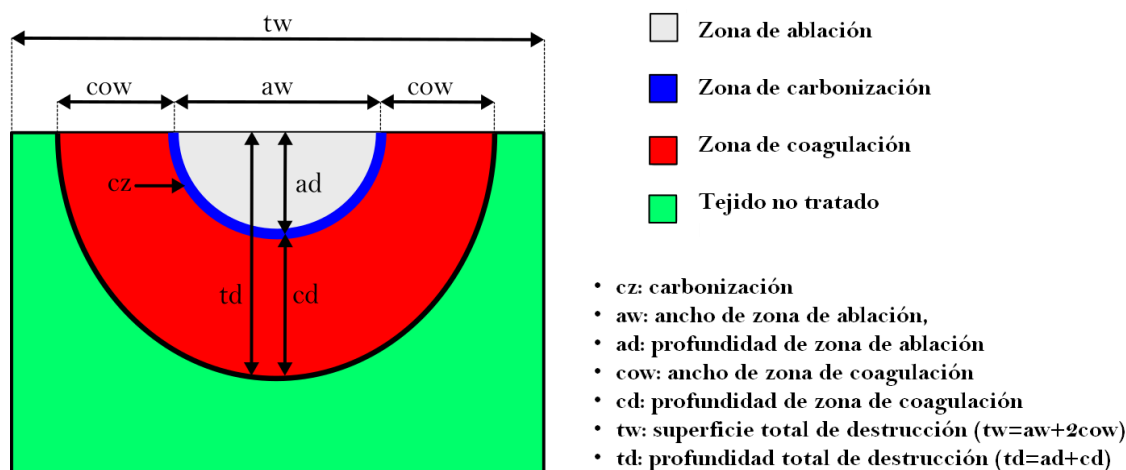


Figura 38. Zonas características de un tejido después de terapia fototérmica (ablación láser¹¹) utilizando fibras ópticas. Se distinguen tres regiones: zona de ablación, carbonización y coagulación. Imagen modificada de [33].

Con respecto a los círculos concéntricos observados en las lesiones (ver figura 31 y 32), el círculo más interno corresponde al tamaño del μ FO (ver figura 35). Por otro lado, los otros dos círculos externos corresponden a la pared de un anillo formado alrededor de la lesión (ver figura 37). Este tipo de característica morfológica podría coincidir a lo observado en investigaciones previas, en donde se han utilizado fibras ópticas para inducir la terapia fototérmica. Ryan y sus colaboradores han reportado tres zonas observadas en la lesión, un cráter en el centro de la lesión, una zona de tejido desecado con un borde elevado y una zona de edema¹² [84]. También, se han observado lesiones con un cráter (debido a la ablación láser) rodeado de una zona de coagulación, con una leve zona de carbonización entre estas dos zonas [33], ver figura 38. Por su parte, Menovsky menciona que dependiendo de la temperatura se observan distintas zonas en el tejido, si la temperatura supera los 100 °C se forma una cavidad en la vecindad de la fibra óptica debido a hemorragia y en esta zona se puede observar residuos con tejido carbonizado alrededor de la cavidad mientras que si la temperatura es menor a los 100 °C la región central consiste en tejido densamente coagulado; para ambos casos la región que rodea la zona central

¹¹ Durante la ablación láser se utilizan potencias ópticas muy grandes, lo que genera temperaturas por encima de los 200 °C y con ello se vaporiza el tejido localmente, entonces queda un hueco en la región tratada.

¹² Edema es la acumulación de líquido en el espacio extracelular o intersticial. Puede ser consecuencia de un aumento en la permeabilidad de la pared de los vasos sanguíneos (signo de inflamación).

consiste en tejido coagulado disperso por la infiltración de líquido intersticial y una zona externa con edema [43].

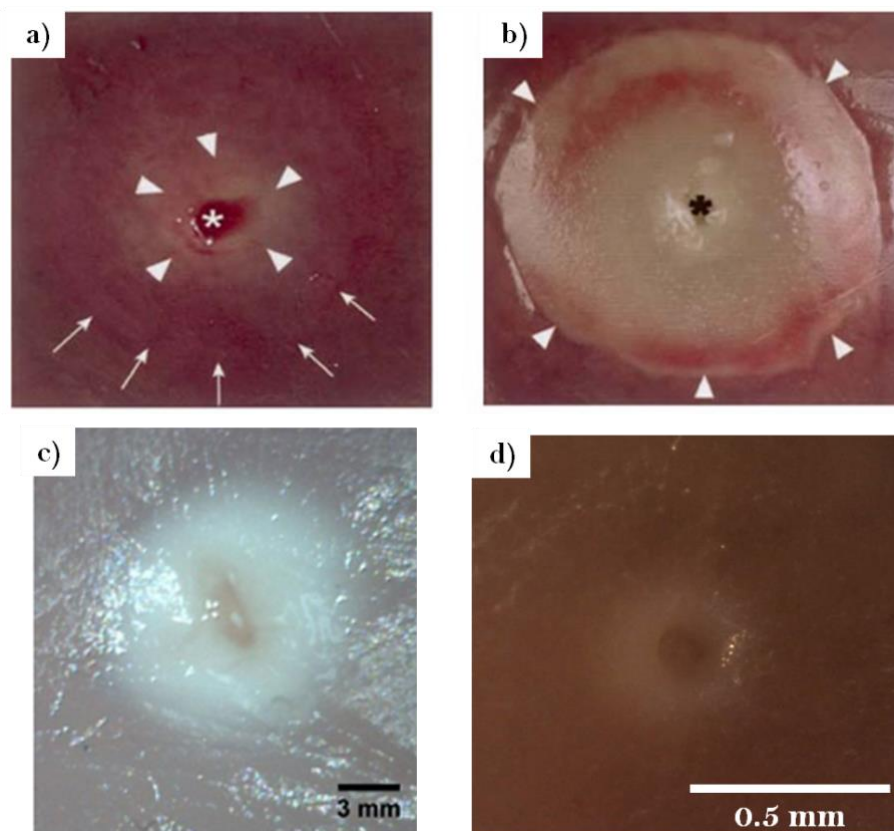


Figura 39. Zona de coagulación observada en terapia fototérmica aplicada mediante fibras ópticas. Esta zona se distingue por su color blanco. Lesión en un modelo *in vivo* de hígado de ratón (a) inmediatamente después de la terapia y (b) a las 48 hrs posteriores; el asterisco representa el lugar donde se colocó la fibra óptica. (c) Lesión en modelo *ex vivo* de músculo de pollo después de la terapia. (d) Lesión observada en nuestros experimentos, para el caso de un μ FO-NTC-Au utilizando 240 mW y 30 s. Imágenes tomadas de [35] y [132].

Cuando no se alcanza la vaporización del tejido, se ha reportado una zona de ablación en el centro de la lesión que está rodeada de una zona de coagulación. Esta zona de coagulación se visualiza como una región de color blanco en el tejido debido a la desnaturalización de las proteínas¹³ que lo conforman [29, 33, 35, 36, 55, 132], ver figura 39. Esta característica se ha observado tanto en muestras *ex vivo* [132] como en modelos *in vivo* [35, 36, 55], figura 39. Dependiendo de la potencia láser utilizada esta región blanquecina es más o menos fácil de diferenciar; para potencias ópticas grandes (mayor

¹³ Las proteínas desnaturalizadas cambian su geometría y por lo tanto su tamaño, esto ayuda a que exista esparcimiento de la luz en esta zona. Esta región afectada térmicamente esparce más la luz comparada con el tejido sano.

calor) es fácil de distinguir. En nuestro caso, notamos esta región blanca alrededor de la lesión en algunos casos (ver figura 39d); observamos una región blanca tenue comparada con lo reportado en estudios anteriores. En los estudios previos se ha observado una región más notoria debido a que utilizaron modelos *in vivo* y la zona de coagulación fue más evidente a las 48-72 h post-tratamiento, y también la potencia láser utilizada fue muy grande (≥ 2 W) comparada con la empleada en este estudio (≤ 0.3 W).

También es importante mencionar que no hubo evidencia clara que sustente si el depósito de NTC y oro se desprendió o no de los μ FO-NTC-Au, o pasara lo mismo con la película de oro de los μ FO-Au. A través de las imágenes de microscopía electrónica no se observó material residual de los microcalentadores sobre el tejido, sin embargo, esto debe ser estudiado más a detalle en experimentos futuros.

Esta serie de experimentos demostró que es posible aplicar terapia fototérmica mediante microcalentadores de fibra óptica, ofreciendo ventajas como el uso de NPs para aumentar el efecto fototérmico y utilizar potencia láser bajas, el control del tamaño de la lesión a través de la variación del tiempo de aplicación de la terapia y la modulación de la potencia láser, y el confinamiento del calor que se traduce en un daño muy localizado en el tejido resultando en daño local y necrosis focalizada.

Efecto de la terapia fototérmica en un modelo murino *in vivo* aplicada mediante μ FO

"Todos los investigadores honestos que conozco admiten que sólo son aficionados profesionales. Están haciendo lo que están haciendo por primera vez. Eso los convierte en aficionados. Tienen el suficiente sentido común para saber que van a tener un montón de problemas; eso los convierte en profesionales"

Charles Franklin Kettering (1876-1958)

6.1. Introducción

Después de comprobar que los microcalentadores de fibra óptica (μ FO) fueron capaces de provocar daño térmico local en tejido *ex vivo* de ratón, se propuso estudiar el efecto de la terapia fototérmica (TFt) en un modelo *in vivo*. Por tal motivo, se planteó evaluar el efecto de la terapia fototérmica en cerebro de ratón, debido a que en años recientes se ha empezado a utilizar esta terapia guiada mediante fibras ópticas en el cerebro humano para tratar diferentes patologías, principalmente cáncer de difícil acceso o inoperables (ver apéndice 1). Debido a algunas limitaciones experimentales sólo se evaluó el efecto de la terapia en tejido cerebral sano y no se estudió su efecto en tejido maligno (tumores).

En esta parte de la investigación se estableció como objetivo observar el daño provocado por la terapia fototérmica en tejido vivo y también se pretendió estimular muerte celular por vías diferentes controlando la temperatura de la terapia. De esta manera, se propusieron dos temperaturas para el experimento, 45 y 60 °C. La primera fue elegida porque se encuentra en el rango hipertérmico (hipertermia extrema) y causa muerte del tejido por apoptosis mientras que el valor de 60 °C se escogió porque esta temperatura se encuentra en el rango de ablación térmica y en este caso se ha reportado muerte celular por necrosis. Asimismo, se eligieron dos tiempos de terapia diferentes, 2 y 4 minutos.

6.2. Metodología

6.2.1. μ FO-Au

En este experimento sólo se utilizaron microcalentadores de fibra óptica con recubrimiento de oro (μ FO-Au). Se fabricaron ocho μ FO-Au, colocando una capa delgada de oro (~10 nm) sobre la punta de fibras ópticas, el depósito de oro se hizo a través de la técnica sputtering. Posteriormente, cada microcalentador fue caracterizado térmicamente utilizando la técnica de termometría de fluorescencia inducida por láser (TLIF), y con ello, se pudo establecer la potencia láser de activación necesaria para generar temperaturas de 45 °C o 60 °C (ver capítulo 4).

La punta de cada μ FO-Au fue introducida dentro de un tubo metálico hecho con una aguja de 22 G (diámetro interno de 700 μ m) para poder sujetarla fácilmente al aplicar la TFt en el cerebro de cada ratón. El tubo fue hecho cortando la aguja con ayuda de un esmeril; se cortó una sección de 1-1.5 cm de longitud y los extremos del tubo fueron lijados. El tubo se pegó al μ FO utilizando un adhesivo base cianoacrilato (pegamento tipo kola).

6.2.2. Animales

Ocho ratones machos CD1, de 8-10 semanas de edad y con peso de 30-35 g, del bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, fueron utilizados para este experimento. Se siguieron las disposiciones planteadas por la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) en el manejo de los animales. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por las comisiones de investigación y ética de la Facultad de Medicina. Los animales fueron divididos en dos grupos experimentales. Al primer grupo se le aplicó la terapia fototérmica a 45 °C mientras que el segundo grupo fue tratado con una temperatura de 60 °C. Para cada grupo de animales también se probaron dos tiempos de aplicación de la terapia fototérmica. La tabla 6 resume las condiciones experimentales usadas en este experimento.

# Ratón	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
1	45	120
2	45	240
3	60	120
4	60	240
5	45	120
6	45	240
7	60	120
8	60	240

Tabla 6. Condiciones experimentales utilizadas para evaluar la terapia fototérmica en un modelo *in vivo* de cerebro de ratón.

6.2.3. Aplicación de la terapia fototérmica

Una lesión térmica fue hecha en la corteza cerebral del hemisferio izquierdo¹ de cada ratón. Para realizar las lesiones se utilizó cirugía estereotáxica². Primeramente, el animal fue anestesiado con una mezcla de ketamina (100 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) vía inyección

¹ Debido a una limitación en el número de ratones no se tuvieron ratones control y ratones *sham* (condiciones simuladas, colocación del microcalentador en la corteza cerebral sin ser activado). En este experimento, el hemisferio derecho de cada animal se utilizó como tejido control.

² Procedimiento quirúrgico mínimamente invasivo que utiliza un sistema de coordenadas tridimensional para localizar estructuras específicas dentro del cerebro.

intraperitoneal. Posteriormente, el ratón fue colocado en un equipo de cirugía estereotáxica con adaptador para ratones (Lab Standar™, Steolting). Una vez inmobilizado el cráneo del ratón, se retiró el pelo de la parte superior de la cabeza y se hizo una incisión en la piel para exponer el cráneo. Seguido, se localizó el punto de referencia Bregma³ en la superficie del cráneo y se marcaron las coordenadas deseadas (AP: -1.5, L: 1.5). Con ayuda de una fresa de dentista ($\varnothing 1.28$ mm) acoplada a un taladro manual (Dremel Multipro 395) se hizo una trepanación en el lugar de las coordenadas.

El microcalentador fue esterilizado en una solución de etanol al 70% durante 10 minutos. Después, fue colocado en el adaptador del brazo del equipo estereotáxico (ver figura 40). En seguida, el μ FO-Au fue posicionado en la ubicación deseada (AP: -1.5, L: 1.5 y P: 0.2). Posteriormente, el microcalentador fue activado, encendiendo el láser infrarrojo a una potencia láser de activación previamente establecida, provocando que el μ FO se calentara a 45 o 60 °C, según sea el caso escogido. Luego de transcurrido el tiempo de terapia, el láser infrarrojo fue apagado y el microcalentador se retiró del cerebro del ratón. Por último, se suturó y limpió la herida del ratón. El animal fue puesto en observación mientras despertaba de la anestesia.

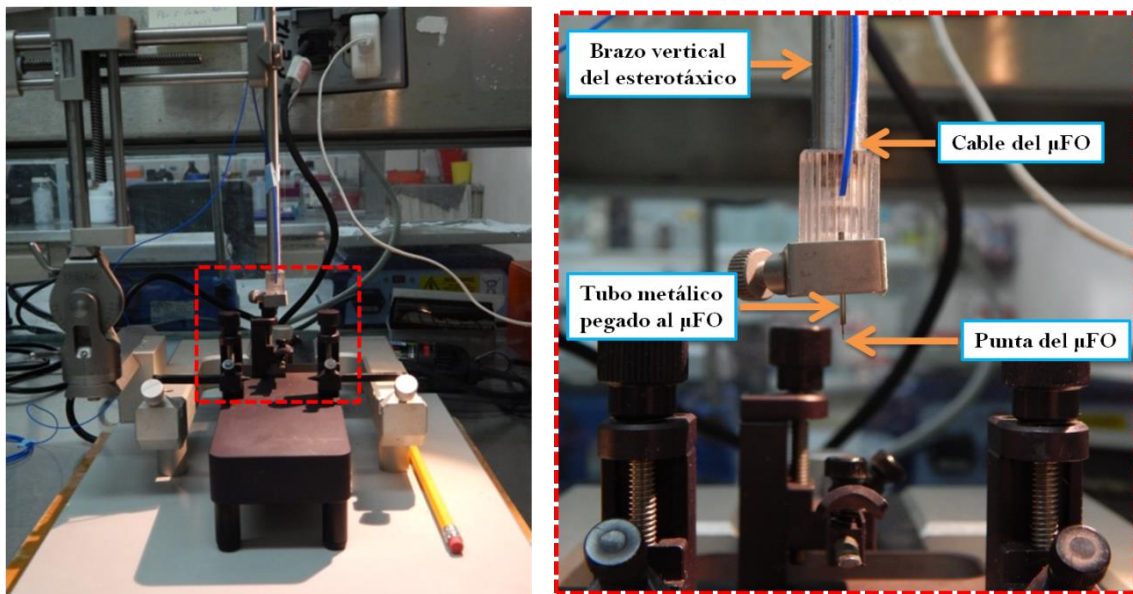


Figura 40. Equipo estereotáxico utilizado para la aplicación de terapia fototérmica en la corteza cerebral de un ratón. En la fotografía derecha se puede observar un acercamiento del brazo del equipo. El microcalentador fue sujetado en el adaptador del brazo por medio del tubo metálico pegado a éste.

³ Para realizar cirugía estereotáxica se utiliza un punto de referencia sobre el cráneo del ratón. Esta referencia se conoce con el nombre de Bregma y es el lugar anatómico del cráneo donde se interceptan la sutura coronal y la sutura sagital. Las coordenadas utilizadas en la cirugía estereotáxica se expresan como: antero-posterior (AP), lateral (L) y profundidad (P). El punto Bregma tiene coordenadas (0, 0, 0) [156].

6.2.4. Evaluación del daño

6.2.4.1. Histología

Transcurridas 48 horas después de la lesión fototérmica los animales 1-4 fueron sacrificados mediante inyección de pentobarbital (>40 mg/kg) vía intraperitoneal. Luego, el cerebro del ratón fue extirpado del cráneo y fijado en una solución de formol al 10% durante 24 horas. Posteriormente, el tejido fue incluido en parafina, rebanado en secciones de 5 µm de grosor utilizando un microtomo (Leica, RM2245) y las muestras fueron montadas en portaobjetos. Finalmente, las muestras obtenidas fueron teñidas usando una tinción estándar de hematoxilina y eosina (H&E)⁴.

6.2.4.2. Medición de caspasa-3 activada

La molécula caspasa-3 activada fue cuantificada para determinar la muerte celular debida a apoptosis en el tejido cerebral tratado con la Tft [158]. Para esto se utilizó un ensayo ELISA tipo sándwich⁵ y un kit de caspasa-3 para ratón en células lisadas (DuoSet[®] IC, DYC835-2). La cuantificación fue realizada como es descrita en el protocolo del fabricante. 48 horas posteriores a la lesión fototérmica los ratones 5-8 fueron sacrificados usando pentobarbital (>40 mg/kg) vía intraperitoneal. Luego, el cerebro del ratón fue extirpado del cráneo, se desechó el cerebelo y el cerebro se dividió en los dos hemisferios; el hemisferio izquierdo fue el lesionado mientras que el hemisferio derecho se usó como control. Cada hemisferio fue homogeneizado en un tampón de lisis celular utilizando un equipo ultraturrax (IKA, T10) y centrifugado a 13000 RPM durante 5 minutos. El sobrenadante de cada muestra fue recuperado y reservado para su cuantificación mediante la técnica ELISA.

Para el ensayo ELISA tipo sándwich, las muestras fueron puestas en una placa de 96 pocillos, con un tampón de captura previamente colocado. Luego, se agregó el anticuerpo de detección en los pocillos, y posteriormente, se añadió estreptavidina-HRP. Seguido, se adicionó la solución sustrato y transcurrido el tiempo de incubación se añadió la solución de paro en los pocillos. Finalmente, se determinó la densidad óptica de cada muestra a 450 nm usando un fotospectrómetro (BioTek, Epoch).

⁴ La tinción es utilizada para diagnosticar condiciones patológicas en cerebro [154].

⁵ ELISA: análisis del inmunoabsorbente unido a enzimas. La técnica permite detectar un antígeno en una muestra. El antígeno por detectar se une a un anticuerpo primario previamente inmovilizado en una superficie inerte, y posteriormente se agrega un anticuerpo secundario acoplado a una enzima que cataliza una reacción dando lugar a un producto detectable (cambio de color). La formación del producto coloreado es proporcional a la concentración de la proteína de interés en la muestra [157].

6.3. Resultados y discusión

6.3.1. μ FO-Au

Ocho μ FO-Au fueron fabricados y caracterizados para este experimento. El depósito de oro de los μ FO varió entre 10 y 10.8 nm de espesor. Los microcalentadores obtenidos presentaron una respuesta térmica lineal, es decir, la temperatura fue directamente proporcional a la potencia de activación en cada μ FO. Para cada μ FO se obtuvo la curva térmica característica mediante la técnica TLIF. A través de estas curvas se encontró la potencia láser de activación necesaria y la corriente eléctrica correspondiente para generar temperaturas de 45 y 60 °C para cada μ FO. La tabla 7 resume las particularidades obtenidas para los μ FO utilizados en este experimento.

# μ FO-Au	ERO (nm)	Curva característica (T vs P)		T (°C)	PL (mW)	CDL (mA)
		Ecuación	Ajuste lineal			
1	10.7	$T=0.2145P+25.8750$	0.9970	45	89.16	218.82
2	10.2	$T=0.2004P+20.9430$	0.9970	45	120.04	270.79
3	10.2	$T=0.1089P+29.6990$	0.9808	45	140.51	305.23
4	10.8	$T=0.2852P+25.6560$	0.9826	45	67.83	182.91
5	10.7	$T=0.2249P+45.4560$	0.9798	60	64.67	177.60
6	10	$T=0.1277P+51.9420$	0.9936	60	63.10	174.96
7	10.2	$T=0.5349P+33.2780$	0.9697	60	49.96	152.84
8	10.2	$T=0.3646P+34.5760$	0.9609	60	69.73	186.12

Tabla 7. μ FO-Au utilizados para los experimentos. A partir de la curva térmica característica se obtuvieron los parámetros necesarios para inducir temperaturas de 45 o 60 °C. Abreviaciones. ERO: espesor del recubrimiento de oro depositado en el μ FO, T: temperatura asignada al μ FO, PL: potencia láser necesario para alcanzar T, CDL: Corriente del diodo láser para obtener PL.

6.3.2. Lesiones fototérmicas

El experimento planteado permitió estudiar el daño provocado en la corteza cerebral de los ratones para dos temperaturas y dos tiempos de aplicación de la Tft diferentes. La tabla 8

muestra los parámetros experimentales y microcalentador de fibra óptica utilizados para inducir las lesiones fototérmicas en cada ratón.

	# Ratón	# μ FO-Au	Temperatura de la lesión ($^{\circ}$ C)	Tiempo de aplicación de la terapia (min)
Grupo 1 (Hipertermia)	1	1	45	2
	2	2	45	4
	5	3	45	2
	6	4	45	4
Grupo 2 (Termoablación)	3	5	60	2
	4	6	60	4
	7	7	60	2
	8	8	60	4

Tabla 8. Grupos y condiciones experimentales utilizadas en este estudio. Las características de los microcalentadores pueden ser consultadas en la tabla 7.

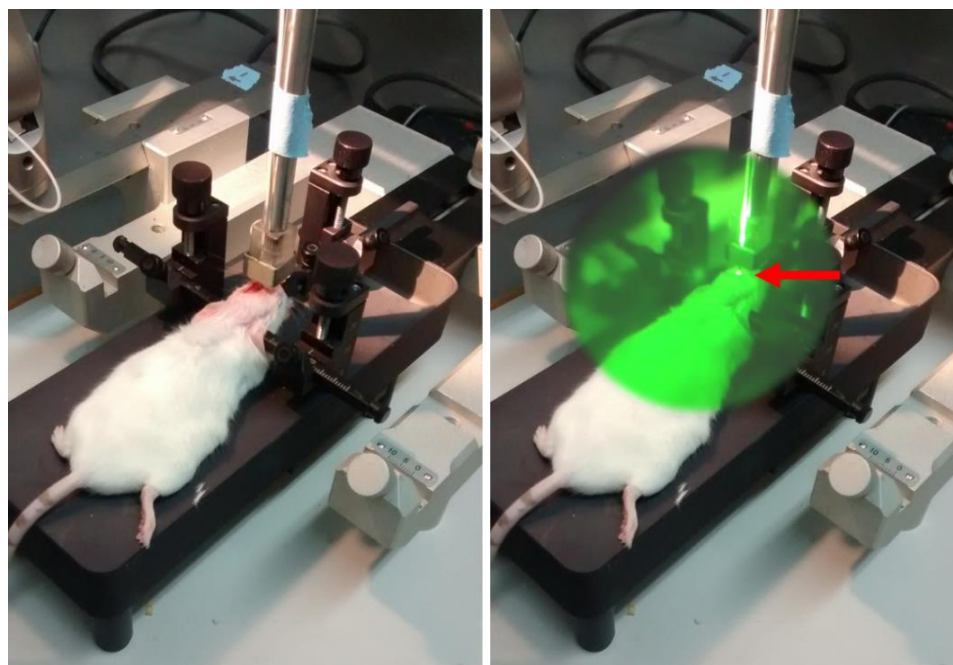


Figura 41. Inserción de un μ FO-Au en el cráneo de un ratón mediante cirugía estereotáxica. Un visor infrarrojo permitió verificar la activación del microcalentador y observar el punto de la terapia, señalada con una flecha (imagen de la derecha).

La figura 41 muestra el procedimiento quirúrgico y la aplicación de la terapia fototérmica en un ratón. En la fotografía de la izquierda se aprecia al ratón montado sobre la plataforma y el brazo del equipo estereotáxico sobre su cabeza. Un μ FO-Au fue introducido dentro del cráneo del ratón en las coordenadas establecidas. Cuando el microcalentador estuvo en contacto con la corteza cerebral del ratón éste fue activado (fotografía de la derecha). Mediante un visor infrarrojo⁶ (Electrophysics, 7215C) se pudo verificar que los microcalentadores se activaron en cada experimento; además el visor permitió observar el punto en el que se realizó la terapia fototérmica (flecha roja). Cuando el μ FO no estaba activado no se observó ningún punto luminoso en su punta.

Después de la terapia fototérmica no se observó ningún tipo de alteración en el comportamiento de los animales tratados. Esto tampoco fue observado durante las 48 horas posteriores al tratamiento. Asimismo, no se notaron indicios de infección en la sutura de los ratones.

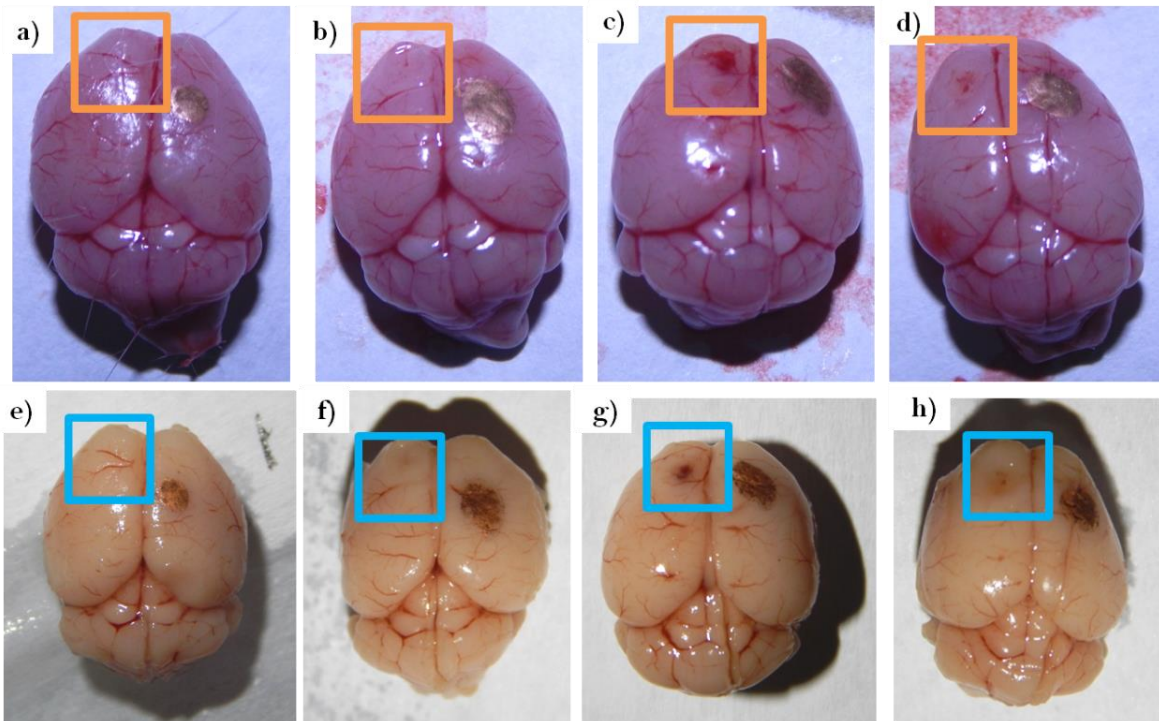


Figura 42. Cerebro de ratón lesionado debido a la terapia fototérmica. La fila de arriba muestra el cerebro 48 horas después de la aplicación de calor. Los cerebros corresponden a los ratones #1 (a), #2 (b), #3 (c) y #4 (d). La fila de abajo muestra los mismos cerebros después de ser fijados en formol. Los recuadros señalan la ubicación de las lesiones, y la mancha dorada muestra el tejido control.

⁶ El visor permite ver la luz infrarroja (975 nm) que viaja a través del microcalentador. La luz infrarroja se distingue en la imagen obtenida como regiones muy brillantes.

48 horas después del tratamiento los animales fueron sacrificados y se extrajo su cerebro. El tejido de los animales 1-4 fue fijado en formol para su posterior inclusión en parafina y tinción con H&E. El tejido obtenido de los animales 5-8 fue reservado para la cuantificación de caspasa-3 activada mediante el ensayo ELISA tipo sándwich. En todos los animales se utilizó el hemisferio derecho como tejido control.

La figura 42 muestra el cerebro de los ratones 1-4 inmediatamente después de ser retirados del cráneo (fila de arriba). En las fotografías se puede apreciar que para los animales tratados con temperaturas de 45 °C (figura 42 a y b) fue difícil ubicar el daño hecho sobre la corteza cerebral. En contraste, en los ratones tratados a 60 °C se pudo distinguir el daño provocado por la terapia (como una zona de coagulación alrededor del sitio de inserción del μ FO), ver figuras 42 c y d. El daño fue más evidente después de fijar el tejido en formol (fila de abajo). Aún después de la fijación no se pudo localizar con precisión el daño sobre la corteza de los cerebros para el caso de los ratones tratados a 45 °C (figura 42e y 42f). Para los ratones tratados a 60 °C fue más fácil apreciar la lesión después de fijado el tejido en comparación con el cerebro fresco. Los recuadros que aparecen en la imagen 42 muestran la ubicación de las lesiones. La mancha dorada en el hemisferio derecho de cada cerebro fue hecha para identificar el hemisferio control (no lesionado).

6.3.3. Histología

El daño provocado en el tejido se estudió a través de cortes histológicos de 5 μ m de grosor teñidos mediante H&E. Los cortes fueron hechos de manera transversal a la lesión para apreciar la profundidad del daño. Las figuras 43 a 46 muestran el daño observado en la corteza para los ratones #1 a #4. En estas figuras se puede observar que el tejido en donde se llevó a cabo la Tft presentó algunas interrupciones en el tejido que podrían indicar daño y que tuvieron diferentes dimensiones dependiendo de las condiciones experimentales utilizadas.

Es interesante notar que para el ratón 1 (45 °C y 2 minutos) sólo se observó una pequeña irregularidad del tejido sobre la corteza cerebral. Cuando ésta se examinó a una mayor magnificación (figura 43c) no se distinguió daño como el observado en el tejido de los 2, 3 y 4 (figuras 44, 45 y 46 respectivamente). Para el ratón 1 no se hará referencia de lesión.

Por su parte, la figura 44 muestra el tejido del ratón 2, que correspondió a la misma temperatura que el ratón 1 (45 °C) pero con el doble de tiempo de aplicación de la Tft (4 minutos). En este animal, se sospecha de un posible daño en la corteza cerebral. La geometría de la lesión parece coincidir con la geometría del microcalentador. Un caso similar a la lesión del ratón 2 se observó para el ratón número 3, animal tratado a una temperatura de 60 °C y 2 minutos.

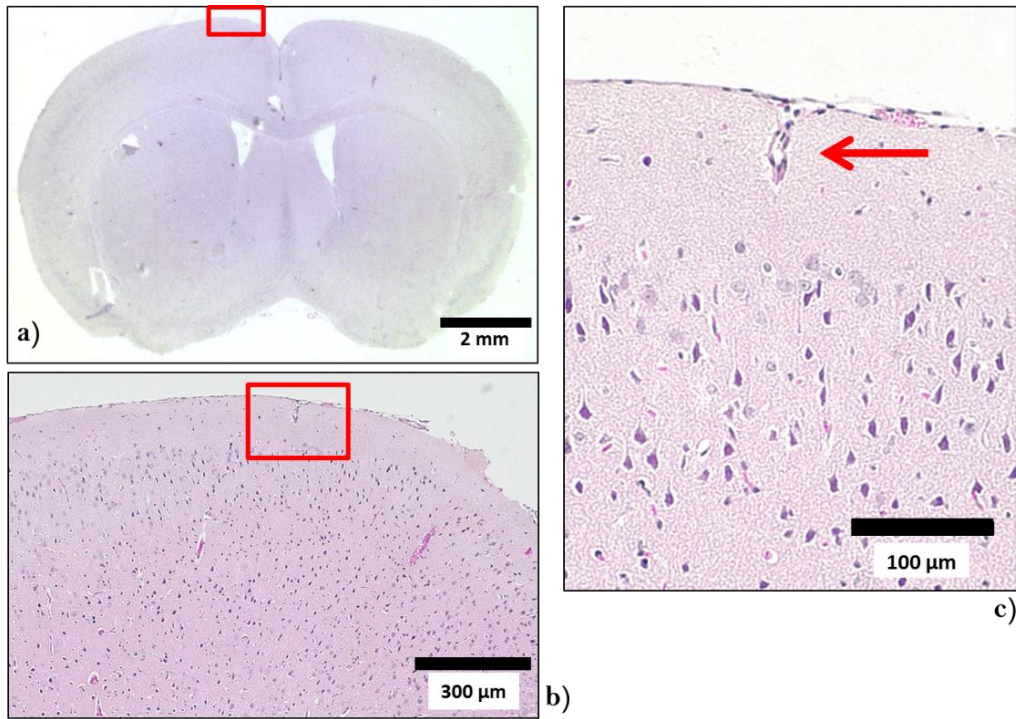


Figura 43. Irregularidad del tejido encontrada en la corteza cerebral del ratón 1. Dicho animal fue tratado a 45 °C por 2 minutos. Las imágenes b) y c) muestran un acercamiento de la discontinuidad del tejido observada después de tratar al animal.

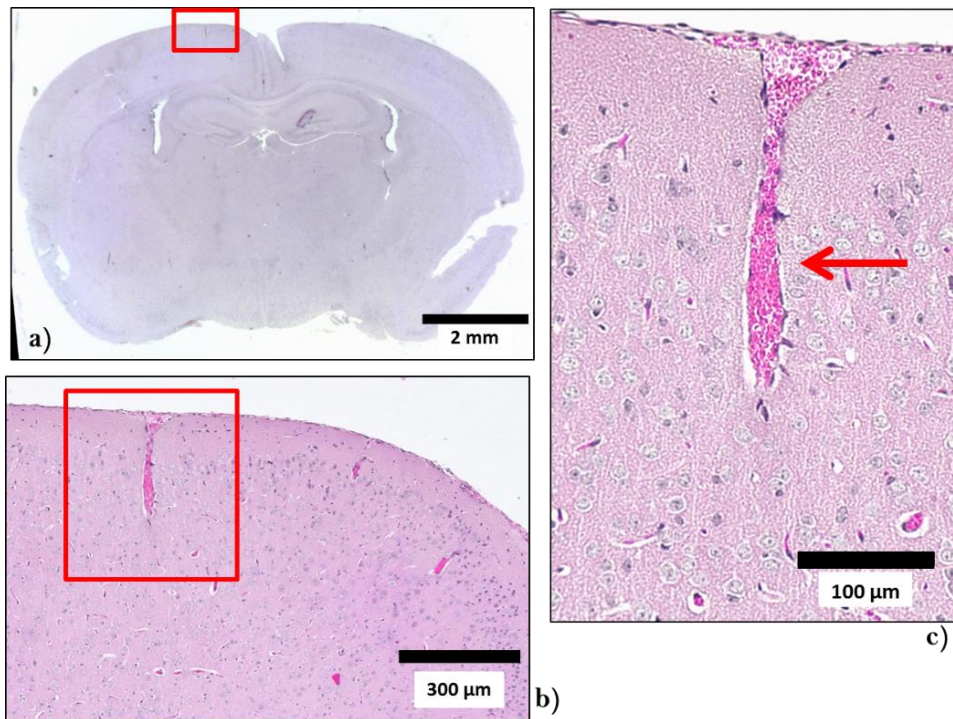


Figura 44. Posible daño fototérmico hecho en la corteza cerebral del ratón 2, correspondiente a una temperatura de 45 °C y 4 minutos. Las imágenes b) y c) muestran un acercamiento del daño.

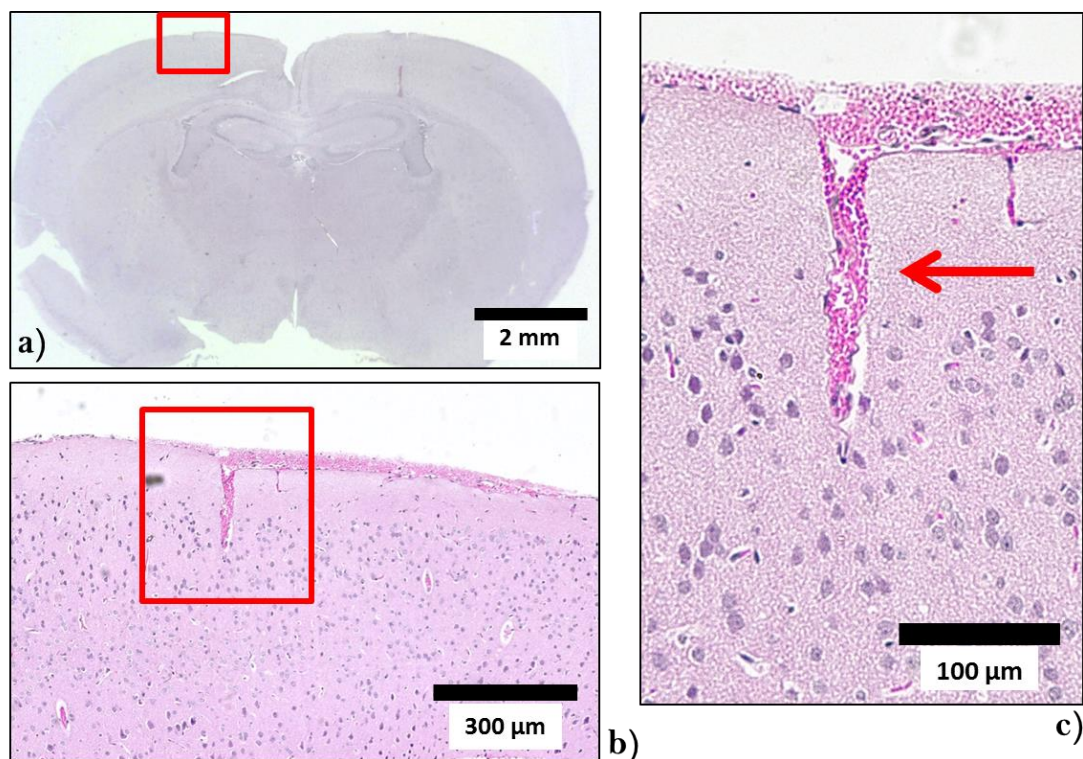


Figura 45. Posible daño fototérmica hecha en la corteza cerebral del ratón 3. El daño fue hecho con una temperatura de 60 °C por 2 minutos. En el recuadro de la derecha se observa un acercamiento del daño.

Para caso del ratón #4, correspondiente a una temperatura de tratamiento de 60 °C y 4 minutos (figura 46), se observó una lesión de una extensión mucho mayor con pérdida de la integridad del tejido cerebral; además, esta lesión no presentó bordes definidos que la delimitaran.

Para tener una comparación de las dimensiones de las “lesiones” se midió la profundidad y el ancho máximo (en la superficie de la corteza cerebral) de cada una, utilizando el software ImageJ. La tabla 9 muestra una comparación de las dimensiones de las lesiones inducidas con la Tft. Para el ratón #1 se midió el tamaño de la irregularidad observada en el tejido cerebral y de las posibles lesiones de los ratones #2 y #3.

Los cortes histológicos también mostraron la presencia de células dañadas en las lesiones fototérmicas. Debido a la técnica histológica utilizada fue difícil distinguir las características morfológicas de dichas células, por lo cual no se pudo verificar el tipo de muerte celular (necrosis o apoptosis). De esta exploración, sólo se distinguieron las células lesionadas en el caso del ratón 4 (60 °C y 4 minutos). En la figura 47b, se pueden observar neuronas dañadas en la periferia de la lesión mostrada en la figura 46 (ratón #4), las neuronas dañadas manifiestan una coloración intensa (flechas azules) mientras que las neuronas no lesionadas están señaladas con flechas amarillas. Asimismo, utilizando el software ImageJ

se determinó el área de daño (región donde se observaron células dañadas) (ver figura 47a); los resultados se presentan en la tabla 9.

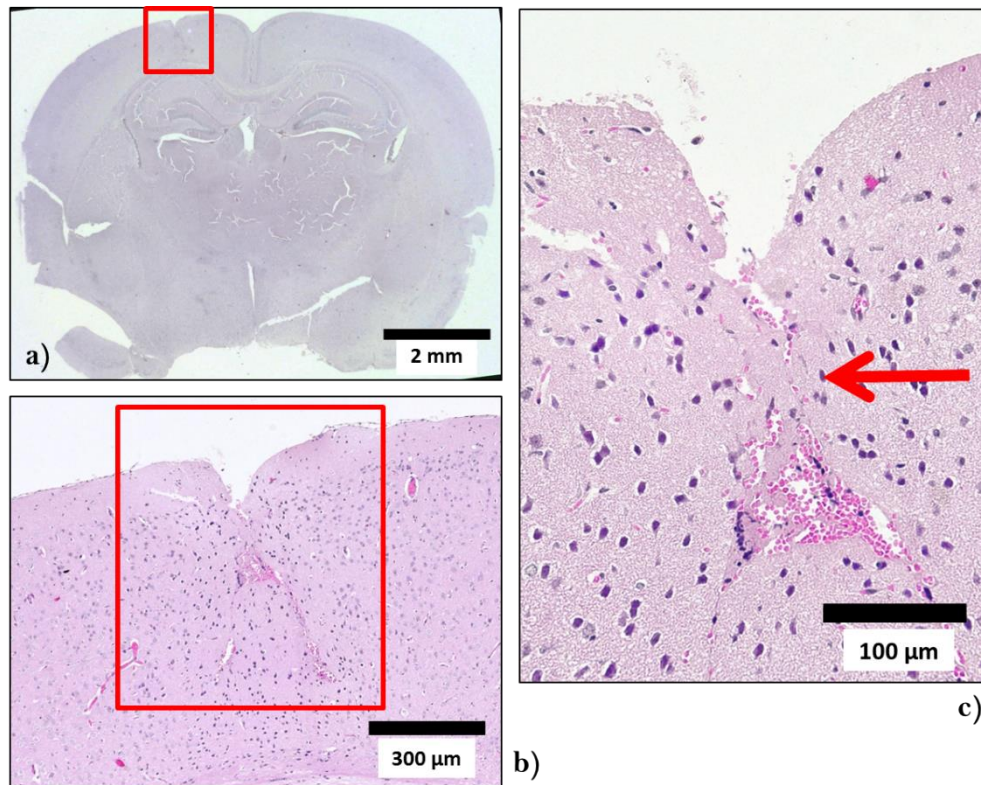


Figura 46. Lesión fototérmica hecha en la corteza cerebral del ratón 4. La lesión corresponde a 60 °C y 4 minutos. En el recuadro de la derecha se observa un acercamiento de la lesión.

# Ratón	Condiciones de la TFt (temperatura / tiempo)	Ancho superficial máximo (μm)	Profundidad (μm)	Área de daño (μm ²)
1	45 °C / 2 min	55.38	63.51	NA ⁷
2	45 °C / 4 min	120.37	260.01	NA
3	60 °C / 2 min	41.01	194.83	NA
4	60 °C / 4 min	147.77	644.71	635251

Tabla 9. Dimensiones de las lesiones y área de daño obtenidas para las diferentes condiciones experimentales estudiadas.

⁷ NA: no aplica. No se observaron células dañadas en la vecindad de la irregularidad o lesión.

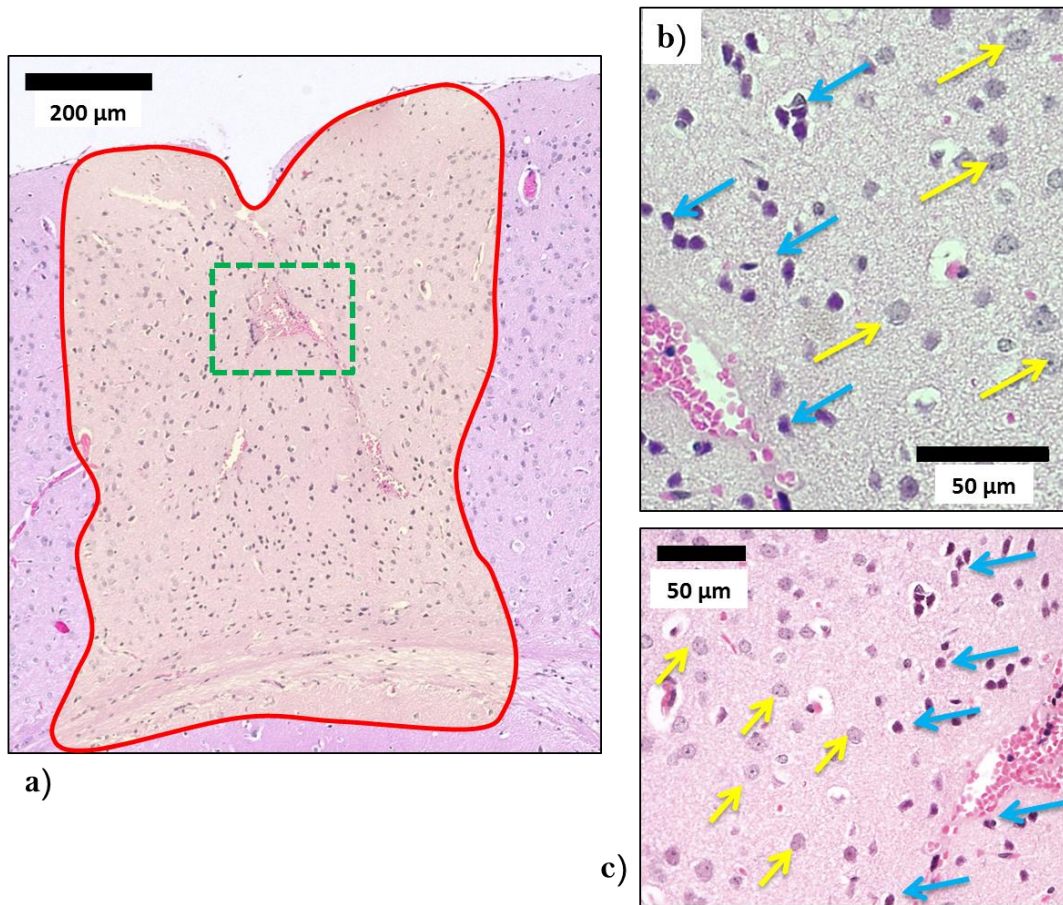


Figura 47. (a) Región de daño (células dañadas) en la lesión fototérmica inducida a 60 °C y 4 minutos. En los recuadros (b) y (c) se pueden distinguir las células dañadas (flechas azules) y células no dañadas (flechas amarillas) en dos regiones de la vecindad de la lesión (recuadro verde de la figura (a)).

6.3.4. Ensayo ELISA para caspasa-3 activada

Para identificar el tipo de muerte celular a nivel molecular, es decir, distinguir entre muerte por apoptosis o necrosis, se cuantificó la molécula caspasa-3 activada mediante un ensayo ELISA. Esta molécula fue medida porque está asociada a muerte celular apoptótica [5, 23, 155, 158, 161]. En la tabla 10 se aprecia la cantidad de caspasa-3 activada para los tejidos estudiados. Por su parte, la figura 48 muestra los niveles de caspasa-3 activada tanto para el tejido control (CONTROL), como el tejido lesionado (LESIÓN) de los ratones #5 a #8. En este caso se utilizó la prueba T de Student para obtener dicha comparación.

# Ratón	Condiciones experimentales	Concentración de caspas-3 activada (pg de caspasa /mg de tejido)	
		Hemisferio Control	Hemisferio Lesionado
5	45 °C/ 2 min	177.26	193.13
6	45 °C/ 4 min	204.36	151.97
7	60 °C/ 2 min	199.54	231.39
8	60 °C/ 4 min	211.37	105.57

Tabla 10. Concentración de caspasa-3 activada para los ratones lesionados mediante terapia fototérmica.

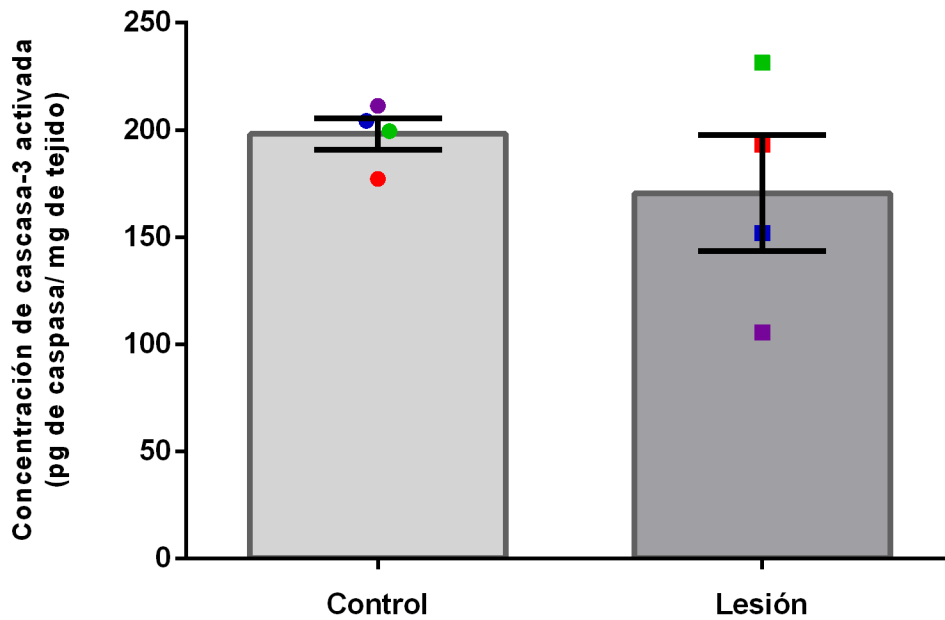


Figura 48. Concentración de caspasa-3 activada en tejido tratado con terapia fototérmica y en tejido control. La caspasa-3 se midió tanto en el hemisferio lesionado como en el hemisferio control. Los colores de los puntos indican los valores de la caspasa para los diferentes animales: rojo (#5), azul (#6), verde (#7) y morado (#8).

De la tabla 10 se puede apreciar que para los ratones #5 y #7 el hemisferio lesionado presentó niveles de caspasa-3 un poco más elevados que para el hemisferio control. Contrariamente, en los animales #6 y #8 los hemisferios control presentaron niveles de la molécula más altos en comparación con su correspondiente hemisferio lesionado. Es interesante notar que en el caso del #8, en donde se utilizaron las mismas condiciones

experimentales que para el ratón #4 en el que se obtuvo el mayor daño, los niveles de caspasa-3 activada entre los dos hemisferios difiere de forma importante, teniendo niveles bajos de caspasa-3. La figura 48 muestra una comparación entre la cantidad de caspasa-3 activada en el tejido lesionado y el tejido control, en ella se observa que en el tejido lesionado se ven alterados los niveles de caspasa-3 activada debido a la muerte celular provocada por la terapia fototérmica.

6.3.5. *Discusión*

Este experimento planteó estudiar el daño provocado por la TFt aplicada a través de los μ FO para dos temperaturas diferentes. La primera temperatura fue escogida a 45 °C por ser capaz de inducir muerte celular por apoptosis. Asimismo, se propuso usar 60 °C, temperatura que provoca muerte celular por necrosis. El estudio, también evaluó los efectos del tiempo de aplicación para dos valores diferentes, 2 y 4 minutos.

Después de la terapia fototérmica inducida mediante microcalentadores de fibra óptica se observaron lesiones en la corteza cerebral de los ratones. Se notó una clara diferencia entre las lesiones hechas a 45 °C y a 60 °C, y se confirmó que para una temperatura de 60 °C se generó un daño mayor, es decir, se obtuvieron lesiones más grandes. De igual forma, se comprobó que un mayor tiempo de exposición indujo lesiones de mayor tamaño (ver tabla 9). Esto concuerda con los resultados obtenidos en el capítulo anterior (ver figura 33).

Debido al minúsculo tamaño del daño fototérmico correspondientes a la temperatura de 45 °C, a simple vista no fue posible observar el daño sobre la corteza del cerebro de los ratones tratados a esta temperatura (figura 42). El tamaño de estas lesiones también dificultó ubicarlas cuando se realizaron los cortes histológicos. Por su parte, en las lesiones hechas a 60 °C fue fácil ubicar las lesiones sobre la corteza cerebral debido a la presencia de sangre (ver figura 42).

Los cortes histológicos revelaron la presencia de posible daño debido a la TFt. Para el caso del ratón #1, sólo se observó una pequeña irregularidad que interrumpe del tejido, y alrededor de la lesión no se observó señales de daño celular, sin embargo, después de analizar 20 cortes histológicos del ratón 1 fue la única señal de daño observable. En el caso de los ratones 2 y 3 se observaron lesiones con una geometría similar a la esperada después de introducir los μ FO-Au, similar a un canal. Estas lesiones mostraron la presencia de eritrocitos. En el caso del ratón 3 se observó un coágulo sobre la superficie de la corteza cerebral después de la TFt, lo cual también se puede apreciar en las figuras 42c y 45b. Sin embargo, no se advirtieron señales de daño celular en la vecindad de las lesiones. Esto podría sugerir que la lesión podría deberse a daño mecánico por la inserción de los μ FO, y

que además, éstos durante su trayectoria podrían haber coincidió con un vaso sanguíneo⁸ (que explicaría la presencia de los eritrocitos).

Por su parte, para el ratón 4, la histología reveló que sí existe daño fototérmico en la corteza cerebral, como se muestra en las figuras 46 y 46. También se observó la presencia de un coágulo en la lesión y daño celular en las neuronas ubicadas en la vecindad de la lesión. Dicho daño celular fue en una región poco extendida alrededor de la lesión, se observó que longitudinalmente toda la corteza cerebral del ratón presentó daño y que considerando las células lesionadas se obtuvo un área neta de daño de 850 μm de largo y ancho de 450 μm , la cual es un área de daño muy limitada pues el ancho de la lesión es 3 veces el diámetro del microcalentador, y el área total es menor a 1 mm^2 .

La tabla 9 muestra el ancho de las lesiones obtenidas. Se advierte que sólo en dos casos (ratón #2 y #4) el ancho de la lesión coincide con las dimensiones de los μFO (125 μm). Ambos ratones fueron tratados durante 4 minutos, logrando un mayor ancho de la lesión para el caso de 60 °C. En los otros dos ratones (#1 y #3), el ancho de las lesiones fue mucho menor que el diámetro de la fibra; esto podría deberse a diferentes razones, por ejemplo, no hubo un contacto óptimo entre el μFO y el tejido, el corte histológico no se hizo en la región correcta de la lesión por la dificultad para ubicarlas o las propiedades mecánicas del tejido modificaron las dimensiones de las lesiones después de extraer el μFO debido a que se trata de tejido blando. En cuanto a la profundidad de las lesiones los ratones tratados a 60 °C (#3 y #4) presentaron lesiones más profundas comparados con los ratones lesionados a 45 °C.

En las regiones control (hemisferios no tratados) no se observó señal de daño en ninguno de los ratones. La figura 49 muestra una comparación para el ratón con mayor daño (ratón #4) entre el hemisferio lesionado y el hemisferio control. En la figura se puede observar que el tejido en el hemisferio control (figura 49 b y d) conserva su anatomía normal, en contraste con lo observado en el hemisferio tratado (figura 49 c y d) en donde se observa la pérdida de la integridad de la corteza cerebral en el área tratada y la presencia de eritrocitos en la región central de la lesión. Asimismo, se observa una diferencia entre las neuronas en el tejido sano (flechas azules, figura 49 f y h) y el tejido lesionado (flechas verdes, figura 49 e y g). También se observó la presencia de neutrófilos⁹ en la región lesionada (flechas negras, figura 49e), que puede indicar un proceso de inflamación (aguda) en esta región.

⁸ Las lesiones podrían ser de hecho un vaso sanguíneo, pues la forma y las características de éstas son similares a las obtenidas en vasos sanguíneos de la corteza cerebral de cerebro sano [153, p. 395]

⁹ Células del sistema inmune. Después de una lesión cerebral células gliales, como astrocitos y microglía secretan citocinas que reclutan células inmunes como neutrófilos, que son las primeras células inmunes en responder [159].

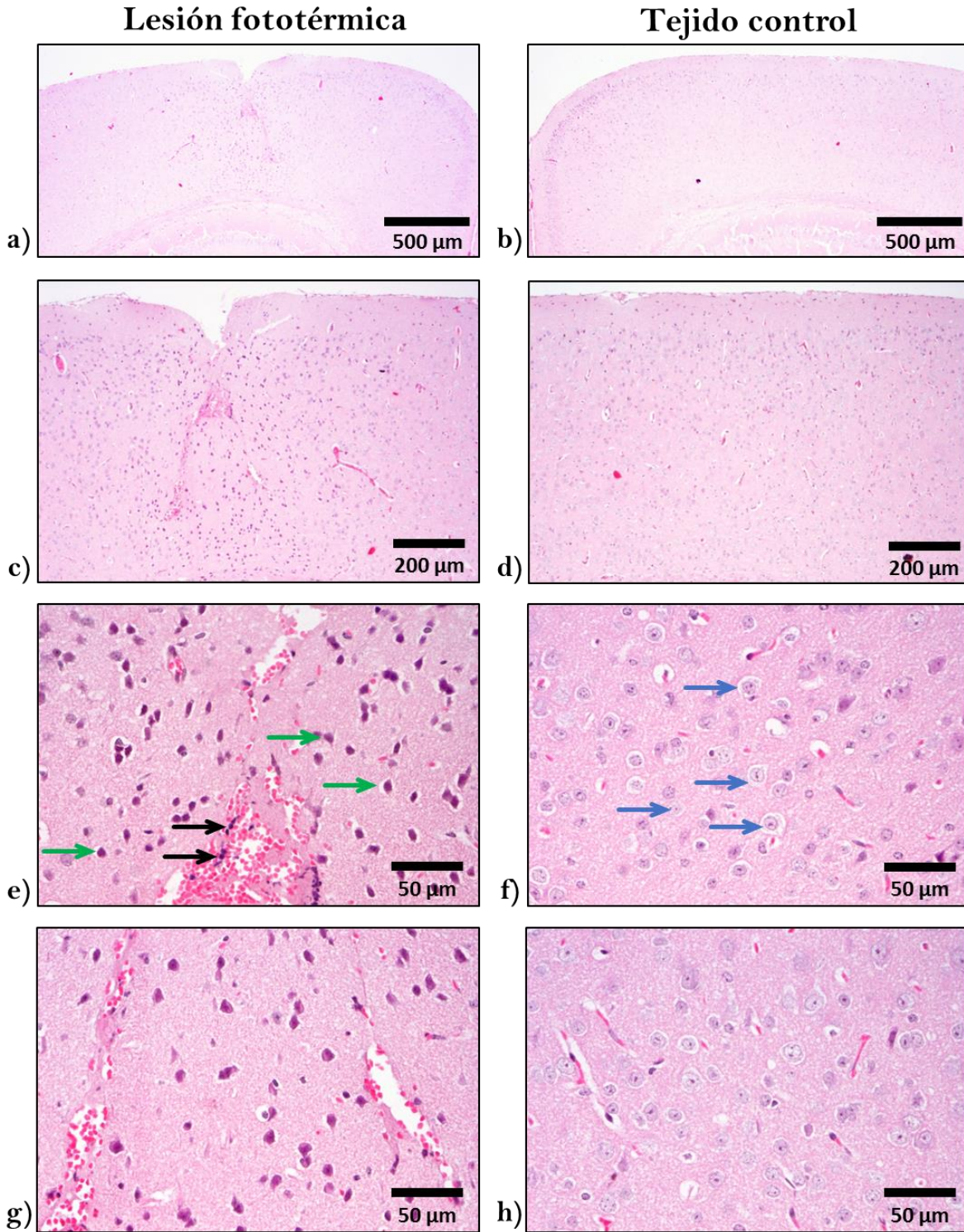


Figura 49. Comparación tisular entre el hemisferio tratado con terapia fototérmica (a, c) y el hemisferio control (b, d) para el caso de 60 °C y 4 minutos. En el tejido tratado se observa la pérdida de integridad del tejido, la presencia de eritrocitos, daño celular (flechas verdes). Las flechas azules señalan células sanas.

Investigaciones anteriores han estudiado las lesiones hechas con luz láser guiada a través de fibras ópticas en modelos *in vivo* de cerebro de rata o cerdo. La figura 50 muestra los resultados obtenidos por el grupo de Madsen; ellos reportan una lesión fototérmica en glioma¹⁰ de rata hecha a través de cirugía estereotáxica utilizando una fibra óptica de 200 μm de diámetro¹¹ y luz con una longitud de onda de 810 nm, 1 W de potencia y una exposición de 10 minutos; la conversión fototérmica fue lograda a través de nanopartículas de oro. En la figura se observa la lesión provocada por la TFt en corteza cerebral de rata (flecha, imagen 50a) y un corte histológico teñido con H&E correspondiente a la lesión 13 días después de la TFt [114] (imagen 50b). En la figura se puede observar un cráter en la corteza cerebral y la pérdida de integridad del tejido, similar a los resultados obtenidos con los microcalentadores, sin embargo, en este trabajo las lesiones son mucho más notorias debido a la potencia láser utilizada y el tiempo de aplicación. Debido a su imagen histológica presentada a baja magnificación en su artículo no fue posible comparar sus resultados histológicos con los observados en la figura 49.

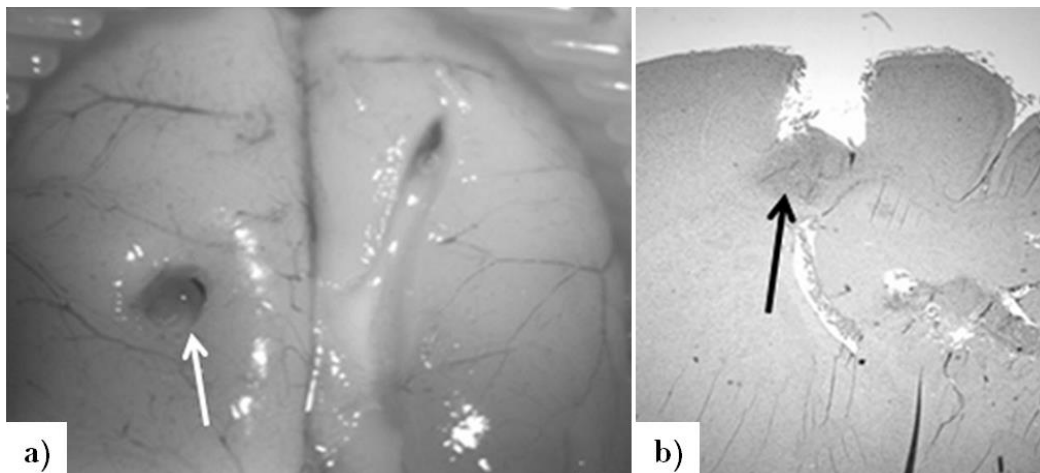


Figura 50. TFt aplicada mediante fibras ópticas en un modelo de glioma de rata, resultados presentados por Madsen y su grupo. (a) Daño sobre la corteza del cerebro de una rata y (b) corte histológico correspondiente (H&E). Lesión inducida utilizando 1 W de potencia y 10 minutos de exposición. Imagen modificada de [114]

Por otra parte, Ryan y su grupo estudiaron el efecto de la TFt aplicada a través de una fibra óptica especial, de 320 μm de diámetro, en cerebro sano de cerdo; los investigadores emplearon luz láser de alta potencia, 2 y 7 W de potencia, con una longitud de onda de 10.6 μm y una exposición de 0.2 segundos [84]. Sus resultados se muestran en la figura 51, en la cual se pueden observar las lesiones que obtuvieron sobre la corteza del cerebro (figura 51a) para diferentes potencias láser; también se presentan los cortes histológicos

¹⁰ Tumor cerebral más común y el más agresivo [7].

¹¹ La fibra fue insertada 1 mm dentro de la corteza del cerebro [114].

teñidos con H&E para dos casos experimentales en los que se pueden distinguir diferentes zonas de daño, una zona de ablación, región carbonizada y además una zona de coagulación alrededor de la lesión (ver sección 5.3.3, figura 38).

En los trabajos mencionados los investigadores obtuvieron lesiones más grandes en comparación con las obtenidas en el estudio presentado aquí, debido a diferentes factores, principalmente a la energía que utilizaron durante la Tft y a la conversión fototérmica. La máxima potencia utilizada en este estudio fue 140 mW (ver tabla 7) que es 7 veces menor a la utilizada por el equipo de Madsen y su grupo [114] y 14 o 50 veces menor que la utilizada por Ryan y sus colegas [84].

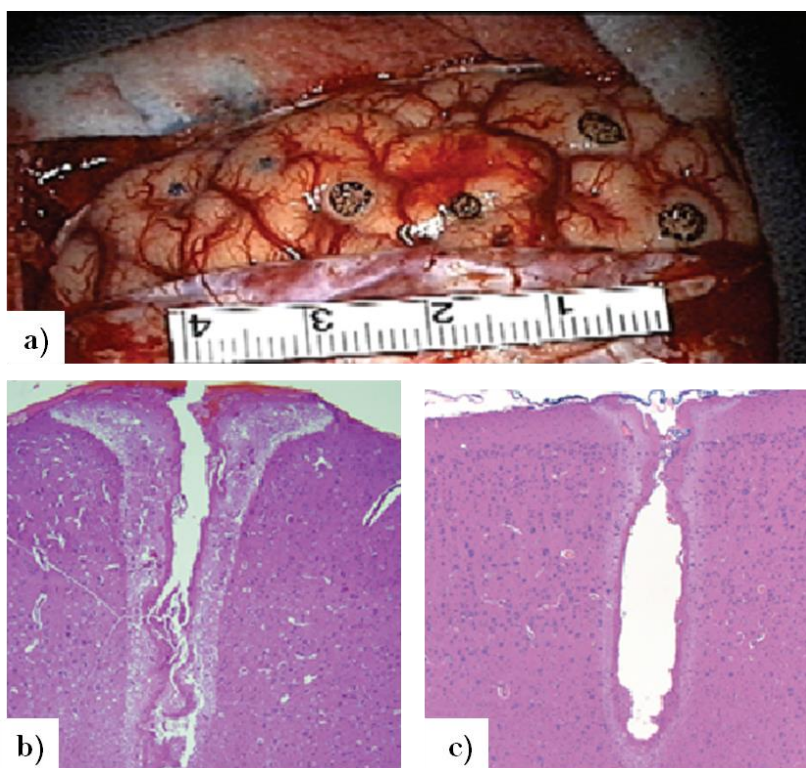


Figura 51. Tft aplicada mediante fibras ópticas en un modelo de cerebro sano de cerdo, resultados presentados por Ryan y su grupo. (a) Daño sobre la corteza del cerebro del cerdo para diferentes potencias (2 y 7 W). Corte histológico (H&E) para una lesión inducida 2 W (b) y 7 W (c). Imagen modificada de [84].

Por otro lado, del ensayo ELISA mediante el cual se cuantificó el nivel de caspasa-3 activada no se obtuvieron resultados concluyentes. En este caso se esperaba obtener niveles altos de esta molécula para el caso de los ratones tratados a 45 °C y niveles bajos para los ratones lesionados a 60 °C ya que la caspasa-3 es una molécula que participa en la muerte celular por apoptosis [5, 23, 155, 158]. En la tabla 10 se puede observar que no hay una tendencia clara de los resultados obtenidos, para el caso del ratón tratado a 45 °C

y 2 minutos (#5) se aprecia que los niveles de caspasa-3 activada para el tejido lesionado son un poco mayor que para el tejido control, sin embargo, esta diferencia es muy pequeña. En el caso del animal tratado a 60 °C y 4 minutos (#8), se observó una diferencia evidente entre los niveles del tejido lesionado y su control, en este caso el tejido lesionado tiene niveles bajos de esta molécula porque a 60 °C se propicia muerte celular necrótica. Para los ratones #6 (45 °C y 4 min) y #7 (60 °C y 2 min) se observó un comportamiento contrario al esperado. En investigaciones previas si se ha notado un aumento significativo de caspasa-3 activada en ratones tratados con terapia fototérmica observando un máximo en los niveles 12 horas después del tratamiento [160]¹². Los resultados no concluyentes podrían deberse a que se utilizó una gran cantidad de tejido durante el ensayo ELISA (hemisferio entero) y debido a algunas limitantes experimentales sólo se dispuso de un animal para evaluar cada condición experimental. En el futuro se propone utilizar sólo la corteza cerebral en el área de la lesión reduciendo la cantidad de tejido sano que puede eclipsar la molécula de interés; asimismo, es necesario aumentar el número de animales a tres como mínimo.

No obstante, es interesante observar que para los dos ratones (#5 y #7) estudiados a un tiempo corto (2 minutos) de terapia, los niveles de caspasa-3 activada fueron mayores en el tejido tratado que en el tejido control, y para los ratones en donde la TFF duró 4 minutos (#6 y #8) se observó que los niveles de caspasa fueron menores en tejido lesionado que en el tejido control. Esto puede sugerir que el impacto del daño térmico en el tejido no sólo depende de la temperatura alcanzada, sino también del tiempo de aplicación del calor. En terapia fototérmica intersticial se sabe bien que la relación entre la temperatura y el tiempo de aplicación de la terapia determina el daño y efectos biológicos (muerte celular) sobre el tejido [29], es decir, a mayor temperatura y mayor tiempo de exposición el tejido sufrirá un daño más extenso y agresivo. Para validar esto es necesario realizar más experimentos en trabajo a futuro.

Un punto importante a mencionar es que la temperatura designada para el tratamiento, ya sea 45 o 60 °C, es la temperatura promedio en una región próxima a la punta de los μ FO (ver capítulo 4). Durante la terapia fototérmica, el tejido en contacto directo puede llegar a alcanzar esta temperatura, sin embargo, debido a que el calor generado es muy local, el tejido alrededor del μ FO puede incrementar su temperatura a una temperatura a un valor menor al designado, entonces los efectos biológicos no serán los esperados. Esto podría explicar por qué en algunos casos los ratones presentaron lesiones muy pequeñas, por qué los niveles de caspasa-3 activada no fueron los esperados o la dependencia temporal de los niveles de caspasa-3 activada. De cualquier manera, es necesario realizar más experimentos para verificar o descartar estas propuestas.

Durante el desarrollo de este estudio surgieron algunos problemas que no se pudieron controlar o corregir. Por ejemplo, las lesiones fototérmicas se hicieron sobre la corteza cerebral de los ratones en las coordenadas preestablecidas, sin embargo, por un problema

¹² En este trabajo los investigadores utilizan un láser de 1064 nm de longitud onda, 2 W de potencia y 50 s de aplicación. Reportan que la temperatura del tejido alrededor de la terapia es de 39-41 °C [159].

con el equipo estereotáxico (desajuste mecánico) las lesiones variaron un poco su ubicación y profundidad (ver figura 43 y 44). Además, un problema muy significativo fue que debido a algunas restricciones se dispuso de pocos animales permitiendo evaluar cada condición experimental sólo una vez (n=1). Por tal motivo, en los resultados presentados no se mostraron datos estadísticos del estudio. Por esta misma razón, no fue posible contar con un control en el cual se evaluará el efecto de un microcalentador no activado.

A pesar de las limitantes experimentales, de las pruebas realizadas se concluye que es posible aplicar terapia fototérmica por medio de microcalentadores de fibra óptica y que estos provocan lesiones muy localizadas ($< 1 \text{ mm}^2$). Este tipo de tratamiento también permitió modular la temperatura de la terapia. Fue posible observar una diferencia entre el tejido el tejido dañado a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ y las lesiones provocadas a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, generando un daño mucho mayor a $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Sin duda este estudio debe ser complementado con diferentes técnicas a las utilizadas y algunas mejoras que ayudarán a la identificación de las lesiones, por ejemplo, se recomienda utilizar un tinte (tinta china fijada con ácido acético [84]) después de aplicada la TFt para la identificación de la zona tratada para el posterior procesamiento de muestras histológicas u otros ensayos, como la identificación de células gliales a través de inmunohistoquímica con anticuerpos para GFAP (proteína fibrilar acídica de la glia) que permiten observar gliosis [153]. Asimismo, la información molecular podría complementarse con algún ensayo como TUNEL¹³ [160] o la cuantificación de otra molécula asociada a muerte por apoptosis como $\text{TNF}\alpha$ [72, 75].

¹³ Técnica utilizada para detectar apoptosis en células muertas. La técnica marca la terminal escindida de fragmentos de ADN [5].

CONCLUSIONES

"En el amor de la ciencia y de la patria está la salud del pueblo"

Ezequiel A. Chávez (1868-1946)

Si bien la terapia fototérmica apareció en las décadas de 1960 y 1970, es hasta los últimos 20 años que ha cobrado un interés creciente alrededor del mundo debido a las ventajas y cualidades que ofrece sobre otros tipos de tratamientos anticáncer. Una de las características principales de esta terapia es que la luz permite calentar regiones espaciales pequeñas de manera rápida, confinando el calor en el área de interés (tumor), destruyendo sólo ésta área y protegiendo el tejido sano que la rodea. Otras ventajas de la terapia fototérmica incluyen, poder transportar la luz láser al interior del cuerpo humano a través del uso fibras ópticas, realizar la terapia usando procedimientos quirúrgicos mínimamente invasivos, es compatible con la técnica de resonancia magnética con la cual ha sido posible guiar fibras ópticas hasta el sitio de interés y monitorear en tiempo real la temperatura alcanzada durante el tratamiento, los efectos secundarios de la terapia son mínimos, la estancia hospitalaria de los pacientes es menor a tres días, entre otros.

Hoy día, la terapia fototérmica es utilizada para el tratamiento de diversas patologías, sobre todo como terapia anticáncer. Actualmente, esta terapia es empleada para tratar tumores de difícil acceso, tumores alojados profundamente, tumores inoperables como los ubicados en zonas de elocuencia, gliomas de alto grado, tumores recurrentes de alto grado, metástasis cerebral, necrosis por radiación, epilepsia e incluso para la descompresión de discos intravertebrales.

Con el advenimiento de la nanotecnología la producción de calor en terapia fototérmica se ha visto mejorada y diversos nanomateriales han sido estudiados para este efecto. Las investigaciones actuales muestran resultados alentadores sobre el uso de nanopartículas (NPs) para el tratamiento de tumores malignos. Sin embargo, para utilizar nanopartículas como agentes fototérmicos para la destrucción de tumores es necesario inyectar previamente éstas al sitio de interés. Si las nanopartículas son administradas de forma sistémica un número reducido de éstas llega al tejido de interés debido a diferentes fenómenos biológicos. En la actualidad, la terapia fototérmica inducida con NPs como alternativa clínica busca utilizar binomios láser-agentes fototérmicos que sean eficientes y accesibles para maximizar la conversión fototérmica a través del uso equipos y materiales asequibles; sin olvidarse de la biocompatibilidad y biodegradación de las NPs.

Recientemente, se ha reportado la fabricación de dispositivos de fibra óptica que utilizan nanopartículas de diferentes materiales adheridas a su superficie para generar calor puntualmente. Dichos dispositivos se conocen como microcalentadores de fibra óptica (μ FO). En este trabajo se propuso utilizar estos dispositivos fototérmicos para aplicar la terapia fototérmica en tejido de ratón sin la necesidad de inyectar nanopartículas previamente al animal, y posteriormente, estudiar el efecto de la terapia provocado sobre el tejido.

Como primera etapa del proyecto se evaluó el uso de distintos nanomateriales para la creación de un microcalentador de fibra óptica óptimo para aplicar terapia fototérmica en tejido biológico. Cuatro tipos de μ FO fueron fabricados en base a los dos nanomateriales más utilizados en terapia fototérmica: los nanotubos de carbono (NTC) y nanopartículas de oro (NP-Au). De esta manera, se fabricó un μ FO con NTC, un μ FO con NP-Au, un μ FO

con NTC y recubrimiento de oro y finalmente, un μ FO con recubrimiento de oro (10 nm de grosor). Se propusieron métodos de fabricación simples, accesibles y de bajo costo para la creación de estos microcalentadores. Los cuatro tipos de μ FO fueron capaces de generar calor. La superficie de los μ FO fue estudiada por medio de microscopía electrónica de barrido y también se evaluó la adhesión entre el material fototérmico y las fibras ópticas. Como resultado de las pruebas hechas se encontró que el μ FO con recubrimiento de oro es la mejor opción para inducir terapia fototérmica debido a que el recubrimiento queda unido de manera permanente a la fibra óptica, evitando la pérdida del material fototérmico durante la terapia, y además, la técnica utilizada para depositar oro en la fibra óptica crea una nanopelícula homogénea que permite generar calor de manera uniforme.

Conocer la temperatura del dispositivo que calienta el sitio de interés durante la terapia fototérmica es de suma importancia. Por este motivo, durante una segunda etapa del proyecto se midió y visualizó la temperatura generada por los μ FO. En este trabajo se utilizó la técnica de termometría de fluorescencia inducida por láser (TLIF) por las cualidades que ofrece, como un arreglo experimental sencillo y que la resolución espacial de la técnica depende del sistema de magnificación óptico empleado (objetivo de microscopio). La técnica TLIF permitió cuantificar la temperatura en un área alrededor del μ FO y también proporcionó una imagen de la zona de calentada. Para alcanzar dicho objetivo se propuso un método sencillo, accesible y de bajo costo para la fabricación de membranas termosensibles basadas en la inclusión de un tinte fluorescente (rodamina B) en una matriz polimérica (polidimetilsiloxano). La técnica TLIF usa dichas membranas para la medición del calor generado por los μ FO. La combinación de la técnica TLIF y las membranas propició un proceso de calibración sencillo y rápido. Todo lo anterior permitió obtener mapas de temperaturas para los μ FO con recubrimiento de oro. Los mapas fueron calculados utilizando un programa de análisis de desarrollo propio.

A partir de los mapas de temperatura obtenidos para los μ FO, se pudo calcular una curva térmica característica para cada uno de éstos. Dichas curvas permitieron establecer una relación entre la temperatura generada por cada μ FO y la potencia láser de activación empleada en cada condición experimental. Con esta información fue posible definir valores precisos de potencia láser de activación para generar temperaturas específicas dentro del rango de trabajo de la terapia fototérmica. Durante el estudio, se propuso trabajar con dos temperaturas diferentes. Por una parte, se definió la potencia láser de activación para 45 °C, debido a que para esta temperatura se ha reportado muerte celular por apoptosis. Por otro lado, se determinaron los valores de potencia necesarios para generar temperaturas de 60 °C, temperatura que conlleva a las células a morir por necrosis. Los mapas de temperatura obtenidos también permitieron demostrar que el calor generado por los μ FO es muy local, reduciendo el daño térmico en un área menor a un milímetro y que dependiendo de la potencia de activación se pueden lograr temperaturas mayores a 80 °C.

El efecto de la terapia fototérmica aplicada mediante μ FO se evaluó en ratones. Debido a que la terapia sólo había sido reportada mediante el uso de fibras ópticas y no con μ FO,

se hicieron algunas pruebas preliminares en hígado (*ex vivo*). Estas pruebas iniciales permitieron estudiar el daño en el tejido para diferentes condiciones experimentales, modificando la potencia láser de activación de los μ FO y el tiempo de irradiación. La morfología de las lesiones obtenidas fue estudiada a través de imágenes de microscopía óptica convencional y microscopía electrónica de barrido. Además, el daño provocado en el tejido fue examinado a través de cortes histológicos teñidos con la técnica de hematoxilina y eosina (H&E). Variando las condiciones experimentales fue posible modificar el tamaño de las lesiones. Se observó que el tamaño de las lesiones fue directamente proporcional a la potencia láser utilizada para activar los μ FO, y existe un comportamiento logarítmico entre el tamaño de la lesión y el tiempo de aplicación de la terapia. Asimismo, se comprobó que los μ FO con recubrimientos son mejor opción para inducir la terapia fototérmica, pues generan un calor más local y sin rastros de residuos dentro del tejido en comparación con los μ FO con NTC y recubrimiento de oro.

De las pruebas preliminares en hígado de ratón, se demostró que el daño provocado por la terapia fototérmica aplicada a través de μ FO (TfT- μ FO) es muy local y poco extendida, provocando lesiones un orden de magnitud mayor que el diámetro de los μ FO (125 μ m). Las lesiones obtenidas tuvieron un diámetro menor a 1.2 mm y la histología mostró una zona de muerte celular poco extendida alrededor de las lesiones. Las lesiones fueron de menor tamaño y con un daño más local cuando se realizan con μ FO con recubrimiento de oro.

Finalmente, se evaluó el daño provocado por la terapia fototérmica en un modelo *in vivo* de cerebro de ratón, para las dos temperaturas de interés (45 y 60 °C). TfT- μ FO fue hecha a través de cirugía estereotáxica. Las lesiones resultantes fueron examinadas a través de la técnica de H&E y también se midió la cantidad de caspasa-3 activada asociada a muerte apoptótica mediante un ensayo de ELISA tipo sándwich. En esta parte del estudio se observaron células lesionadas en la vecindad de las lesiones para el caso de mayor calor (60 °C y 4 minutos), con un daño celular reducido muy cercano a la región de tratamiento. Los resultados obtenidos relacionados a la cuantificación de caspasa-3 activada sugirieron que para una temperatura de 45 °C se obtuvo una mayor cantidad de células apoptóticas que para 60 °C. Sin embargo, estos resultados deben ser verificados con experimentos futuros.

A pesar de ciertas limitaciones experimentales se demostró que es posible inducir daño térmico sobre tejido sano de ratón por medio de terapia fototérmica aplicada a través de microcalentadores de fibra óptica. Este tipo de terapia es capaz de lesionar de forma extremadamente local el tejido de interés provocando un daño minúsculo en él (<1 mm) sin necesidad de inyectar nanopartículas en el animal. Al confinar el calor en la punta del μ FO la muerte celular abarca una región pequeña reduciendo el daño térmico en tejido. La TfT- μ FO también permite modular la temperatura generada por los μ FO y con ello es posible establecer el rango de operación de la TfT, es decir, hipertermia o ablación térmica. Una vez seleccionado el rango deseado, también es factible cambiar el tamaño de la lesión variando un poco la potencia láser de activación del μ FO alrededor de un valor preestablecido sin modificar el camino de muerte celular establecido.

Pese a las complicaciones por las que atravesó esta investigación, se mostró, de forma exploratoria, la capacidad que tienen los microcalentadores de fibra óptica para ser posibles candidatos como aplicadores de terapia fototérmica altamente localizada. Debido a la novedad de la propuesta este estudio también establece bases en diferentes rubros para investigaciones posteriores.

En trabajo futuro el daño hecho con los μ FO podría ser extendido a un área mayor utilizando un arreglo de varios microcalentadores, similar a la configuración usada en el endoscopio en donde se utiliza un manojo de fibras ópticas. Asimismo, en investigaciones siguientes se pretende evaluar la Tft- μ FO en tumores. Debido a las cualidades de la Tft- μ FO, creemos que ésta podría ser usada en el futuro para el tratamiento local de cualquier tipo de tumor sólido o para tratar otras patologías donde sea necesario provocar muerte celular de manera local y controlada. Además, el efecto fototérmico aplicado mediante μ FO también puede ser aprovechado en investigación biomédica básica, en estudios donde se necesiten fuentes térmicas muy pequeñas o para generar lesiones diminutas en modelos animales como roedores.

Apéndice 1

Sistemas comerciales para terapia fototérmica intracraneal

La terapia fototérmica para el tratamiento de tumores intracraneales data de la década de los 70's, sin embargo, durante los años 80's este tipo de procedimientos se enfrentó a problemas tecnológicos como la incapacidad de monitorear los efectos térmicos del láser y predecir la extensión del daño en el tejido o la falta de sistemas de enfriamiento para los láseres de alta potencia utilizados en ese momento [29, 31, 87, 91, 152]. Hoy día, estos problemas han quedado atrás y la tecnología vigente permite ir mucho más lejos. Actualmente, dos sistemas comerciales de terapia fototérmica intracraneal (TFI) han sido aprobados en Estados Unidos para el tratamiento de diversos tumores. Ambos sistemas se ayudan de navegación a través de imágenes por resonancia magnética (MRI) para llegar al tumor, monitorean el calor generado en tiempo real mediante MRI y además permiten identificar el contorno del área dañada mediante software. Estos equipos son el sistema Visualase® y el sistema Neuroblate® [29, 31, 87-89, 91, 152].

Los sistemas mencionados han sido propuestos para la ablación láser de tumores inaccesibles quirúrgicamente o donde los tratamientos habituales han fallado. Para tumores accesibles el estándar terapéutico consiste en la resección máxima del tumor y la administración de radioterapia y quimioterapia [22, 87]. Sin embargo, para tumores profundos¹ o dentro y/o cerca de áreas de elocuencia² son relegados a biopsias o se trata de lograr la máxima reducción del tumor y con ello minimizar el daño neurológico. Además, tampoco existe un protocolo estándar para gliomas recurrentes de alto grado³ y sus opciones de tratamiento son limitadas incluyendo re-resección, re-irradiación, quimioterapia sistémica, y braquiterapia [87].

¹ Tumores ubicados a más de 2 cm de la superficie de los hemisferios [29].

² Son las zonas específicas en la corteza cerebral relacionadas con determinadas funciones como el lenguaje, la visión, el tacto y la motricidad [161].

³ Los gliomas son los tumores de las células gliales del cerebro (astrocitos, oligodendrocitos, microglía, ependimocitos). Los gliomas son los tumores cerebrales más comunes (80% de los tumores malignos). Los gliomas se pueden clasificar en 4 grupos dependiendo de su grado de malignidad, los gliomas de grado 3 y 4 son los más agresivos [7].

Actualmente los sistemas Visualase® y Neuroblate® han sido propuestos para tratar pacientes con tumores profundos, tumores cerebrales en áreas elocuentes, tumores inaccesibles, metástasis cerebral, gliomas de alto grado (ver figura A1-1), tumores recurrentes de alto grado, necrosis por radiación⁴ e incluso epilepsia o para la descompresión de discos intravertebrales [22, 29-31, 87-92, 152, 162]. El objetivo de la ablación láser intracraneal es lograr necrosis coagulativa en un volumen de interés mientras se previene daño alrededor del tejido sano [29]. Algunos investigadores resaltan la importancia que este tipo de tecnología tendrá en años venideros mencionando que “la ablación láser es la siguiente gran cosa en el manejo de tumores cerebrales” [29].

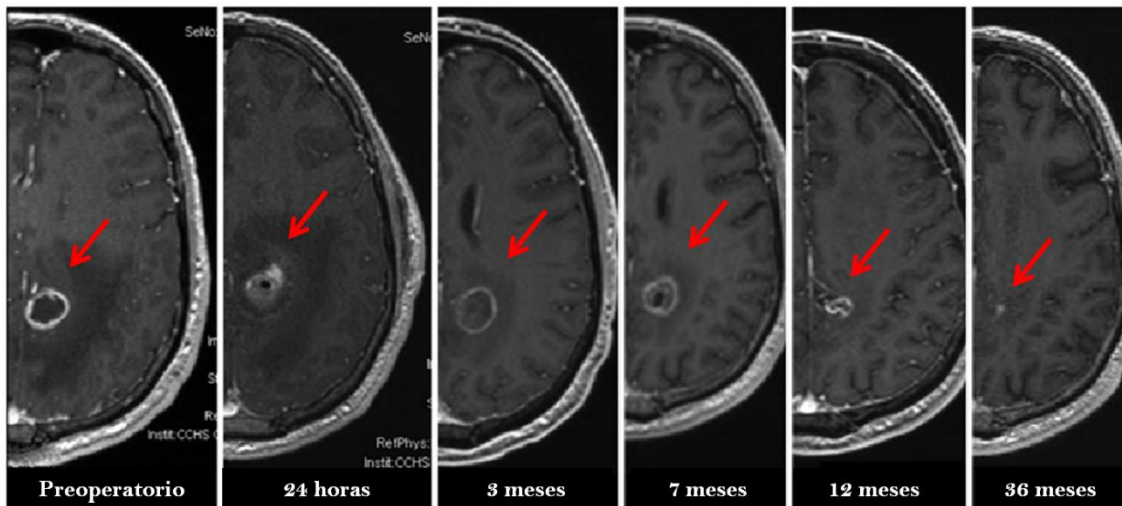


Figura A1-1. Imágenes de resonancia magnética de un paciente con glioblastoma multiforme⁵ tratado con terapia fototérmica intersticial. Imágenes preoperatorias, a las 24 horas del tratamiento y a los 3, 7, 12 y 36 meses posteriores. Se puede observar que la terapia redujo el tamaño del tumor. Imagen tomada y adaptada de [90].

Estos sistemas de ablación térmica consisten en una sonda milimétrica ($\varnothing < 3.3$ mm) basada en fibras ópticas, las cuales transportan la luz de láseres de alta potencia (12-15 W) hasta la zona de interés. Estas sondas ocupan difusores de fibra óptica u otras geometrías (ver figura A1-2) para modificar la forma de la luz láser que escapa de la fibra óptica y poder calentar el tejido de manera extendida. Las sondas también cuentan con sistemas de enfriamiento para evitar sobrecalentamiento del tejido (ver figura A1-2) y en el caso del sistema NeuroBlate® incluye un termopar (termómetro). Debido al minúsculo tamaño de estas sondas, la TFI puede llevarse a cabo por medio de la inserción de la sonda dentro de un catéter (~14 G) que se ajusta a un marco estereotáxico [88, 89]. El daño térmico del tejido depende de las condiciones de enfriamiento, potencia óptica del

⁴ Es la degradación necrótica del tejido cerebral después de radioterapia intracraneal. Ocurre en 5% de los pacientes y puede durar meses o hasta 2-3 años [31, 87].

⁵ Glioblastoma multiforme, es el glioma más maligno que hay y representan el 82% de éstos [7].

láser y el tiempo de exposición [29]. El tiempo de ablación puede variar desde unos segundos (90 s) hasta 10 minutos [87]. Ambos sistemas permiten determinar la zona de daño tisular en tiempo real por medio de líneas (líneas de umbral de daño térmico) desplegadas en sus softwares, calculadas a partir de una relación entre temperatura y tiempo (curva de Arrhenius) [29, 91]. El sistema Visualase® permite tomar mediciones de temperatura cada 10 segundos e identificar regiones calentadas entre 50 y 90 °C; la ablación láser termina cuando la zona de ablación abarca toda la lesión o cuando se excede la temperatura umbral [87]. La tabla A1-1 muestra algunas de las características más importantes de estos sistemas.

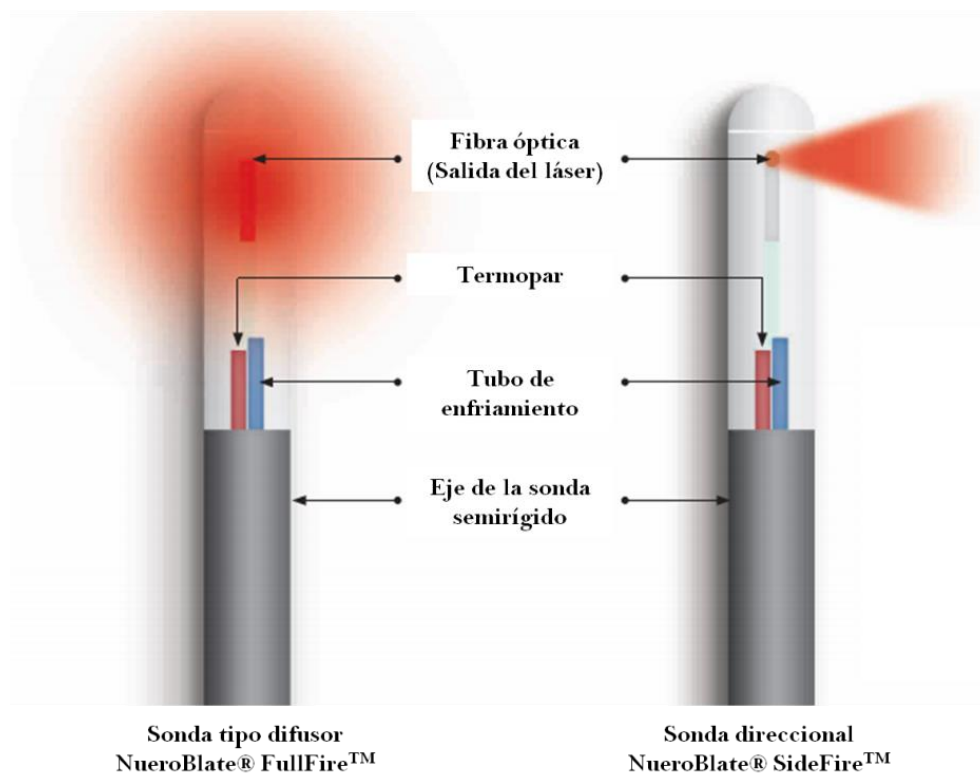


Figura A1-2. Diferentes sondas del sistema NeuroBlate® utilizadas para TFI. Las sondas están compuestas de una fibra óptica que transporta la luz láser, un sistema de enfriamiento (CO₂) y un termómetro encapsulados. Las sondas tienen un diámetro de 2.2 o 3.3 mm. Imagen tomada y adaptada de [89].

		Visualase	NeuroBlate
Sonda	Material	Sílice con cubierta polimérica	Sílice encapsulado en zafiro
	Diámetro (mm)	1.65	2.2 y 3.3
	Geometría	Difusor	Difusor y Lateral
	Geometría del área tratada	Esfera	Esfera y Cono
Láser	Potencia óptica máxima (W)	15	12
	Modo	Continuo	Pulsado
	λ (nm)	980	1064
Enfriamiento	Tipo	Líquido (solución salina)	Gaseoso (CO ₂)
	Duración	Minutos	Indefinido
Posicionamiento	Marco Estereotáxico	✓/ ✗	✓/ ✗
	Ajuste	Manual	Robótico
Software	Termometría MRI	✓	✓
	Contorno de daño térmico	✓	✓
Paro		Automático y Manual	Automático y Manual

Tabla A1-1. Características principales de los sistemas Visualase® y NeuroBlate®. Tabla modificada de [29] y [31]

Para realizar un procedimiento de TFI el paciente es sujetado a una cama y colocado dentro de un escáner de resonancia magnética. A continuación, un marco estereotáxico se coloca alrededor de la cabeza del paciente para sujetarla y alinearla. Luego, un cirujano realiza un trépano en el sitio de interés ($\varnothing \sim 3.2$ mm) y coloca una montura de anclaje por donde entrará la sonda láser. Un robot (o cirujano) inserta y posiciona la sonda en el lugar correcto dentro del cerebro con una precisión ≤ 1 mm y, posteriormente, se lleva a cabo la ablación láser. Seguido, el paciente es sacado del escáner de

resonancia magnética, y la sonda láser y el equipo complementario son retirados de éste. Finalmente, la herida es suturada con un sólo punto y el paciente puesto en observación hasta recuperarse de la intervención quirúrgica. El paciente es dado de alta dos o tres días después del procedimiento [31, 91, 152, 162]. Para mayor información sobre los procedimientos quirúrgicos se pueden ver los videos de las referencias [163] y [164]. La figura A1-3 muestra el sistema completo utilizado por Monteris Medical para realizar un procedimiento de TFI [89].

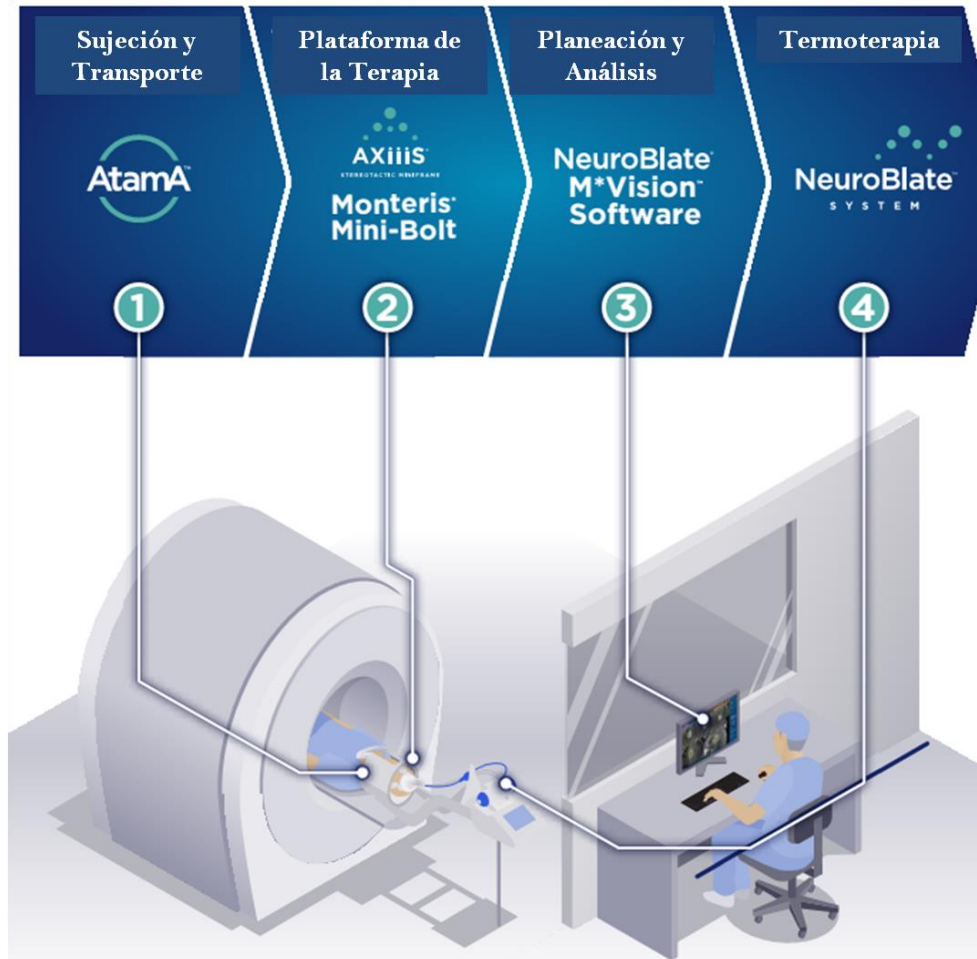


Figura A1-3. Sistema completo de Monteris Medical para realizar terapia fototérmica guiada mediante imagenología de resonancia magnética. Consiste de una cama compatible con un escáner de resonancia magnética (1), una plataforma de soporte para la alineación y guiado de la sonda (2), el software para cuantificar la temperatura y determinar la zona de daño (3) y la sonda NeuroBlate® (4). Imagen tomada y adaptada de [89].

La TFI tiene ventajas sobre la cirugía convencional (craneotomía) tales como ser un procedimiento mínimamente invasivo, un tiempo de procedimiento menor (>2 horas), una

citoreducción mayor para gliomas de alto grado o en áreas de elocuencia, minimizar las complicaciones quirúrgicas, un periodo hospitalario más corto (<3 días), una sobrevida mayor del paciente (3-4 meses) y ser un procedimiento más económico en el caso de pacientes de alto riesgo con gliomas de alto grado en áreas de elocuencia, alojados profundamente o en el caso de metástasis [29, 30, 87, 91, 92]. Otras ventajas de la TFI incluyen la pequeña o nula remoción del cabello en el paciente, un mínimo número de suturas para cerrar el lugar de la terapia (~1), reducción en el tiempo de curación, una cicatriz pequeña, reducción de la pérdida de sangre y dolor posoperatorio [29, 88-91]. Además, al utilizarse energía no ionizante (luz) la TFI puede repetirse in situ el número de veces que sea necesaria, no hay riesgos citotóxicos relacionados a radiación ionizantes (radioactividad), no se requiere protección por radiación durante el tratamiento (paciente y cirujano) y es compatible con quimioterapia y radioterapia [29, 88, 90, 91].

Las complicaciones durante este tipo de terapia son bajas y surgen por mal posicionamiento de la sonda debido a la falta de un marco estereotáxico o por mal uso de un dispositivo de posicionamiento de precisión, falla en el uso de la barra de alineación (montura de anclaje) y por múltiples ablaciones láser [31]. Ocasionalmente, se han observado complicaciones como hemorragias durante el procedimiento [91]; sin embargo, después de la terapia se ha notado que la presencia de edema en la zona tratada es común [87]. También se ha observado déficit neurológico temporal como efecto secundario de la TFI [87].

Una de las mayores limitantes de esta terapia es la incapacidad de tratar tumores grandes, de forma irregular o lesiones próximas a vasos sanguíneos [31]. Dependiendo del tipo de sonda, se tiene un radio efectivo de daño de 1-2 cm y la sonda se puede avanzar o retroceder para un tratamiento longitudinal de hasta 3 cm; para tumores de mayores a 3 cm o de forma irregular se requieren múltiples ablaciones [87, 152]. En el caso del sistema NeuroBlate® dañar un tumor de 2 cm toma poco menos de 2 min [89].

Un problema latente de este tipo de sistemas es que si falla en el sistema de enfriamiento de la sonda puede provocar sobrecalentamiento en el tejido [91]. Dependiendo de la potencia láser utilizada este sobrecalentamiento puede provocar la carbonización o incluso la vaporización del tejido, y la vaporización del tejido puede causar un aumento de la presión intracraneal [29]. Asimismo, este problema puede llevar al derretimiento o carbonización de la sonda láser afectando su desempeño [88]. El derretimiento de la sonda también puede provocar fugas en el mecanismo de enfriamiento, exacerbando el problema de sobrecalentamiento.

Apéndice 2

Termometría de fluorescencia inducida por láser

A2.1. Sistema TLIF de dos colores

En la técnica TLIF, la intensidad de fluorescencia no sólo depende de la temperatura de la muestra; sino también, depende de las fluctuaciones intrínsecas de la fuente de luz de excitación (láser verde)¹, es decir, a mayor potencia de la luz de excitación mayor será la intensidad de fluorescencia de la muestra. En general, este problema se soluciona usando un segundo tinte fluorescente que es insensible a la temperatura [139, 142]. Entonces, el primer tinte fluorescente (dependiente de la temperatura, en este caso rodamina B) mide la temperatura de la muestra mientras que el segundo tinte (independiente de la temperatura) monitorea las variaciones de intensidad de la fuente de excitación.

En este trabajo se propuso sustituir el segundo tinte (insensible a temperatura) y monitorear la estabilidad a través de un detector (fotodetector). El divisor de haz del arreglo experimental, ver figura 22, divide en dos el láser. Uno de estos caminos llega directamente al fotodetector el cual mide constantemente la potencia del láser verde. Utilizando el fotodetector evitamos utilizar un segundo tinte, una segunda cámara para registrar la fluorescencia de éste y los respectivos filtros necesarios, simplificando el arreglo experimental.

Durante el análisis de la intensidad de fluorescencia de la membrana de PDMS-rB se obtiene una razón dividiendo la intensidad de fluorescencia entre la potencia láser, ver ecuación 1. De este modo se consideran las fluctuaciones del láser en cada medición.

¹ Por esta razón se utiliza un láser verde de alta estabilidad.

A2.2. Instrumentación sistema TLIF

El sistema TLIF requiere instrumentación para que el equipo electrónico pueda ser controlado desde la computadora mediante una interfaz (programa de computadora). La figura A2-1 muestra la instrumentación necesaria para el control y medición de los parámetros necesarios.

La interfaz permitió controlar el voltaje suministrado al calentador resistivo, obtener el valor de la temperatura del sistema de control térmico, tomar las fotografías de la fluorescencia de la muestra y obtener el valor de la potencia del láser verde.

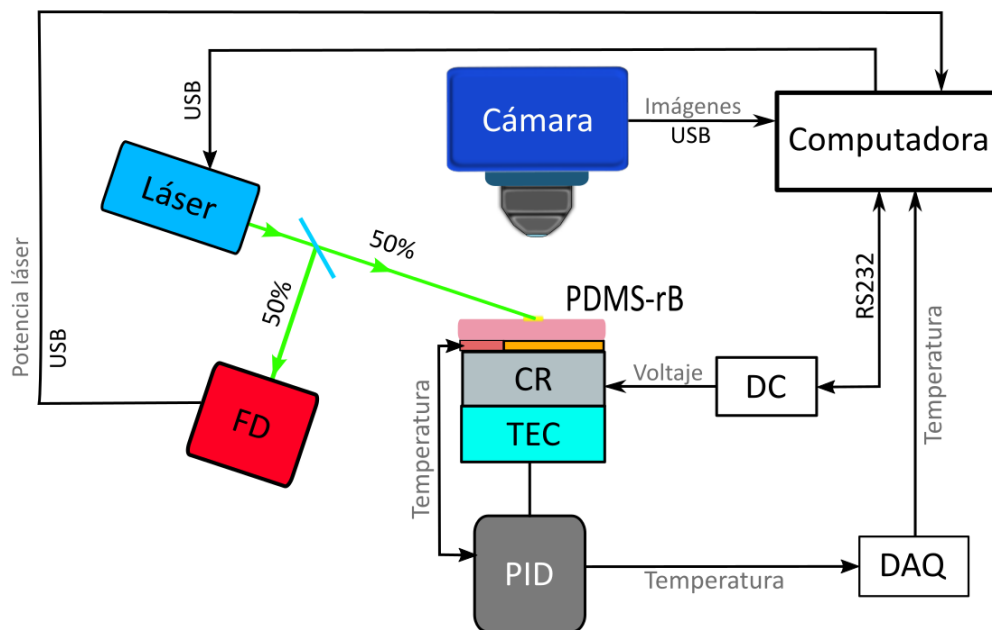


Figura A2-1. Instrumentación requerida para el arreglo de termometría fluorescente inducida por láser. Abreviaciones: FD: fotodetector, TEC: enfriador termoeléctrico, CR: calentador resistivo, DC: fuente de voltaje, DAQ: tarjeta de adquisición de datos

En cada medición, la interfaz guarda los datos de la potencia óptica del láser verde, registra la temperatura de la membrana de PDMS-rB y toma una fotografía de la fluorescencia de la muestra. Al final del experimento, ya sea para obtener la curva de calibración de la membrana o para la curva característica de un μ FO, el programa entrega los archivos de datos con las imágenes y una tabla de datos con las temperaturas², potencias láser y además un valor de la intensidad de fluorescencia³. Después estos

² Este valor no se considera en el análisis, sólo sirve para obtener la curva de calibración. En el caso de un μ FO este dato sólo es relevante para la imagen de referencia.

³ Entrega un valor de intensidad den escala de grises (0-255).

datos son analizados e interpretados en un programa posprocesamiento descrito en la siguiente sección.

A2.3. Análisis de mapas de temperatura

Para obtener los mapas de temperatura primero se obtiene una imagen de la fluorescencia promedio (10 fotografías) de la muestra a una temperatura conocida (25 °C). A continuación, se calcula la razón en cada pixel entre la intensidad de fluorescencia de esta imagen y la potencia láser (láser verde); entonces, se tiene una nueva imagen, a la que se le denomina *imagen T de referencia*. Luego, se calcula la imagen de la fluorescencia promedio (10 fotografías) a una temperatura desconocida y se calcula la razón entre la intensidad de fluorescencia de esta imagen y la potencia láser pixel a pixel; a la nueva imagen se le llama *imagen T desconocida*. Finalmente, se normaliza la *imagen T desconocida* con respecto a *imagen T de referencia* pixel por pixel y la nueva imagen se convierte en el mapa de temperaturas por medio de la ecuación obtenida de la calibración de la membrana, ver figura A2-2.

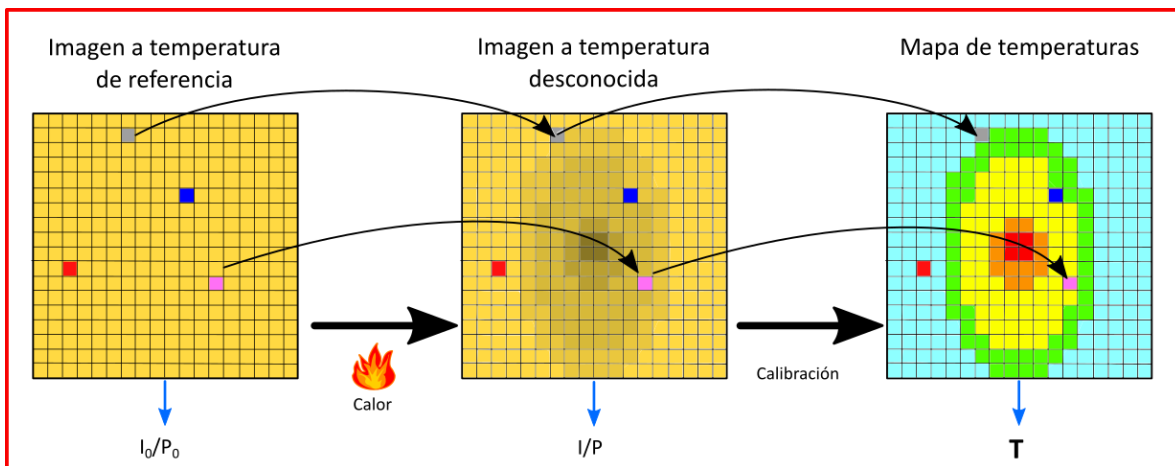


Figura A2-2. Esquema simplificado del análisis hecho para obtener el mapa de temperatura a partir de la información entregada por el sistema TLIF. Al calentar la muestra a una temperatura desconocida se obtiene una nueva fotografía con una intensidad de fluorescencia menor. A través de una regla de normalización y la curva de calibración de la membrana se obtiene la temperatura en cada pixel de la imagen.

La imagen A2-3 muestra un esquema del algoritmo utilizado para calcular los mapas de temperatura a partir de los datos arrojado por la interfaz del sistema TLIF, es decir, las fotografías y el archivo de datos. El programa desarrollado permite escoger un área de interés donde se mide la temperatura promedio de esta región y usa este valor para obtener la curva característica de un μFO .

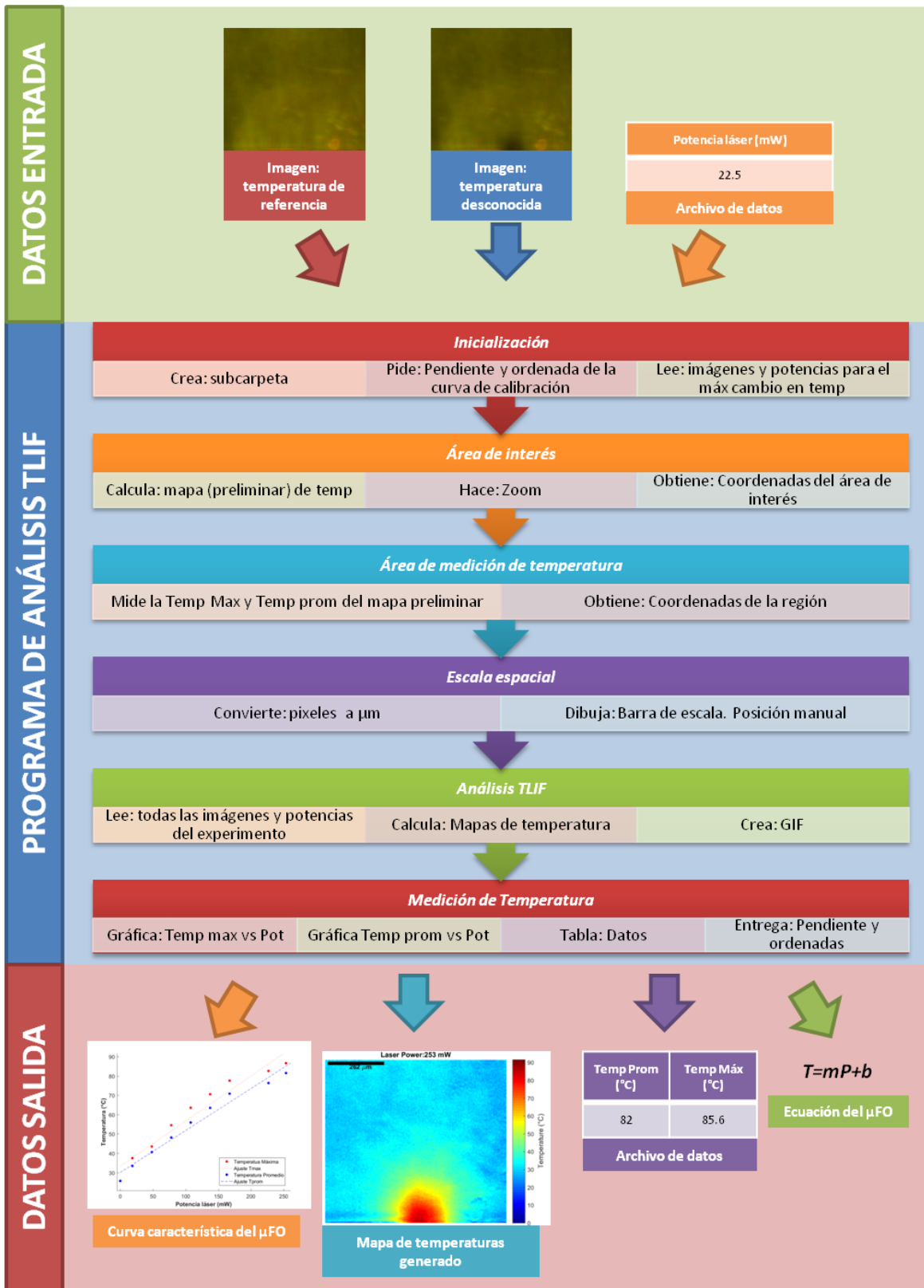


Figura A2-3. Algoritmo utilizado para calcular los mapas de temperatura y la curva característica de un μFO .

A2.3. Estabilidad de las membranas de PDMS-rB

Un aspecto importante que hay que estudiar de las membranas es si éstas pierden su fluorescencia por fenómenos como el fotoblanqueamiento o el fotoapagamiento⁴. Estos fenómenos no son deseados en la técnica TLIF ya que se produce un cambio irreversible en la emisión del tinte, causando una lectura falsa. Por este motivo, primeramente, estudiamos el comportamiento de las membranas para exposiciones prolongadas del láser o por periodos largos de calentamiento.

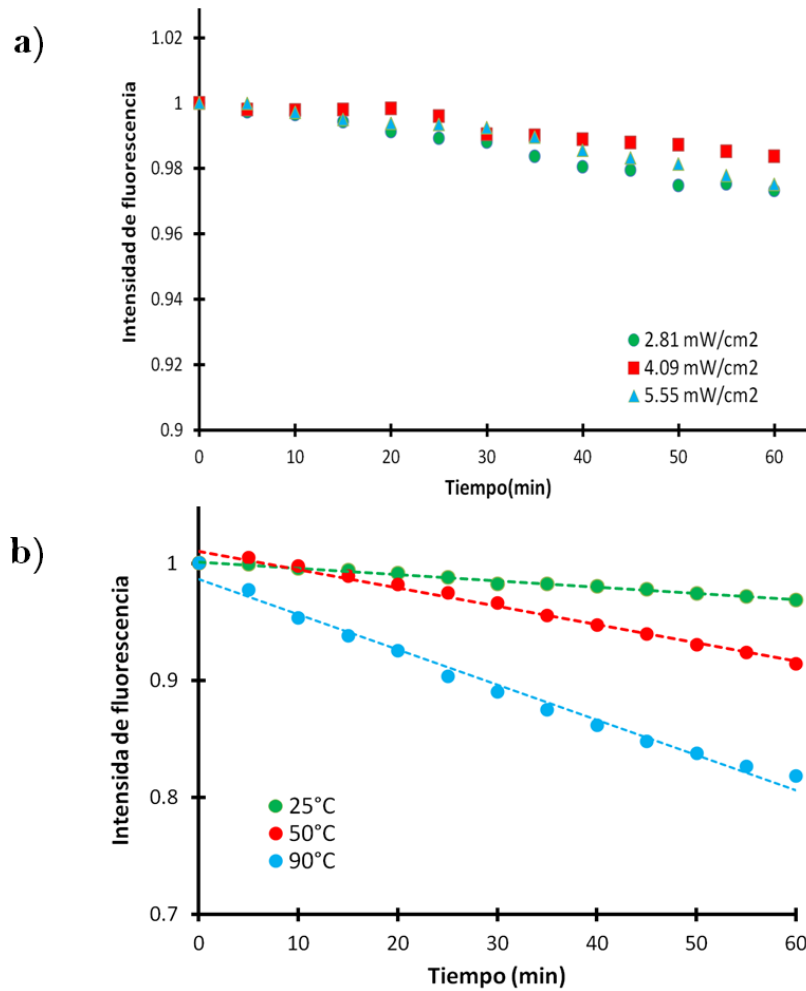


Figura A2-4. Estabilidad de las membranas de PDMS-rB. No se observó degradación del tinte con la potencia láser de excitación utilizada (a). Para temperaturas altas se notó que existe una degradación lenta del tinte para un periodo de tiempo prolongado (b).

⁴ Proceso por el cual un tinte pierde su capacidad de emitir fluorescencia debido a que se degrada por una larga exposición a temperaturas elevadas. En este caso, el tinte se calienta por un tiempo grande y cuando regresa a temperatura ambiente su fluorescencia es menor comparada con su fluorescencia inicial.

Primeramente, se fijó la potencia láser (láser verde) en 2.81 mW/cm^2 y se midió la fluorescencia de la membrana cada 10 minutos durante una hora. El experimento se repitió incrementando la potencia del láser a 4.09 y 5.55 mW/cm^2 . Por otro lado, se estudió la estabilidad térmica de las membranas; en este caso se fijó la potencia láser y se monitoreo el cambio de la fluorescencia por una hora para diferentes temperaturas (25 , 50 y $90 \text{ }^\circ\text{C}$). La figura A2-4 muestra los resultados obtenidos para ambos experimentos.

En la figura se puede apreciar para el caso de la potencia láser, la fluorescencia decae muy poco durante el periodo de tiempo seleccionado. Por lo tanto, es seguro utilizar estos valores de potencia láser durante nuestras mediciones para la calibración de la membrana. Además, la membrana sólo fue irradiada por un tiempo muy corto (1 minuto) en cada medición. Debido a esto, fue posible despreocuparse de los problemas por fotoblanqueamiento.

En el caso de la estabilidad térmica se puede observar que para una temperatura “grande” el decaimiento de la fluorescencia de la muestra es mayor durante el periodo de tiempo. Esto sugiere una degradación lenta del tinte. Con el objetivo de minimizar este efecto, durante los experimentos de la curva de calibración el tiempo esperado entre incrementos de temperatura fue de 10 minutos.

Anexo 1: Artículo de investigación de requisito

Photothermal lesions in soft tissue induced by optical fiber microheaters

Reinher Pimentel-Domínguez,^{1,2,*} Paola Moreno-Álvarez,³ Mathieu Hautefeuille,⁴ Anahí Chavarría,⁵ and Juan Hernández-Cordero¹

¹Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán D.F. 04510, Mexico

²Posgrado de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán D.F. 04510, Mexico

³Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán D.F. 04510, Mexico

⁴Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán D.F. 04510, Mexico

⁵Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán D.F. 04510, Mexico

*postdata.reinher@gmail.com

Abstract: Photothermal therapy has shown to be a promising technique for local treatment of tumors. However, the main challenge for this technique is the availability of localized heat sources to minimize thermal damage in the surrounding healthy tissue. In this work, we demonstrate the use of optical fiber microheaters for inducing thermal lesions in soft tissue. The proposed devices incorporate carbon nanotubes or gold nanolayers on the tips of optical fibers for enhanced photothermal effects and heating of *ex vivo* biological tissues. We report preliminary results of small size photothermal lesions induced on mice liver tissues. The morphology of the resulting lesions shows that optical fiber microheaters may render useful for delivering highly localized heat for photothermal therapy.

©2016 Optical Society of America

OCIS codes: (060.2310) Fiber optics; (230.2285) Fiber devices and optical amplifiers; (160.4236) Nanomaterials; (310.6845) Thin film devices and applications; (350.5340) Photothermal effects; (170.1020) Ablation of tissue.

References and links

1. B. Hildebrandt, P. Wust, O. Ahlers, A. Dieing, G. Sreenivasa, T. Kerner, R. Felix, and H. Riess, "The cellular and molecular basis of hyperthermia," *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **43**(1), 33–56 (2002).
2. K. Ahmed and S. F. Zaidi, "Treating cancer with heat: hyperthermia as promising strategy to enhance apoptosis," *J. Pak. Med. Assoc.* **63**(4), 504–508 (2013).
3. J. R. Melamed, R. S. Edelstein, and E. S. Day, "Elucidating the Fundamental Mechanisms of Cell Death Triggered by Photothermal Therapy," *ACS Nano* **9**(1), 6–11 (2015).
4. M. Nikfarjam, V. Muralidharan, and C. Christophi, "Mechanisms of Focal Heat Destruction of Liver Tumors," *J. Surg. Res.* **127**(2), 208–223 (2005).
5. E. van Sonnenberg, W. N. McMullen, and L. Solbiati, *Tumor Ablation: Principles and Practice* (Springer, 2005).
6. T. J. Vogl, K. Eichler, R. Straub, K. Engelmann, S. Zangos, D. Woitasek, M. Böttger, and M. G. Mack, "Laser-induced thermotherapy of malignant liver tumors: general principals, equipment(s), procedure(s)-side effects, complications and results," *Eur. J. Ultrasound* **13**(2), 117–127 (2001).
7. M. Nikfarjam, C. Malcontenti-Wilson, and C. Christophi, "Focal Hyperthermia Produces Progressive Tumor Necrosis Independent of the Initial Thermal Effects," *J. Gastrointest. Surg.* **9**(3), 410–417 (2005).
8. T. Menovsky, J. F. Beek, M. J. van Gemert, F. X. Roux, and S. G. Bown, "Interstitial Laser Thermotherapy in Neurosurgery: A Review," *Acta Neurochir. (Wien)* **138**(9), 1019–1026 (1996).
9. P. C. Schulze, H. E. Vitzthum, A. Goldammer, J. P. Schneider, and R. Schober, "Laser-induced thermotherapy of neoplastic lesions in the brain-underlying tissue alterations, MRI-monitoring and clinical applicability," *Acta Neurochir. (Wien)* **146**(8), 803–812 (2004).
10. T. G. van Leeuwen, J. H. Meertens, E. Velema, M. J. Post, and C. Borst, "Intraluminal Vapor Bubble Induced by Excimer Laser Pulse Causes Microsecond Arterial Dilatation and Invagination Leading to Extensive Wall Damage in the Rabbit," *Circulation* **87**(4), 1258–1263 (1993).

#255039

Received 2 Dec 2015; revised 22 Feb 2016; accepted 23 Feb 2016; published 3 Mar 2016

© 2016 OSA 1 Apr 2016 | Vol. 7, No. 4 | DOI:10.1364/BOE.7.001138 | BIOMEDICAL OPTICS EXPRESS 1138

11. S. Peeters, M. Kitz, S. Preisser, A. Wetterwald, B. Rothen-Rutishauser, G. N. Thalmann, C. Brandenberger, A. Bailey, and M. Frenz, "Mechanisms of nanoparticle-mediated photomechanical cell damage," *Biomed. Opt. Express* **3**(3), 435–446 (2012).
12. L. Cheng, C. Wang, L. Feng, K. Yang, and Z. Liu, "Functional Nanomaterials for Phototherapies of Cancer," *Chem. Rev.* **114**(21), 10869–10939 (2014).
13. D. Jaque, L. Martínez Maestro, B. del Rosal, P. Haro-Gonzalez, A. Benayas, J. L. Plaza, E. Martín Rodríguez, and J. García Solé, "Nanoparticles for photothermal therapies," *Nanoscale* **6**(16), 9494–9530 (2014).
14. R. Singh and S. V. Torti, "Carbon nanotubes in hyperthermia therapy," *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**(15), 2045–2060 (2013).
15. C. Iancu and L. Mocan, "Advances in cancer therapy through the use of carbon nanotube-mediated targeted hyperthermia," *Int. J. Nanomedicine* **6**, 1675–1684 (2011).
16. X. Huang, P. K. Jain, I. H. El-Sayed, and M. A. El-Sayed, "Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles," *Lasers Med. Sci.* **23**(3), 217–228 (2008).
17. L. C. Kennedy, L. R. Bickford, N. A. Lewinski, A. J. Coughlin, Y. Hu, E. S. Day, J. L. West, and R. A. Drezek, "A New Era for Cancer Treatment: Gold-Nanoparticle-Mediated Thermal Therapies," *Small* **7**(2), 169–183 (2011).
18. A. Elsaesser and C. V. Howard, "Toxicology of nanoparticles," *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**(2), 129–137 (2012).
19. P. V. Devarajan and S. Jain, *Targeted Drug Delivery: Concepts and Design* (Springer International Publishing, 2015), Chap 23.
20. R. Pimentel-Domínguez, J. Hernández-Cordero, and R. Zenit, "Microbubble generation using fiber optic tips coated with nanoparticles," *Opt. Express* **20**(8), 8732–8740 (2012).
21. H. T. Kim, H. Bae, Z. Zhang, A. Kusimo, and M. Yu, "Optofluidic microvalve-on-a-chip with a surface plasmon-enhanced fiber optic microheater," *Biomicrofluidics* **8**(5), 054126 (2014).
22. P. Janda, R. Sroka, B. Mundweil, C. S. Betz, R. Baumgartner, and A. Leunig, "Comparison of Thermal Tissue Effects Induced by Contact Application of Fiber Guided Laser Systems," *Lasers Surg. Med.* **33**(2), 93–101 (2003).
23. J. T. Robinson, K. Welsher, S. M. Tabakman, S. P. Sherlock, H. Wang, R. Luong, and H. Dai, "High performance in vivo near-IR (>1 μm) imaging and photothermal cancer therapy with carbon nanotubes," *Nano Res.* **3**(11), 779–793 (2010).

1. Introduction

In recent years, the use of therapeutic heat has become a promising means to treat malignant tissues. Experimental evidence demonstrates that thermal therapy by increasing temperature above normal body temperature has different biological consequences such as protein denaturation, irreversible damage to subcellular structures, blood coagulation, inducing apoptotic signaling pathways or tissue charring [1–4]. All these effects cause the death of cancer cells or destruction of malignant tissue.

Different devices have been developed for heating locally malignant tissue; these include radiofrequency generators, microwave antennas and highly focused ultrasound probes [5]. However, the use of light to heat biological tissue offers certain advantages over these devices such as a precise space-control, or the possibility to provide in situ administration of light through optical fibers. Furthermore, some wavelengths of light allow for penetration depths reaching deep tissues (mm-cm), providing attractive capabilities for non-invasive or minimally invasive therapy. Photothermal therapy, i.e., thermal therapy with light, allows for the selective destruction of cancer cells achieving the reduction or complete destruction of the tumor, minimizing the damage in the surroundings of the malignant tissue [6].

Several studies have explored the effects of photothermal therapy in different tumor models, both in animals and humans. As an example, laser light has been used to reduce and destroy liver cancer in mice [7]. Also, photothermal therapy with lasers has been reported in the destruction of a human malignant liver tumor, achieving complete necrosis of the targeted tissue in 95% of cases, with collateral damage of 5mm in healthy tissue [6]. Light has also been used in treatments for different types of brain tumors by interstitial photothermal therapy using optical fibers [8, 9]. The main limitation of this therapy is the availability of appropriate wavelengths (e.g., infrared light) to generate the desired photothermal effects in different tumors avoiding damage in the surrounding healthy tissues. Moreover, the low absorption of some tissues requires using high power lasers (several Watts of optical power) and/or prolonged therapy time (> 10 minutes) [6,8]. Large doses of energy can also cause unwanted effects such as tissue breakdown or cell death due to cavitation effects that may occur during

laser light delivery [10, 11]. Hence, new tools to provide more effective means for photothermal therapy are required.

Nanotechnology has allowed for the fabrication of nanoparticles with high efficiency for converting light into heat. This attractive feature offers new possibilities for developing highly efficient nanoheaters capable of heating smaller and highly delimited spatial regions. Numerous studies have demonstrated the effectiveness of photothermal therapy with different types of nanoparticles [12,13]; in particular, carbon nanotubes and gold nanoparticles showing enhanced photothermal effect have yielded very promising results [14–17]. However, in all of these studies the nanoparticles had to be incorporated into the tumor by systemic or intratumoral injections [14,17]. Furthermore, the biotoxicity of nanoparticles remains a controversial topic [18,19]; their biodistribution in the body of the patient and their final destination are still under scrutiny and nanoparticle tracking is always required after therapy.

In this work, we present the fabrication and characterization of optical fiber microheaters (OFMH) potentially useful for delivering highly localized heat for photothermal therapy. The proposed devices incorporate carbon nanoparticles or gold nanostructures on the tips of conventional optical fibers to enhance photothermal effects in *ex vivo* biological tissues. Upon combining these nanostructures with the laser light guided by the optical fiber, we expect to obtain improved heat generation owing to the enhanced optical absorption of these nanomaterials. We report promising preliminary results in mice liver tissue, obtaining small-sized photothermal lesions when exposed to the OFMH at different optical powers. Since the tissue minimally absorbs the light used with these devices, local heating of the nanoparticles yields little or no damage to the surrounding healthy tissue, with potential applications in selective cancer cells destruction.

Based on standard fiber optic technology, the proposed OFMHs offer an interesting alternative to other techniques involving nanoparticles for photothermal therapy. In particular, confinement of the nanoparticles within the tip of the fiber requires low optical power to generate adequate heat in highly localized areas. Furthermore, nanoparticle confinement avoids the need for injecting them into the body, thereby reducing potential problems associated with nanostructure toxicity. The aim of these devices is at implementing a technique offering a more controlled and less aggressive solution to induce small-sized, highly localized lesions, hence minimizing collateral damage in biological tissues.

2. Materials and methods

2.1. Fabrication of optical fiber microheaters

We present two types of OFMHs based on nanostructures with high optical absorption. The first type is fabricated with carbon nanotubes and the second one uses gold nanolayers. Both were chosen due to their enhanced photothermal effects; furthermore, they have also been used for photothermal therapy [14–17]. The nanostructures are incorporated onto standard single-mode optical fibers; the light launched into the optical fiber is absorbed at the output end by the nanostructures and heat is generated and dissipated in the vicinity of the tip. Similar OFMHs have been previously used to heat liquids up to their evaporation point [20,21]. An attractive feature of these microheaters is their ease of fabrication with the use of off the shelf elements. Hence, we show comparative results for two types of OFMH when used as highly-localized heat sources for inducing lesions in tissue.

2.1.1. Optical fiber microheaters with carbon nanotubes (OFMH-CNT)

This microheater uses a thin layer of carbon nanotubes to generate the required photothermal effects. For these experiments, we used multiwalled carbon nanotubes (CNTs) (Sigma-Aldrich, 724769) due to their ability to generate heat through light absorption [14,20]. We used a standard single-mode optical fiber (SMF-28e, NA 0.11, 8 micron core) serving as the laser waveguide and as the deposition target. The optical fiber is cleaned and cleaved to

obtain a flat end-face. CNTs are subsequently deposited onto the optical fiber end face using an optically driven deposition technique [20]. This is achieved using a CW fiber-coupled laser diode (Thorlabs, 975nm) as the light source, with an output power of 137mW and a deposition time of 240s to guarantee an adequate layer. Finally, the optical fiber end face with the CNTs is coated with a thin gold layer (~10nm) deposited by sputtering (Cressington Sputter Coater, 108auto) using a 0.1mbar chamber pressure and a current of 40mA; Fig. 1(A) schematically depicts the fabrication process for this microheater.

2.1.2. Optical fiber microheaters with gold nanolayers (OFMH-Au)

This type of microheater incorporates a layer of gold nanostructures onto the optical fiber end face. The fabrication procedure is simpler than the previous one since after cleaning and cleaving, the optical fiber is simply coated by sputtering with a non-homogeneous thin gold layer (~10nm). This procedure is schematically shown in Fig. 1(B).

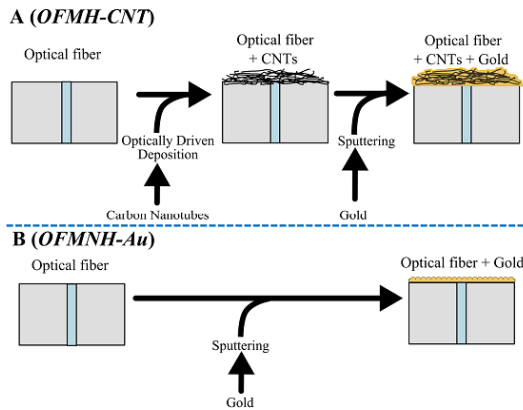


Fig. 1. Schematic of the fabrication process of the OFMH. The illustrations show the procedure followed for coating the optical fibers end faces with different nanostructures: (A) carbon nanotubes with a gold layer, and (B) gold nanolayers created by sputtering.

2.2. Evaluation of photothermal effects

Several experiments were performed to test the potential impact of the proposed microheaters. The microheaters were used to provoke light-induced localized lesions at the surface of livers extracted from laboratory mice to demonstrate the proof of concept of this technique.

Five male mice of a CD1 strain, aged 8-10 weeks and weighing from 30 to 35g were used for these experiments. The mice were sacrificed by cervical dislocation and their livers were subsequently removed from the peritoneal cavity. The hepatic lobes were sliced and placed in a Petri dish with a phosphate buffered saline solution (PBS). The samples were kept at 4°C with ice during the experiments. Animal handling was carried out according to the guidelines of the Ethics Committee of the School of Medicine of the UNAM.

The OFMH was placed directly on the liver surface to induce localized thermal lesions. A zirconia ferrule for optical fibers was used to fix the OFMH to a linear translational stage intended to draw near the device to the liver surface (see Fig. 2). The opposite ends of the OFMH were connected to a CW fiber-coupled laser diode (Thorlabs, 975nm), which was turned on for a prescribed time for each test and then turned off. Finally, the OFMH was removed from the liver, and the samples were inspected either by optical microscopy

(DinoLite, AM7115MZT) or scanning electron microscopy (SEM). The size and other features of the lesions were subsequently measured using ImageJ software. Both types of OFMHs were tested for various laser diode powers (70-270mW) and for different irradiation times (10-240s). Table 1 summarizes the experimental conditions used for the tests performed in our experiments.

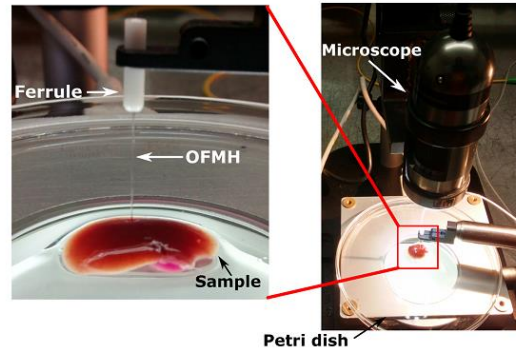


Fig. 2. Experimental setup for generating photothermal lesions in mouse liver with the OFMH.

Table 1. Experimental parameters used to obtain photothermal lesions

Mouse number	Device	Laser Power (mW)	Irradiation Time (s)
1	OFMH-CNT	70-270	10
		70-270	60
		165.5	10-240
3	OFMH-Au	70-270	10
		70-270	60
		165.5	10-240
5	Optical fiber (pristine)	70-270 269	60 10-240

2.3. Biological analysis

After performing several photothermal lesions on the hepatic surface at different power levels and irradiation times, we assessed the damage to the tissue by histological analysis. Surface observations by electron microscopy were also carried out.

2.3.1. Histological assessment

For histological analysis, liver injured immediately following the application of the photothermal lesion was isolated and fixed in 4% (w/v) formaldehyde and 30% sucrose. Afterwards, the liver was sectioned in 5 μ m thick samples using a cryostat (Leica, CM1860 UV) and the samples were mounted onto glass slides. The tissue slides were stained with hematoxylin and eosin (H&E).

2.3.2. Scanning electron microscopy

The surface of the lesions was also observed with SEM. The samples were fixed in 0.5% glutaraldehyde in PBS buffer for 6 h and subsequently dehydrated in a series of ethanol concentrations (30-100%). Afterwards, the samples were dried in a desiccator for 4 h. Finally, the liver slices were observed with a SEM (JEOL, 7600) and digital images were captured at various magnifications for inspection.

3. Results

Figure 3 shows an example of a typical OFMH. The microheaters are very small compared to other devices used for thermal therapies such as radiofrequency or microwave probes. The proposed devices have a diameter of 125 μm , close to the human hair diameter (70-100 μm). Previous work has reported the possibility to coat thoroughly the fiber tips with CNTs [20]. For these experiments, sputtering was also employed to deposit a final coating on the tips with thin gold nanolayers. Sputtering is a simple technique, with controlled conditions hence providing repeatable results. Gold coating provides a more biocompatible interface and further improves the adhesion of the CNTs to the optical fiber. Gold is also a good heat conductor.

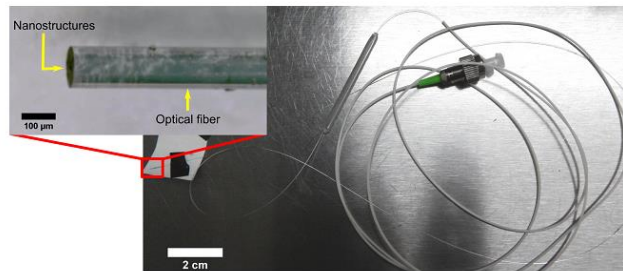


Fig. 3. Images of typical OFMH; the diameter of the microheater is 125 μm .

Figure 4 shows the SEM micrographs of two types of fabricated OFMHs; for comparison, an optical fiber without nanostructures is also included in the figure. The first row shows a comparison of the surfaces obtained with the different coatings and a pristine optical fiber. The red circles in the micrographs identify the area of the optical fibers, and the green circles define the location of the optical fiber core. In the second row, we present a magnification of the surface of the OFMHs.

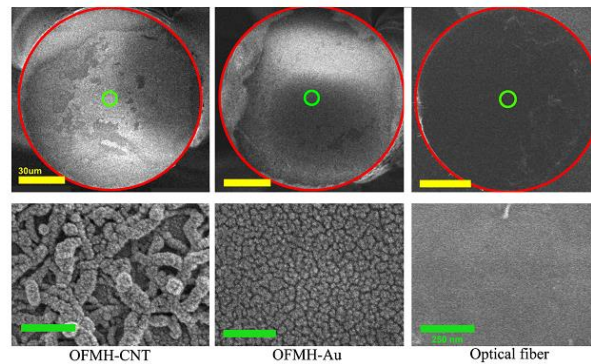


Fig. 4. Micrographs of the surface of the OFMH-CNT and OFMH-Au, compared to a pristine optical fiber.

The qualitative effectiveness of the microheaters was measured as a function of the diameter of the lesions obtained in the liver tissues after photothermal exposure. In particular, the influence of the laser parameters (power density and exposure time) on the resulting lesion diameter was observed. Figure 5 shows an optical microscopy image with typical examples of the lesions obtained in a mouse liver with an OFMH-CNT for different optical powers while maintaining a constant exposure time (10s). The resulting lesions are circular and a strong dependency of the lesion diameter with the laser power and exposure time was observed. Similar results were obtained using the OFMH-Au tip and pristine fiber. Under some exposure conditions we were able to observe highly localized tissue carbonization (see inset in Fig. 5).

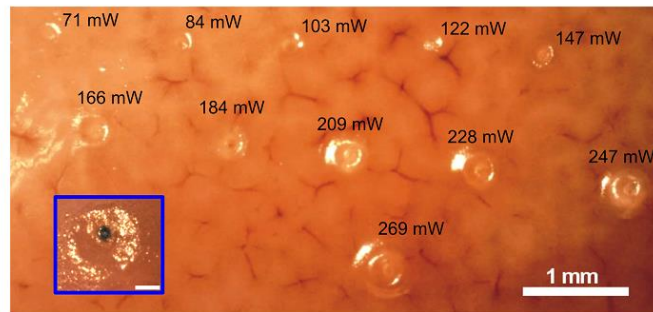


Fig. 5. Lesions induced in mouse liver by an OFMH-CNT. The exposure time was 10s. Inset: carbonization obtained with 166mW and 30s for an OFMH-CNT (scale bar: 100 μ m).

The resulting lesions diameters obtained on liver tissue are plotted in Fig. 6. These were obtained for both types of microheaters, using different power levels and exposure times as well as for different coating materials (see Table 1). The characteristic dimension chosen to evaluate the performance of the microheaters was the outer circle of the lesion, and this was measured using image-processing software for all the micrographs captured after treatment. As shown in the figure, the resulting experimental data for the lesion diameter as a function of laser power fits to a linear curve; in contrast, data for the lesion diameter a function of exposure time was fitted is to a logarithmic curve.

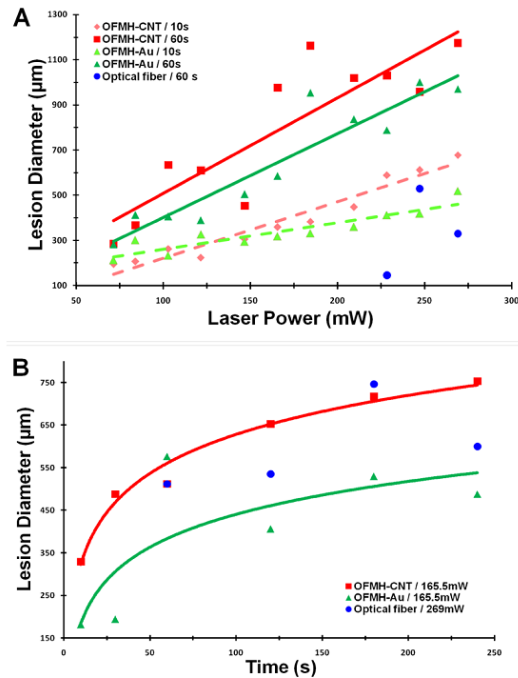


Fig. 6. Size of mouse liver lesion induced with the OFMH as a function of: (a) the optical power, and (b) exposure time. The curves corresponding to OFMH-CNT are shown in red color, the curves for OFMH-Au are shown in green, blue dots corresponds to the lesions induced with pristine optical fiber. The R^2 values for the linear fit of (a, solid lines) are 0.943 (OFMH-CNT/10s), 0.762 (OFMH-CNT/60s), 0.834 (OFMH-Au/10s) and 0.868 (OFMH-Au/60s). For (b, solid lines), the resulting fitting is logarithmic with with R^2 values of 0.977 (OFMH-CNT/165 mW) and 0.834 (OFMH-Au/165 mW).

Figure 7 shows typical SEM pictures of the central region of the lesions obtained with the two types of microheaters and a pristine fiber. In the micrographs, the differences between the lesions induced with both OFMHs are evident. Further comparison of these effects can be made with Fig. 8, showing a representative image of histological sample.

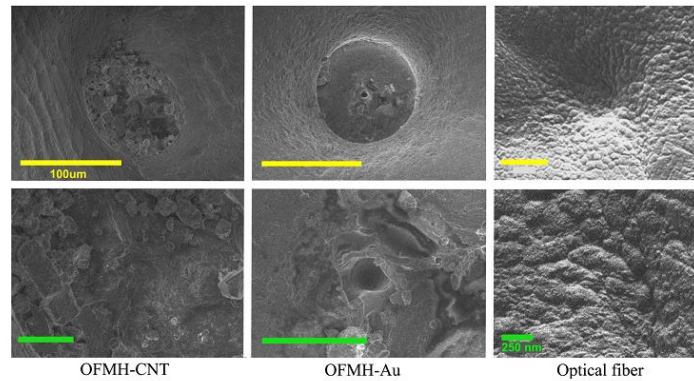


Fig. 7. SEM micrographs of lesions caused by OFMH-CNT (184mW and 60s), OFMH-Au (146mW and 60s) and a pristine optical fiber (269mW and 240s).

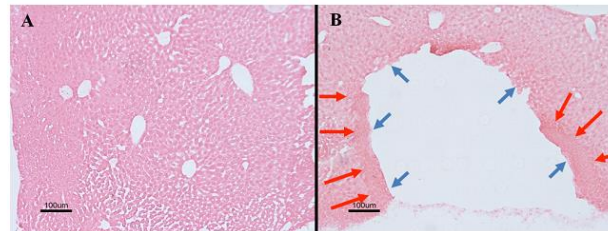


Fig. 8. A representative image of histological lesion induced by a microheater in mouse liver. A) Effect of the physical placement microheater without light, showing liver tissue integrity. B) Photothermal effects on the tissue induced by the microheater: normal histology of the liver tissue is interrupted by a lesion (the blue arrows point to the inner edge of the lesion) and a necrotic border is also observed (red arrows delimited the necrotic border). The lesion was induced with OFMH-CNT (269mW and 30s).

4. Discussion

It is clear from the micrographs (Fig. 4) that the presence of CNTs greatly influences the geometry, dimensions and density of the superficial nanostructures coating the tip of the fiber. This plays an important role in the absorption process of the infrared light guided and exiting the fiber; as discussed elsewhere [20], this feature has an impact on the heat generated at the tissue-fiber interface. Gold nanolayers may be deposited by sputtering on the tip of the fibers either with or without CNTs. We found experimentally that gold adheres well to both, the surface of the fiber tip and the deposited CNTs layer when deposited by sputtering. Furthermore, we also noticed that the gold layers would not easily stick to the biological tissue after treatment. This is an attractive and desired feature to avoid potential contamination by cell uptake. Finally, we observed the formation of gold nanolayers in the OFMH-Au tips.

Figure 5 shows a typical example of the lesions. It is also interesting to note that several concentric circles were obtained inside the lesions. While the inner circle corresponds to the diameter of OFMH (see Fig. 7), the two outer circumferences correspond to a ring of a crater

that is formed around the lesion (damage zone). Analogous concentric features are commonly observed in tissue ablation experiments, using high power lasers, with short pulses and long exposure times. Typically, the ablation zone is located at the center of the lesion, and this is surrounded by a coagulation and a carbonization zone at the limit of the ablated tissue [7, 22]. Notice also that there is no apparent extension of the lesion outside the region delimited by the diameter of the fiber: the lesion extends up to a millimeter around the OFMH (see Figs. 5 and 6).

Clearly, the observed effects arise from a temperature gradient generated by the OFMH. As seen in the plots, for both types of OFMHs the diameter of the induced lesions is proportional to the optical power launched into the optical fiber. Thus, the photothermal process that takes place at the fiber tip (i.e., within the layers of nanostructures) involving light absorption and scattering, along with heat generation and dissipation, seems to sustain a linear relation with the optical power. Concerning the size of the induced lesions, a higher optical power results in a larger diameter lesion, and a larger amount of heat leads to higher temperatures thereby producing greater tissue damage (see Fig. 6(a)).

Regarding the exposure time, Fig. 6(b) shows that the dimension of the lesion increases as well with this parameter for all the coatings used in the microheaters. Longer exposure times favors heat diffusion and dissipation within the tissue thus leading to extended damage. Although this feature is observed for both types of devices, the OFMH-CNT and the OFMH-Au, the resulting lesion diameters differ slightly owing to the differences in the photothermal characteristics of the materials. The OFMH-CNT produces lesions with larger diameters, which means that more heat is generated by these fiber tips owing to the higher photothermal efficiency of CNTs compared to that of gold nanolayers. Previous reports have shown that CNTs have a higher photothermal efficiency compared to gold nanoparticles [23] and this seems to hold for gold nanolayers as well. It is interesting to note that the use of OFMH allows for inducing lesions over a wide range of diameters. While the largest diameter achieved was around 1.2mm (OFMH-CNT, 269mW and 60s), the smallest lesion was measured to be within 200 microns (OFMH-CNT, 71mW and 10s).

In general, data scattering of the resulting diameters of the lesions shown in Fig. 6 are due to various parameters such as contact between the OFMH and liver and CNTs deposits. Also, physical contact between the microheater and the tissue can vary in depth and strength. In addition, the OFMH sometimes adheres to the tissue and the lesion geometry may change during fiber removal. Evidently, further work is needed in order to fully assess the capabilities of the OFMH for photothermal therapy. Nonetheless, our results show that the highly localized heat generated with these devices can readily induce thermal lesion in tissue.

The proposed devices do not rely on tissue absorption and heat is effectively generated at the tip of the OFMH device. Experimental data obtained with a pristine optical fiber is shown in Fig. 6 for comparison. In this case, lesions are due to the optical absorption of the tissue; chromophores of the liver (e.g., blood hemoglobin) absorb light and convert it into heat. The OFMH generates a tissue lesion through the photothermal effect due to the optical absorption of the nanostructures. The lesions induced with the pristine optical fiber are smaller than those induced with the OFMHs, and this approach clearly offers less control over the dimensions of the photoinduced lesions. Furthermore and more importantly, larger laser powers are necessary to obtain noticeable results. Hence the proposed approach does not require high-power laser systems at a predetermined wavelength.

Figure 7 shows the center of the lesions obtained for two types of OFMHs and a pristine fiber. Clearly, the damage caused by the microheaters is more defined and locally aggressive, as traces of tissue debris are not visible within the exposed region of the tissue. In contrast, irradiation with the pristine optical fiber seems to maintain the integrity in cell morphology even inside the lesion. This is consistent with a large temperature increase expected with the microheaters due to enhanced optical absorption. The lesion induced with the OFMH-Au has a cleaner appearance within the lesion. This may indicate that despite not producing as much

heat as the OFMH-CNT, the fiber tip with gold nanolayers yields more concentrated heat owing to reduced scattering because of the absence of nanotubes. In addition, the lesion is localized within a more confined area, making this microheater a better candidate for photothermal therapy applications.

A histological test shows that by simply placing the microheater on the sample without turning the laser on preserves normal liver histology (Fig. 8(A)). Notice that hepatic parenchyma, central veins, and hepatic sinusoids are easily identified. In contrast, Fig. 8(B) clearly shows the thermal effect of the microheater, causing a lesion with the loss of tissue, and an eosinophilic border surging a necrotic border. The limits between the necrotic border and the normal hepatic tissue are well defined, suggesting a more focal necrotic process; similar results to the histological findings have been reported previously using a focal hyperthermia technique [7]. Similar results were obtained for both types of microheaters and analogous necrotic borders in the lesions were observed. The OFMHs have also been tested in other mouse tissues such as skin, muscle and brain, showing similar macroscopical results.

Our results show that the OFMHs offer an interesting alternative to induce thermal lesions with light. Among their main advantages are their size, which makes them ideal for local treatment of malignant tissue, and the use of nanostructures to enhance the photothermal effect, avoiding the use of high power lasers and reducing the time required to generate tissue damage. Other advantages include their ease of fabrication and their compatibility with laser diodes to generate lesions, requiring low power laser devices to generate hyperthermia or thermal ablation. Finally, confinement of the nanoparticles within the tip of the fiber avoids the need for injecting the nanoparticles into the body, thereby reducing potential problems associated with nanostructure toxicity. Hence, the OFMHs may render useful for hyperthermia applications or for triggering thermally triggered local biological responses in cells. Future work will consider histological assessment, lesion depth studies and cell viability tests.

5. Conclusion

The proposed optical fiber microheaters may provide a powerful tool for photothermal therapy. Our results demonstrate the ability of the OFMH to induce lesions with very limited photothermal damage in *ex vivo* soft tissue. The use of micron-size optical fiber microheaters coated with carbon nanotubes or gold nanolayers allow inducing thermal damage in tissue samples in direct contact with the devices. This thermal effect does not rely on the optical absorption of the tissue, and hence avoids the need of a predetermined laser wavelength, providing a versatile device to generate and deliver heat in a highly localized manner. These features may be attractive for developing hyperthermia devices that could find direct application for tumor treatments.

Acknowledgments

This work was partially supported by DGAPA-UNAM through grants PAPIIT IN217612, IN222215 and IT101215. Reinher Pimentel-Domínguez acknowledges support from CONACYT. The authors would like to thank Marel Monroy Peláez, Omar Novelo and Josué Romero Ibarra for their technical support. We also thank Abel Santamaria del Ángel for useful discussions. Support from the Laboratorio Nacional LaNSBioDyT (CONACYT 252043) is also appreciated.

Literatura Citada

*"La información te ayuda a ver que no estás solo. Por eso la biblioteca te ayuda a ver no solamente que no estás solo, sino que tu situación no es muy distinta a la del resto."
Maya Angelou (1928-2014)*

- [1] Organización Mundial de la Salud, Cáncer [sede Web]. 2017 [actualizada en febrero de 2017; acceso el 1 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- [2] Organización Mundial de la Salud , GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 [sede Web]. Francia: International Agency for Research in Cancer; 2017 [acceso el 26 de junio de 2017]. Disponible en: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
- [3] Instituto Nacional de Estadística y Geografía, Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido [sede Web]. México: Instituto Nacional de Estadística y Geografía; 2015 [actualizada el 25 de agosto de 2015, acceso el 26 de junio de 2017]. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>
- [4] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 5° ed. Estados Unidos de America: Garland Science; 2008. 1205-1223 pp.

- [5] Instituto Nacional del Cáncer, ¿Qué es el cáncer? [sede Web]. Estados Unidos de América: National Institutes of Health; 2015 [actualizada el 9 de febrero de 2015, acceso el 26 de junio de 2017]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
- [6] Szasz A, Szasz N, Szasz O. *Oncothermia: Principles and Practices*. Springer; 2011.
- [7] Omuro A, DeAngelis LM. Glioblastoma and other Malignant Gliomas. A Clinical Review. *Clinical Review and Education*. 2013, 310 (17), 1842-1850.
- [8] Instituto Nacional de Estadística y Geografía, Estadísticas a propósito del Día Mundial contra el Cáncer: Datos Nacionales [sede Web]. México: Instituto Nacional de Estadística y Geografía; 2017 [actualizado el 1 de febrero de 2017, acceso el 26 de junio de 2017]. Disponible en: http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/cancer2017_Nal.pdf
- [9] American Society of Cancer, Cancer in the twenty-first century. Estados Unidos de América: American Society of Cancer; 2014 [actualizada el 12 de junio de 2014, acceso el 27 de junio de 2017]. Disponible en: <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/thehistoryofcancer/the-history-of-cancer-twenty-first-century-and-beyond>
- [10] Cancer Research UK, Treatment for Cancer [sede Web]. Inglaterra: Cancer Reserach UK; 2017 [actualizado el 16 de junio de 2017, acceso de junio de 2017]. Disponible en: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancers-in-general/treatment/>
- [11] Instituto Nacional del Cáncer, Tratamiento del cáncer [sede Web]. Estados Unidos de América: National Institutes of Health; 2015 [actualizada el 29 de abril de 2015, acceso el 27 de junio de 2017]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento>
- [12] Prasad, P N. *Introduction to Biophotonics*. Estados Unidos de América: Wiley-Interscience; 2003.
- [13] Tong R, Kohane DS. Shedding Light on Nanomedicine. *Wiley Interdisciplinary Reviews Nanomedicine and Nanobiotechnol*. 2012, 4(6): 638–662.
- [14] vanSonnenberg E, McMullen W N, Solbiati L, editores. *Tumor Ablation: Principles and Practice*. Estados Unidos de América: Springer; 2005
- [15] Beik J, Abed Z, Ghoreishi FS, Hosseini-Namo S, Mehrzadi S, Shkeri-Zadeh A, et al. Nanotechnology in hyperthermia cancer therapy: From fundamental principles to advanced applications. *Journal of Controlled Realese*. 2016, 235, 205-221.
- [16] Mediavilla D. EEUU aprueba su primera terapia génica contra el cáncer [sede Web]. España. *El País*, 2017, [actualizado el 31 de agosto de 2017, acceso el 22 de septiembre de 2017]. Disponible en: https://elpais.com/elpais/2017/08/30/ciencia/1504108056_367642.html
- [17] Dickson JA, Calderwood SK. Temperature Range and Selective Sensitivity of Tumors to Hyperthermia: A Critical Review. *Annals New York Academy of Sciences*. 1980, 180-205.
- [18] Baronzio GF, Hager ED. Introduction and Brief Historical Notes on Hyperthermia. En Baronzio GF, Hager ED, editores. *Hyperthermia in Cancer Treatment: A Primer*. Estados Unidos de América: Landes Bioscience and Springer Science+Business Media; 2006.

- [19] Huang X, Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed M. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers in Medical Science*. 2008; 23, 217-228.
- [20] Nielsen O, Horsman M, Overgaard J. A future for hyperthermia in cancer treatment? *European Journal of Cancer*. 2001, 37(13), 1587-1589.
- [21] Christophi C, Winkworth A, Muralidharan V, Evans P. The treatment of malignancy by hyperthermia. *Surgical Oncology*. 1999; 7, 83-90.
- [22] Titsworth WL, Murad GJ, Hoh BL, Rahman M. Fighting Fire with Fire: The Revival of Thermotherapy for Gliomas. *Anticancer Research*. 2014, 34, 565-574.
- [23] Ahmed K, Zaidi S. Treating cancer with heat: hyperthermia as promising strategy to enhance apoptosis. *Journal of the Pakistan Medical Association*. 2013, 63, 504-508.
- [24] Szasz A, Iluri N, Szasz O. Local Hyperthermia in Oncology-To Choose or not to Choose? En N. Huilgol, *Hyperthermia*. InTech; 2013.
- [25] Chen F, Cai, W. Nanomedicine for targeted photothermal cancer therapy: where are we now? *Nanomedicine (London)*. 2015, 10(1), 1-3.
- [26] Roussakow S. The history of hyperthermia rise and decline. *Conference Papers in Medicine*. 2013, 428027.
- [27] Society for Thermal Medicine, What is Thermal Medicine [sede Web]. Estados Unidos de América: Society for Thermal Medicine; 2017 [acceso el 19 de octubre de 2017]. Disponible en: <http://www.thermaltherapy.org/eBusSFTM/SOCIETYINFO/WhatisThermalMedicine.aspx>
- [28] Goldberg SN, Gazelle GS, Mueller PR. Thermal Ablation Therapy for Focal Malignancy: A Unified Approach to Underlying Principles, Techniques, and Diagnostic Imaging Guidance. *American Journal of Roentgenology*. 2000, 174, 323-331.
- [29] Silva D, Sharma M, Barnett GH. Laser ablation vs open resection for deep-seated tumors: evidence for laser ablation *Clinical Neurosurgery*. 2016, 63(1), 15-26.
- [30] Voigt JD, Barnett G. The value of using a brain laser interstitial thermal therapy (LITT) system in patients presenting with high grade gliomas where maximal safe resection may not be feasible. *Cost Effectiveness Resource Allocation*. 2016, 14(6). Doi: 10.1186/s12962-016-0055-2.
- [31] Lagman C, Chung LK, Pelargos PE, Ung N, Bui TT, Lee SJ, et al. Laser neurosurgery: A systematic analysis of magnetic resonance-guided laser interstitial thermal therapies. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2017, 36, 20-26.
- [32] Chicheł A, Skowronek J, Kubaszewsk M, Kanikowski M. Hyperthermia—description of a method and a review of clinical applications. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*. 2007, 12(5), 267-275.
- [33] Janda P, Sroka R, Mundweil B, Betz CS, Baumgartner R, Leunig A. Comparison of Thermal Tissue Effects Induced by Contact Application of Fiber Guided Laser Systems. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2003, 33, 93-101.

- [34] Muralidharan V, Nikfarjam M, Malcontenti-Wilson C, Christophi C. Effect of Interstitial Laser Hyperthermia in a Murine Model of Colorectal Liver Metastases: Scanning Electron Microscopic Study. *World Journal of Surgery*. 2004, 28(1), 33–37.
- [35] Nikfarjam M, Malcontenti-Wilson C, Christophi C. Focal Hyperthermia Produces Progressive Tumor Necrosis Independent of the Thermal Effects. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2005, 9(3), 410-417.
- [36] Nikfarjam M, Malcontenti-Wilson C, Christophi C. Comparison of 980- and 1064-nm Wavelengths for Interstitial Laser Thermotherapy of the Liver. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2005, 23(3), 284-288.
- [37] Maier-Hauff K, Rothe R, Scholz R, Gneveckow U, Wust P, Thiesen B, et al. Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: Results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme. *J Neuro-Oncology*. 2007, 81, 53-60.
- [38] Fernández-Cabada T, Sánchez-López de Pablo C, Martínez-Serrano A, del Pozo-Guerrero F, Serrano-Olmedo J, Gómez MR. Induction of cell death in a glioblastoma line by hyperthermic therapy based on gold nanorods. *International Journal of Nanomedicine*. 2012, 7, 1511–1523.
- [39] Tong L, Zhao Y, Huff TB, Hansen MN, Wei A, Cheng, J-X. Gold Nanorods Mediate Tumor Cell Death by Compromising Membrane Integrity. *Advanced. Materials*. 2007, 19, 3136–3141.
- [40] Burke A, Ding X, Singh R, Kraft RA, Levi-Polyachenko N, Rylander MN, et al. Long-term survival following a single treatment of kidney tumors with multiwalled carbon nanotubes and near-infrared radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009, 106(31), 12897-12902.
- [41] Vogl TJ, Eicheler K, Straub R, Engelmann K, Zangos S, Woitaschek D, et al. Laser-induced thermotherapy of malignant liver tumors: general principals, equipment(s), procedure(s)-side effects, complications and results. *European Journal of Ultrasound*. 2001, 13, 117-127.
- [42] Roca C, Primo L, Valdembri D, Cividalli A, Declerck P, Carmeliet P, et al. Hyperthermia Inhibits Angiogenesis by a Plasminogen Activator Inhibitor 1-dependent Mechanism. *Cancer Research*. 2003, 63, 1500-1507.
- [43] Menovsky T, Beek JF, van Germet MJ, Roux FX, Bown SG. Interstitial Laser Thermotherapy in Neurosurgery: A Review. *Acta Neurochirurgica (Wien)*. 1996, 138, 1019-1026.
- [44] del Pino P, Pelaz B. Hyperthermia Using Inorganic Nanoparticles. En de la Fuente JM, Grazu V, editores. *Nanobiotechnology: Inorganic Nanoparticles vs Organic Nanoparticles*. Gran Bretaña: Elsevier. 2012. p. 309-336
- [45] Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, Rau B, Gellermann J, Rises H, et al. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *The Lancet Oncology*. 2002, 3, 487-497.
- [46] Cerchiari U. Hyperthermia, Physics, Vector Potential, Electromagnetic Heating: A Primer. En Baronzio GF, Hager ED, editores. *Hyperthermia in Cancer Treatment: A Primer*. Estados

- Unidos de América: Landes Bioscience and Springer Science+Business Media; 2006. p.3-18.
- [47] Cherukuri P, Glazer E, Curley S. Targeted hyperthermia using metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010, 62, 339-45.
- [48] Instituto Nacional del Cáncer, El uso de la hipertermia en el tratamiento del cáncer [sede Web]. Estados Unidos de América: National Institutes of Health; 2011 [actualizada el 31 de agosto de 2011, acceso el 26 de junio de 2017. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/recursos/hojas-informativas/tratamiento/hipertermia>
- [49] Katzir A. *Laser and Optical Fibers in Medicine*. Estados Unidos de América: Academic Press; 1993. p. 89.
- [50] Ansari MA, Erfanzadeh M, Mohajerani E. Mechanisms of laser-tissue interaction: II. Tissue thermal properties. *Journal of Lasers in Medical Science*. 2013, 4(3), 99-106.
- [51] Hildebrandt B., Wust P, Ahlers O, Dieing A, Sreenivasa G, Kerner T, et. al. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2002, 43, 33-56.
- [52] Takagi H, Azuma K, Tsuka T, Imagawa T, Osaki T, Okamoto Y. Antitumor effects of high-temperature hyperthermia on a glioma rat model. *Oncology Letters*. 2014, 7, 1007-1010.
- [53] Song CW. Effect of Local Hyperthermia on Blood Flow and Microenvironment: A Review. *Cancer Research (Suppl.)* 1984, 44, 4721s-4730s.
- [54] Ernsting MJ, Murakami M, Roy A, Li S-D. Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 2013, 172, 782-794.
- [55] Nikfarjam M, Muralidharan V, Malcontenti-Wilson C, McLaren W, Christophi C. Impact of Blood Flow Occlusion on Liver Necrosis Following Thermal Ablation. *ANZ Journal of Surgery*. 2006, 76, 84-91.
- [56] Storm FK, Harrison WH, Elliott RS, Morton DL. Normal Tissue and Solid Tumor Effects of Hyperthermia in Animal Models and Clinical Trials. *Cancer Research*. 1979, 39, 2245-2251.
- [57] Karner KB, Lesnicar H, Cemazar M, Sersa G. Antitumour Effectiveness of Hyperthermia is Potentiated by Local Application of Electric Pulses to LPB Tumours in Mice. *Anticancer Research*. 2004, 24, 2343-2348.
- [58] Wong T, Patel NV, Feiteiro F, Danish SF, Hanft S. Lesion optimization for laser ablation: Fluid evacuation prior to laser induced thermal therapy. *World Neurosurgery*. 2017, 104,192-196.
- [59] Parrish JA, Anderson RR, Harrist T, Paul B, Murphy GF. Selective Thermal Effects with Pulsed Irradiation from Lasers: From Organ to Organelle. *The Journal of Investigative dermatology*. 1983, 80, 75s-80s.

- [60] Xue F, Wen Y, Wei P, Gao Y, Zhou Z, Xiao S, et al. A smart drug: a pH-responsive photothermal ablation agent for Golgi apparatus activated cancer therapy. *Chemical Communications*. 2017, 53, 6424-6427.
- [61] American Society of Cancer, Hyperthermia to Treat Cancer. Estados Unidos de América: American Society of Cancer; 2014 [actualizada el 3 de mayo de 2016, acceso el 27 de junio de 2017]. Disponible en: <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/hyperthermia>
- [62] Castellanos Pérez JM, Reyes Lalalde A, Lozada Sánchez HM, Gómez Osorio JL, Carrillo López, J. Hipertermia para el tratamiento oncológico: Diseño, desarrollo, construcción y aplicación clínica de un equipo de hipertermia para ser utilizado en pacientes oncológicos. *Elementos*. 3 (2), 22-26.
- [63] Instituto Nacional del Cáncer, El uso de la hipertermia en el tratamiento del cáncer [sede Web]. Estados Unidos de América: National Institutes of Health; 2011 [actualizada el 31 de Agosto de 2011, acceso el 26 de junio de 2017]. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/recursos/hojas-informativas/tratamiento/hipertermia>
- [64] Singh R, Torti SV. Carbon nanotubes in hyperthermia therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013, 65, 2045-2060.
- [65] Hermisson M, Wagenknecht B, Wolburg H, Glaser T, Dichgans J, Weller M. Sensitization to CD95 ligand-induced apoptosis in human glioma cells by hyperthermia involves enhanced cytochrome c release. *Oncogene*. 2000, 19, 2338-2345.
- [66] Richter K, Hasbelck M, Buchner J. The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. *Molecular Cell*. 2010, 40, 253-266.
- [67] Silva AK, Nicolas-Boluda A, Fouassier L, Gazeau F. Overcoming the tumor microenvironment: the role of nanohyperthermia. *Nanomedicine (London)*. 2017, 12(11), 1213-1215.
- [68] Kolosnjaj-Tabi J, Marangon I, Nicolas-Boluda A, Brun A, Gazeau F. Nanoparticle-based hyperthermia, a local treatment modulating the tumor extracellular matrix. *Pharmacological Research*. 2017, 126, 123-137.
- [69] Alfranca G, Cui D, Martinez de la Fuente J. The true Complexity of photothermal therapy: A brief perspective. *Nano Biomedicine and Engineering*. 2015, 9(2), 129-134.
- [70] Zhou Z, Yan Y, Hu K, Zou Y, Li Y, Ma R, et al. Autophagy inhibition enabled efficient photothermal therapy at a mild temperature. *Biomaterials*. 2017, 141, 116-124.
- [71] Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. 2007, 35, 495-516.
- [72] Wang, D-C, Zhang Y, Chen H-Y, Li X-L, Qin L-J, Li Y-J, et. al. Hyperthermia Promotes Apoptosis and Suppresses Invasion in C6 Rat Glioma Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2012, 13, 3239-3245.
- [73] Chu W. Tumor Necrosis Factor. *Cancer Letters*. 2013, 328, 222-225.

- [74] Morgan MJ, Liu Z. Reactive Oxygen Species in TNF α -Induced Signaling and Cell Death. *Molecules and Cells*. 2010, 30, 1-12.
- [75] Zhang T, Zhang Y, Qin L, Zhang Y. Tumor necrosis factor- α mediates hyperthermia-induced glioma invasiveness decreases. *Journal of Medical Colleges of PLA*. 2013, 28, 313.
- [76] Melamed JR, Edelstein RS, Day Es. Elucidating the fundamental mechanisms of cell death triggered by photothermal therapy. *ACS NANO*. 2015, 9(1), 6-11.
- [77] Pérez-Hernández M, del Pino P, Mitchell SG, Moros M, Stepien G, Pelaz B, Parak WJ, Gálvez EM, Pardo J, de la Fuente JM. Dissecting the molecular mechanism of apoptosis during photothermal therapy using gold nanoprisms. *ACS NANO*. 2015, 9(1), 52-61.
- [78] Dieing A, Ahlers O, Kerner T, Wust P, Felix R, Löffel J, et al. Whole Body Hyperthermia Induces Apoptosis in Subpopulations of Blood Lymphocytes. *Immunobiology*. 2003, 207, 265-273.
- [79] Khalil AA, Kabapy NF, Deraz SF, Smith C. Heat shock proteins in oncology: Diagnostic biomarkers or therapeutic targets? *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011, 1816, 89-104.
- [80] Nikfarjam M, Muralid V, Christophi C. Mechanisms of Focal Heat Destruction of Liver Tumors. *Journal of Surgical Research*. 2005, 127, 208 –223.
- [81] European Society for Hyperthermic Oncology, Modes for Application [sede Web]. Holanda: European Society for Hyperthermic Oncology [acceso el 19 de octubre de 2017]. Disponible en: <http://www.esho.info/professionals/hyperthermia/applications.html>
- [82] Ross EV, Uebelhoer N. Laser-Tissue Interactions. En Nouri K, editor. *Lasers in Dermatology and Medicine*. Springer; 2011. p.1-24.
- [83] Xie B, Singh R, Torti F, Kevlinski P, Torti S. Heat localization for targeted tumor treatment with nanoscale near-infrared radiation absorbers. *Physics in Medicine and Biology*. 2012, 57, 5765-5775.
- [84] Ryan RW, Wolf T, Spetzler RF, Coons SW, Fink Y, Preul MC. Application of a flexible CO₂ laser fiber neurosurgery: laser-tissue interactions. *Journal of Neurosurgery*. 2010, 112, 434-443.
- [85] Haraldsdóttir KH, Ivarsson K, Götberg S, Ingvar C, Stenram U, Tranberg K-G. Interstitial laser thermotherapy (ILT) of breast cancer. *EJSO*. 2008, 34, 739-745.
- [86] Zhang Y-M, Ruan J, Xiao R, Zhang Q, Huang Y-S. Comparative Study of 1064-nm Laser - Induced Skin Burn and Thermal Skin Burn. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2013, 67, 1005-1014.
- [87] Keen JR, Vigneswaran K, McCracken DJ, Olson JJ. Advancements in the use of stereotatic laser ablation for high-grade gliomas. *Contemporary Neurosurgery*. 2017, 39 (9), 1-6.
- [88] Meditronic, Visualase [sede Web]. Estados Unidos de América. Medtronic, 2017, [actualizado en mayo de 2016, acceso 2 de septiembre de 2017]. Disponible en:

<http://www.medtronic.com/us-en/healthcare-professionals/products/neurological/laser-ablation/visualase.html>

- [89] Monteris Medical, NeuroBlate System [sede Web]. Estados Unidos de América: Monteris Medical, 2016, [acceso 2 de septiembre de 2017]. Disponible en: <https://www.monteris.com/our-technology/neuroblate-system/>
- [90] Missios S, Bekelis K, Barnett GH. Renaissance of laser interstitial thermal ablation. *Neurosurgical Focus*. 2015, 38 (3), E13.
- [91] Pruitt R, Gamble A, Black K, Schulder M, Mehta AD. Complication avoidance in laser interstitial thermal therapy: lessons learned. *Journal of Neurosurgery*. 2017, 126 (4), 1238-1245.
- [92] Leuthardt EC, Voigt J, Kim AH, Sylvester P. A single-center cost analysis of treating primary and metastatic brain cancers with either brain laser interstitial thermal therapy (LITT) or craniotomy. *Pharmacoeconomics Open*. 2017, 1, 53-63.
- [93] Sada T, Fujigaya T, Nakashima N. Manipulation of cell membrane using carbon nanotube scaffold as a photoresponsive stimuli generator. *Science and Technology of Advanced Materials*. 2014, 15, 045002.
- [94] Robinson JT, et al. High performance in vivo near-IR (>1 μm) imaging and photothermal cancer therapy with carbon nanotubes. *Nano Research*. 2010, 3 (11), 779–793.
- [95] Pimentel Domínguez R. Interacción de luz láser con micro- y nanoestructuras [Tesis de licenciatura]. México, Universidad Nacional Autónoma de México, 2012.
- [96] Hirschberg H, Madsen SJ. Cell mediated photothermal therapy of brain tumors. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2017, 12 (1), 99-106.
- [97] Gutwein L, Singh A, Hanh MA, Rule M, Knapik J, Moudgil BM, et al. Fractionated photothermal antitumor therapy with multidye nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 2012, 351-357.
- [98] Hood RL, Carswell WF, Rodgers A, Kosoglu MA, Rylander MN, Grant D, et al. Spatially controlled photothermal heating of bladder tissue through single-walled carbon nanohorns delivered with a fiberoptic microneedle device. *Laser in Medical Science*. 2013, 28, 1143-1150.
- [99] Pan L, Liu J, Shi J. Nuclear-targeting gold nanorods for extremely low NIR activated photothermal therapy. *ACS Applied Materials and Interfaces*. 2017, 9, 15952-15961.
- [100] Sobhani Z, Behnam MA, Emami F, Dehghanian A, Jamhiri I. Photothermal therapy of melanoma tumor using multiwalled carbon nanotubes. *International Journal of Nanomedicine*. 2017, 12, 4509-4517.
- [101] Jiang Q, Luo Z, Men Y, Yang P, Peng H, Guo R, et al. Red blood cell membrane-camouflaged melanin nanoparticles for enhanced photothermal therapy. *Biomaterials*. 2017, 143, 29-45.

- [102] Yang Y, Chen S, Liu L, Li S, Zeng Q, Zhao X, et al. Increasing cancer therapy efficiency through targeting and localized light activation. *ACS Applied Materials and Interfaces*. 2017, 9, 23400-23408.
- [103] Qin Z, Bischof JC. Thermophysical and biological responses of gold nanoparticle laser heating. *Chemical Society Reviews*. 2012, 41, 1191-1217.
- [104] Day ES, Zhang L, Thompson PA, Zawaski JA, Kaffes CC, Gaber MW, Blaney SM, West JL. Vascular-targeted photothermal therapy of an orthotopic murine glioblastoma model. *Nanomedicine*. 2012, 7 (8), 1133-1148.
- [105] Li Y, Gobin AM, Dryden GW, Kang X, Xiao D, Li SP, et al. Infrared light-absorbing gold/gold sulfide nanoparticles induce cell death in esophageal adenocarcinoma. *International Journal of Nanomedicine*. 2013, 8, 2153-2161.
- [106] Huang X, El-Sayed I, Qian W, El-Sayed M. Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. *Journal of the American Chemical Society*. 2006, 128, 2115-2120.
- [107] Bucharskaya AB, Maslyakova GN, Dikht NI, Navolokin NA, Terentyuk GS, Bashkatov AN, et al. Plasmonic photothermal therapy of transplanted tumors in rats at multiple intravenous injection of gold nanorods. *BioNanoScience*. 2017, 7, 216-221.
- [108] Peeters S, Kitz M, Preisser S, Wetterwald A, Rothen-Rutishauser B, Thalmann GN, et al. Mechanisms of nanoparticle-mediated photomechanical cell damage. *Biomedical Optics Express*. 2012, 3, 435-446.
- [109] Nichols JW, Bae YH. Odyssey of a cancer nanoparticle: From injection site to site of action. *Nano Today*. 2012, 7, 606-618.
- [110] Sun T, Zhang S, Pang B, Hyun DC, Yang M, Xia Y. Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy. *Angewandte Chemie International Edition*. 2014, 53, 12320-12364.
- [111] Quian W, Xie L, He Z, Di D, Liu J. Biodegradable magnesium nanoparticle-enhanced laser hyperthermia therapy. *International Journal of Nanomedicine*. 2017, 7, 4715-4725.
- [112] Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology*. 2015, 33(9), 941-951.
- [113] Li L, Liu H. Biodegradable inorganic nanoparticles: an opportunity for improved cancer therapy? *Nanomedicine (London)*. 2017, 12(9), 959-961.
- [114] Madsen SJ, Christie C, Hong SJ, Trinidad A, Peng Q, Uzal FA. Nanoparticle-loaded macrophage-mediated photothermal therapy: potential for glioma treatment. *Laser in Medical Science*. 2015, 30, 1357-1365.
- [115] Wang C, Wang X, Dong K, Luo J, Zhang Q, Cheng Y. Injectable and responsively degradable hydrogel for personalized photothermal therapy. *Biomaterials*. 2016, 104, 129-137.

- [116] Fasano A, Hömberg D, Naumov D. On a mathematical model for laser-induced thermotherapy. *Applied Mathematical Modelling*. 2010, 34, 3831–3840.
- [117] Kosoglu M A., et al. Fiberoptic Microneedles: Novel Optical Diffusers for Interstitial Delivery of Therapeutic Light. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2011, 43, 914–920.
- [118] Kim C, Park H, Lee H. Comparison of Laser-Induced Damage with Forward-Firing and Diffusing Optical Fiber during Laser-Assisted Lipoplasty. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2013, 45, 437–449.
- [119] Pimentel-Domínguez R, Hernández-Cordero J, Zenit R. Microbubble generation using fiber optic tips coated with nanoparticles. *Optics Express*. 2012, 20 (8), 8732-8740.
- [120] Zhang C-L, et al. Microbubble-Based Fiber Optofluidic Interferometer for Sensing. *Journal of Lighthwave Technology*. 2017, 35 (13), 2514-2519.
- [121] Cano Velázquez MS. Fabricación de filtros interferométricos de fibra óptica y materiales poliméricos [Tesis de licenciatura]. México, Universidad Nacional Autónoma de México, 2013.
- [122] MacDonald KF, Fedotov VA, Pochon S, Soares BF, Zheludev NI. Oscillating bubbles at the tips of optical fibers in liquid nitrogen. *Physical Review E*. 2003, 68, 027301.
- [123] Taylor RS, Hnatovsky C. Growth and decay dynamics of a stable microbubble produced at the end of a near-field scanning optical microscopy fiber probe. *Journal of Applied Physics*. 2004, 95 (12), 8444-8449.
- [124] Kim H-T, Bae H, Zhang Z, Kusimo A, Yu M. Optofluidic microvalve-on-a-chip with a surface plasmon-enhanced fiber optic microheater. *Biomicrofluidics*. 2014, 8, 054126.
- [125] Liu H, Sheng Q, Dam D, Hua J, Hou W, Han M. Self-gauged fiber-optic micro-heater with an operation temperature above 1000 °C. *Optics Letters*. 2017, 42 (7), 1412-1415.
- [126] Tong L, Lou J, Xu Y, Luo Q, Shen N, Mazur E. Highly Nd₃-doped Y₃Al₅O₁₂ crystal fiber tip for laser thermotherapy. *Applied Optics*. 2002, 41 (19), 4008-4012.
- [127] Thiery L, Marini N. Thermal behaviour modelling of tapered optical fibres for scanning near-field microscopy. *Ultramicroscopy*. 2003, 94, 49–69.
- [128] Belikov AV, Skrypnik AV, Kurnyshev VY, Shatilova KV. Experimental and theoretical study of the heating dynamics of carbon-containing optothermal fibre converters for laser surgery. *Quantum Electronics*. 2016, 46 (6), 534–542.
- [129] Kuznetsova D, et al. The influence on biotissue laser resection of a strongly absorbing layer at the optical fiber tip. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. 2016, 9 (5), 1650011.
- [130] Belikov AV, Skrypnik AV. Laser heating dynamics and glow spectra of carbon-, titanium- and erbium-containing optothermal fibre converters for laser medicine. *Quantum Electron*. 2017, 47 669.

- [131] Zaca-Morán P, Pastelín CF, Morán C, Pérez-Sánchez GF, Chávez F. Microcautery based on zinc metallic nanoparticles photodeposited on the core of an optical fiber. *Applied Surface Science*. 2017, 392, 492-497.
- [132] Kuznetsova DS. Comparative Analysis of Biotissue Laser Resection Using Strongly Absorbing Optical Fiber Tips. *Optics and Photonics Journal*. 2015, 5, 1-5.
- [133] Placinta M, Shen M-C, Achermann M, Karlstrom RO. A laser pointer driven microheater for precise local heating and conditional gene regulation in vivo. Microheater driven gene regulation in zebrafish. *BMC Developmental Biology*. 2009, 9 (73), 1471-213X/9/73.
- [134] Palanker DV, Turovets I, Glazer R, Reubinoff BE, Hilman D, Lewis A. Microheater as an alternative to lasers for in-vitro fertilization applications. *Proceedings of SPIE*, 1999, 3601.
- [135] Eslava Escobar JO. Reflectometría óptica para optimización de depósitos de nanoestructuras en fibras ópticas [Tesis de maestría]. México, Universidad Nacional Autónoma de México, 2014.
- [136] Löw P, Kim B, Takama N, Bergaud C. High-Spatial-Resolution Surface-Temperature Mapping Using Fluorescent Thermometry. *Small*. 2008, 4, 908–914.
- [137] Chamarthy P, Garimella SV, Wereley ST. Measurement of the temperature non-uniformity in a microchannel heat sink using microscale laser-induced fluorescence. *International Journal of Heat and Mass Transfer*. 2010, 53, 3275–3283.
- [138] Kim MM, Giry A, Mastiani M, Rodrigues GO, Reis A, Mandin P. Microscale thermometry: A review. *Microelectronic Engineering*. 2015, 148, 129–142.
- [139] Natrajan VK, Christensen KT. Fluorescent Thermometry. En Li D, editor. *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics*, Estados Unidos de América: Springer Science+Business Media; 2014.
- [140] Wu J, et. al. Mapping three-dimensional temperature in microfluidic chip, *Scientific Reports*. 2013, 3, 3321.
- [141] Fu R, Xu B, Li D. Study of the temperature field in microchannels of a PDMS chip with embedded local heater using temperature-dependent fluorescent dye. *International Journal of Thermal Sciences*. 2006, 45, 841–847.
- [142] Natrajan VK, Christensen KT. Two-color laser-induced fluorescent thermometry for microfluidic systems. *Measurement Science and Technology*. 2009, 20, 015401.
- [143] Ross D, Gaitan Michael, Locascio LE. Temperature Measurement in Microfluidic Systems Using a Temperature-Dependent Fluorescent Dye. *Analytical Chemistry*. 2001, 73, 4117-4123.
- [144] Jung W, Kim YW, Yim D, Yoo JY. Microscale surface thermometry using SU8/Rhodamine-B thin layer. *Sensors and Actuators A*. 2011, 171, 228–232.
- [145] Ebert S, Travis K, Lincoln B, Guck J. Fluorescence ratio thermometry in a microfluidic dual-beam laser trap. *Optics Express*. 2007, 15, 15493-15499.

- [146] Glawdel T, Almutairi Z, Wang S, Ren C. Photobleaching absorbed Rhodamine B to improve temperature measurements in PDMS microchannels. *Lab on a Chip*. 2009, 9, 171–174.
- [147] Gui L, Rena CL. Temperature measurement in microfluidic chips using photobleaching of a fluorescent thin film. *Applied Physics Letters*. 2008, 92, 024102.
- [148] Samy R, Glawdel T, Ren CL. Method for Microfluidic Whole-Chip Temperature Measurement Using Thin-Film Poly(dimethylsiloxane)/Rhodamine B. *Analytical Chemistry*. 2008, 80, 369-375.
- [149] Pimentel-Domínguez R, Velázquez-Benítez AM, Vélez-Cordero JR, Hautefeuille M, Sánchez-Arévalo F, Hernández-Cordero J. Photothermal Effects and Applications of Polydimethylsiloxane Membranes with Carbon Nanoparticles. *Polymers*. 2016; 8, 84.
- [150] Pimentel-Domínguez R, Moreno-Álvarez P, Hautefeuille M, Chavarría A, Hernández-Cordero J. Photothermal lesions in soft tissue induced by optical fiber microheaters. *Biomedical Optics Express*. 2016, 7, 1138-1148.
- [151] Calderhead R.G. Light-Emitting Diode Phototherapy in Dermatological Practice. En Nouri K, editor. *Lasers in Dermatology and Medicine*. Springer; 2011. p.231-265.
- [152] Belykh E, et al. Laser application in neurosurgery. *Surgical Neurology International*. 2017, 8, 274.
- [153] Ross MH, Pawlina W. *Histology a Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology*. 6° ed. China: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
- [154] Cui D, et al. *Atlas of Histology with Functional and Clinical Correlations*. 1° ed. China: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
- [155] Mitchell RN, Kumar V, Abbas AK, Fausto N. *Compendio de Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional*. 7° edición. Elsevier: España; 2007.
- [156] Paxinos G, Franklin KB. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2° edición. Estados Unidos de América: Elsevier Academic Press; 2004.
- [157] Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principios de Bioquímica*. 5° edición. España: Ediciones Omega; 2009. p. 174.
- [158] Ueda H, Fujita R. Cell Death Mode Switch from Necrosis to Apoptosis in Brain. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2004, 27(7), 950-955.
- [159] Nikfarjam M, Muralidharan V, Malcontenti-Wilson C, Christophi C. The Apoptotic Response of Liver and Colorectal Liver Metastases to Focal Hyperthermic Injury. *Anticancer Research*. 2005, 25, 1413-1420.
- [160] Gyoneva S, Ransohoff RM. Inflammatory reaction after traumatic brain injury: therapeutic potential of targeting cell-cell communication by chemokines. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2015, 36, 471-480.
- [161] Servicio de Neurocirugía - Unidad de Raquis del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Diagnóstico y tratamiento de los gliomas en áreas funcionales del cerebro [sede

- Web]. España: Hospital Universitario Marqués de Valdecilla [acceso el 1 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://neurocirugia.humv.es/uploads/foto/file/36/attachment-2004519353.pdf>
- [162] Universidad de California, FAQ: Visualase Thermal Ablation for Epilepsy [sede Web]. EUA: Universidad de California; 2017 [actualizado el 27 de febrero de 2018, acceso el 1 de marzo de 2018]. Disponible en: http://neurosurgery.ucsf.edu/index.php/epilepsy_visualase-thermal-ablation-laser-surgery.html
- [163] Medtronic. Visualase® MRI-guided Laser Ablation for Minimally Invasive Neurosurgery [Video]. 3 de septiembre de 2014. [Consultado el 1 de marzo de 2018] [2:33]. Disponible en: <https://www.youtube.com/watch?v=okpWbBVhZVE>
- [164] Monteris Medical. NeuroBlate® System Procedure Review - Spanish [Video]. 10 de febrero de 2017. [Consultado el 1 de marzo de 2018] [5:17]. Disponible en: <https://www.youtube.com/watch?v=CKc-5ev3V0I>