

Uso de nanopartículas (NP) en la terapia fotodinámica (photodynamic therapy [PDT]) contra el cáncer

Gabriela Victoria Roblero-Bartolón y Eva Ramón-Gallegos*

Laboratorio de Citopatología Ambiental, Departamento de Morfología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN, Campus Zacatenco, Unidad Profesional «Adolfo López Mateos», México, D.F.

Resumen

La nanotecnología es un campo interdisciplinario prometedor en el desarrollo de mejores métodos de diagnóstico y tratamiento en diferentes enfermedades, entre ellas el cáncer. Debido a las propiedades ópticas, magnéticas y estructurales de las NP, se ha propuesto su uso en el desarrollo de tratamientos no convencionales contra el cáncer, como la PDT. En la PDT se utiliza un agente fotosensibilizador (PS) que se acumula en las células tumorales y causa la muerte de las células malignas después de la irradiación con luz a una determinada longitud de onda. Sin embargo, el uso de la PDT presenta diferentes problemas en su aplicación debido a las características de hidrofobicidad de los PS que dificultan la administración y eficiencia del tratamiento, razón por la cual se propone el uso de NP como vehículos de transporte y su acoplamiento a PS para optimizar la aplicación del tratamiento. En esta revisión se describe el uso de las NP en la PDT en el tratamiento contra el cáncer, sus características y su mecanismo de acción molecular al ser acopladas a un PS.

PALABRAS CLAVE: Nanopartículas. Terapia fotodinámica. Cáncer.

Abstract

Nanotechnology is a promising interdisciplinary field for developing improved methods of diagnosis and treatment of different diseases, including cancer. Give their optical, magnetic, and structural property, the nanoparticles have been proposed to be use in the development of unconventional treatments for cancer such as photodynamic therapy (PDT). In PDT, a photosensitizing agent is used that accumulates in tumor cells, generating reactive oxygen species that causes the death of malignant cells after irradiation with light at a particular wavelength. However, the use of PDT presents different problems in its application due to the characteristics of hydrophobicity of the photosensitizers, which hinder the efficiency of administration and treatment. It is here where the use of nanoparticles is proposed as a delivery vehicle to optimize treatment application. In this review we describe the use of nanoparticles coupled to PDT in the treatment of cancer and its molecular mechanism of action.

(Gac Med Mex. 2015;151:85-98)

Corresponding author: Eva Ramón-Gallegos, eramong@ipn.mx

KEY WORDS: Nanoparticles. Photodynamic therapy. Cancer.

Correspondencia:

*Eva Ramón-Gallegos
Wilfrido Massieu, esq. cda. Manuel Stampa Zacatenco
Del. Gustavo A. Madero, C.P. 07738, México, D.F.
E-mail: eramong@ipn.mx

Fecha de recepción en versión modificada: 20-05-2014

Fecha de aceptación: 01-06-2014

Tabla 1. Medicamentos aprobados contra el cáncer utilizando nanotransportadores

Nombre comercial/compuesto	Fabricante	Nanotransportador	Indicación
Abraxane/paclitaxel	Abraxis Biosciences	Albúmina unida a paclitaxel	Cáncer de mama metastásico ⁶
DaunoXome/daunorrubicina	Diatos (Francia)	Liposoma	Sarcoma de Kaposi ⁹
Doxil/Caelyx/doxorubicina	Ortho Biotech	Liposoma	Sarcoma de Kaposi, cáncer de mama recurrente, cáncer de ovario ¹⁰
Myoset/doxorubicina	Cephalon (Europa)	Liposoma no pegilado	Terapia combinada contra cáncer de mama recurrente y cáncer de ovario ¹¹

Adaptado de Jain⁷ y Yu, et al.⁸.

Aplicación de la nanotecnología en la biomedicina

El desarrollo de la nanotecnología comenzó a inicios de la década pasada; los estudios realizados proponen una explicación de las interacciones entre las NP y los sistemas biológicos, para comprobar su aplicación en la biomedicina¹. Existen diferentes trabajos que sugieren que las NP pueden ser utilizadas como distribuidores de fármacos para incrementar la respuesta a terapias con compuestos anticancerígenos^{2,3}. Una definición de nanotecnología podría ser la creación y utilización de materiales o sistemas cuyas dimensiones se encuentran en la escala de nanómetros en el intervalo de 0.1-100 nm⁴, aunque hay excepciones, como los liposomas.

La síntesis de las NP ofrece la posibilidad de manipular aquellas de sus propiedades físicas y químicas necesarias para lograr el objetivo de diseñar moléculas que proporcionen una interacción biológica altamente específica. Éstas presentan una variedad de formulaciones para diversas aplicaciones, teniendo ventajas sobre otras moléculas de fármacos en estudios *in vivo*¹. En la actualidad, las NP se han utilizado como vehículos para transportar compuestos directamente a los tejidos cancerosos porque logran atravesar las membranas de células endoteliales, vasculares y tumorales⁵.

La nanotecnología permite una administración más eficaz de fármacos contra el cáncer, pero la aprobación de los nanofármacos en el mercado es lenta. Hasta la fecha, existen diferentes tipos de fármacos aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos (*Food and Drug Administration* [FDA]), como

Doxil®, que es una formulación de liposomas con doxorubicina aprobada en 1995 para el tratamiento del sarcoma de Kaposi e indicada para el tratamiento del cáncer de mama y de ovario⁶, o Abraxane®, un conjugado de albúmina unida a paclitaxel aprobado en 2005 para el tratamiento del cáncer de mama metastásico⁷. En la tabla 1 se presentan algunos fabricantes que producen fármacos acoplados a NP que están aprobados en tratamientos contra el cáncer hasta el año 2010. Hasta la fecha, la integración de la nanotecnología con la biología molecular y la medicina se ha traducido en el desarrollo activo de una nueva área de investigación conocida como nanobioteconología².

Las formulaciones de un nanotransportador están diseñadas para reducir el tiempo de eliminación de los fármacos y proporcionar la protección de los agentes de degradación enzimática o del medio ambiente^{4,12}. La nanobioteconología está empezando a cambiar la escala y el método de entrega del fármaco, y tiene un gran valor para la investigación de tratamientos contra el cáncer⁵, que en los últimos años se han centrado en el desarrollo de vehículos moleculares que sirvan como agentes anticancerígenos¹³.

La topología de una NP consiste en un núcleo, el revestimiento y la superficie con grupos funcionales. El uso de NP en la terapia del cáncer muestra una farmacocinética única; las NP se internalizan y estabilizan rápidamente¹⁴. Debido a las diferentes aplicaciones que han demostrado las NP, existen formulaciones acopladas a fármacos aprobadas para uso clínico que son utilizadas como nanoacarreadores¹⁵ (Tabla 1).

El objetivo de esta revisión es analizar aquellos trabajos que, utilizando NP acopladas a PS, manifiesten mejorar la eficiencia de la PDT en estudios realizados *in vivo* e *in vitro* contra el cáncer.

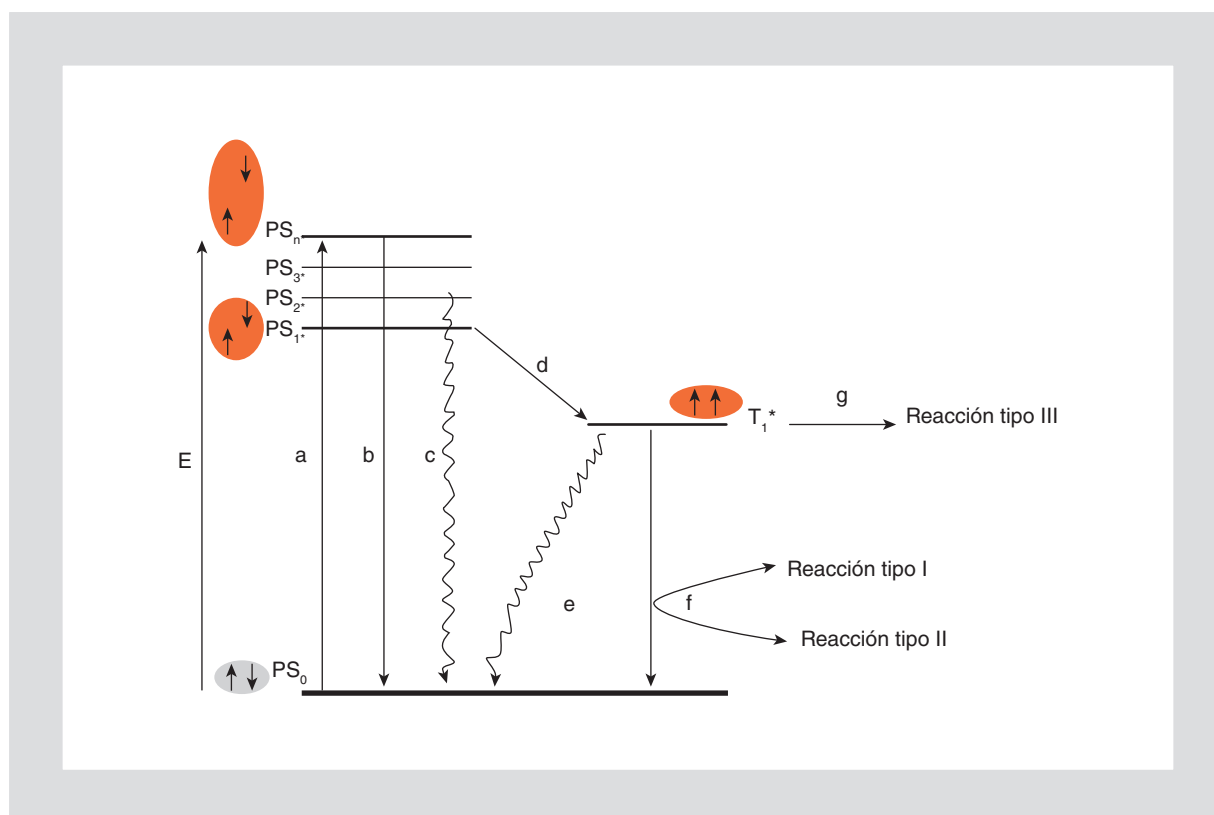


Figura 1. Diagrama de Jablonsky modificado para explicar los mecanismos de respuesta biológica celular producidos por PS después de la irradiación con luz a una longitud de onda específica. Procesos fotoquímicos: absorción (a), fluorescencia (b), conversión interna (c), cruzamiento intersistema (d), fosforescencia (e), formación de especies reactivas de oxígeno (f), reacción del PS en estado triplete (T_1^*) con biomoléculas e independiente de oxígeno (g).

NP en la PDT

La PDT es una tecnología médica, aprobada por la FDA, que usa láseres para activar fármacos fotosensibles para tratar el cáncer y otras enfermedades por un medio no quirúrgico y de mínima invasividad. Las enfermedades que se pueden tratar deben estar en sitios accesibles a la luz, tales como el esófago, la piel, el estómago, la vagina, el cuello del útero, etc.¹⁶. Sin embargo, recientemente, gracias al desarrollo de fibras ópticas, su uso se ha extendido a órganos internos como el cerebro, el ovario y el hígado, entre otros.

La PDT requiere tres componentes: una sustancia química fotosensible llamada PS, una fuente de luz (lámpara, láser, diodo emisor de luz [LED]) y oxígeno molecular (O_2) intracelular; la interacción energética de estos tres elementos indispensables en la PDT se detalla en el diagrama de Jablonski¹⁷ (Fig. 1). El PS en su estado electrónico basal, que se encuentra en estado singulete (PS_0), al absorber

luz de una longitud de onda apropiada (a), alcanza un primer estado singulete excitado de vida corta (PS_1^*). El PS excitado puede regresar a su estado basal (PS_0) al emitir la energía absorbida como fluorescencia (b) o por conversión interna (c). Alternativamente el PS excitado (PS_1^*) puede cambiar a un primer estado excitado de triplete (T_1^*) mediante un proceso conocido como cruzamiento intersistema (d). Ésta es una transición prohibida (*spin forbidden*); sin embargo, un buen PS alcanza un alto rendimiento de estos estados a la denominada capacidad de *quantum*. El estado T_1^* tiene una vida media suficientemente larga para tomar parte en las siguientes tres reacciones químicas (f), por lo que la acción fotodinámica en su mayoría es mediada por el PS en este estado energético:

- Reacción tipo I: el T_1^* puede transferir un electrón a un sustrato A (agua o biomolécula) o sustraer un átomo de hidrógeno de un sustrato AH_2 para generar radicales libres peróxidos y superóxidos.

Tabla 2. PS conjugados a NP

PS	Tipos de NP acopladas	Abs (nm)
PpIX	NP de sílice mesoporoso ³⁵ NP de sílice ³⁶	630
Hematoporfirina	NP de poliacrilamida ³⁷	630
Ácido 5-aminolevulínico	Conjugado con AuNP ³⁸ Alginato y ácido fólico modificado con NP de quitosán ³⁹	630
mTHPC	NP de sílice ⁴⁰ , micelas ⁴	652
BChl-a	NP de PLGA ⁴¹	740
Ce6	NP de glicol-quitosán ⁴²	690
Ftalocianinas Pc-4	AuNP ⁴³ , liposomas ⁴⁴ PEG-PCL NP de micelas ⁴⁵ , NP de sílice ⁴⁶ NP de PLGA ^{47,48}	680
Ftalocianinas de zinc	CdTe QD ^{49,50}	

BChl-a: bacterioclorofila-a; Ce6: clorina e6; PEG-PCL: polietilenglicol-poli-ε-capro-lactona.

- Reacción tipo II: se transfiere la energía de excitación electrónica al oxígeno molecular en estado normal de triplete ($^3\text{O}_2$) presente en el tejido, dando lugar al oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), el cual es altamente reactivo y citotóxico.
- Reacción tipo III: consiste en reaccionar directamente con biomoléculas por una vía independiente de oxígeno.

La reacción tipo II parece tener un papel central en la citotoxicidad fotodinámica por la interacción de alta eficiencia del $^1\text{O}_2$ con diferentes moléculas biológicas. Las tres reacciones pueden ocurrir simultáneamente y en competencia para generar muerte celular, pero la relación entre ellas depende del tipo de PS y la naturaleza de las moléculas del sustrato con las que interactúan los productos de las reacciones¹⁶⁻¹⁹.

El PS en su estado triplete (T_1^*) puede también regresar a su estado basal (PS_0) al emitir un fotón (fosforescencia) (e). Finalmente es degradado por la luz; este proceso es conocido como fotoblanqueamiento¹⁹.

La aplicación clínica de la PDT se lleva a cabo de la siguiente manera:

- Se administra el fármaco fotosensibilizante al paciente por vía tópica o sistémica.
- Se espera un tiempo para que el fármaco fotosensibilizante se acumule selectivamente en las células tumorales o afectadas por otra enfermedad. Aquí también se puede medir la fluorescencia.
- Se introduce una fibra óptica en la cavidad del paciente para llevar la luz al tumor.

- Se irradia el tumor de forma localizada con un sistema láser u otra fuente de luz²⁰.

La PDT tiene un costo relativamente bajo, es no invasiva, se puede aplicar a nivel local y no se observan efectos secundarios severos. Las limitaciones del método están relacionadas con la distribución del PS y la irradiación local y profunda del tejido, debido a que las longitudes de onda de luz no penetran lo suficiente dentro del tejido^{12,21}. Hasta la fecha, los PS disponibles en el mercado tienen características específicas que pueden beneficiar a los pacientes, pero ninguno es totalmente satisfactorio.

En general, los principales inconvenientes de los PS son: vida media corta dentro del tejido; retención parcial en el tejido normal, son difíciles de sintetizar y poco estables; sin embargo, no son mutagénicos y son mínimamente alergénicos, de fácil reconstitución y rentables²². A pesar de estos inconvenientes, el éxito clínico es posible. La nanotecnología ofrece muchas ventajas para optimizar la administración de los PS mejorando la PDT²³, donde las NP se pueden emplear como: PS, portadoras de moléculas fotosensibilizantes, esqueletos para fotosensibilizar las moléculas y acarreadores con múltiples funciones^{24,25}.

Las NP tienen el potencial de mejorar la PDT más allá de sus limitaciones actuales²¹. Hay muchas maneras de modificar los PS: por ejemplo, acoplándolos con agentes de entrega dentro de liposomas²⁶, micelas²⁷⁻³⁰, NP de cerámica³¹, nanopartículas de oro (AuNP)³² y NP de polímeros³³. En la tabla 2 se

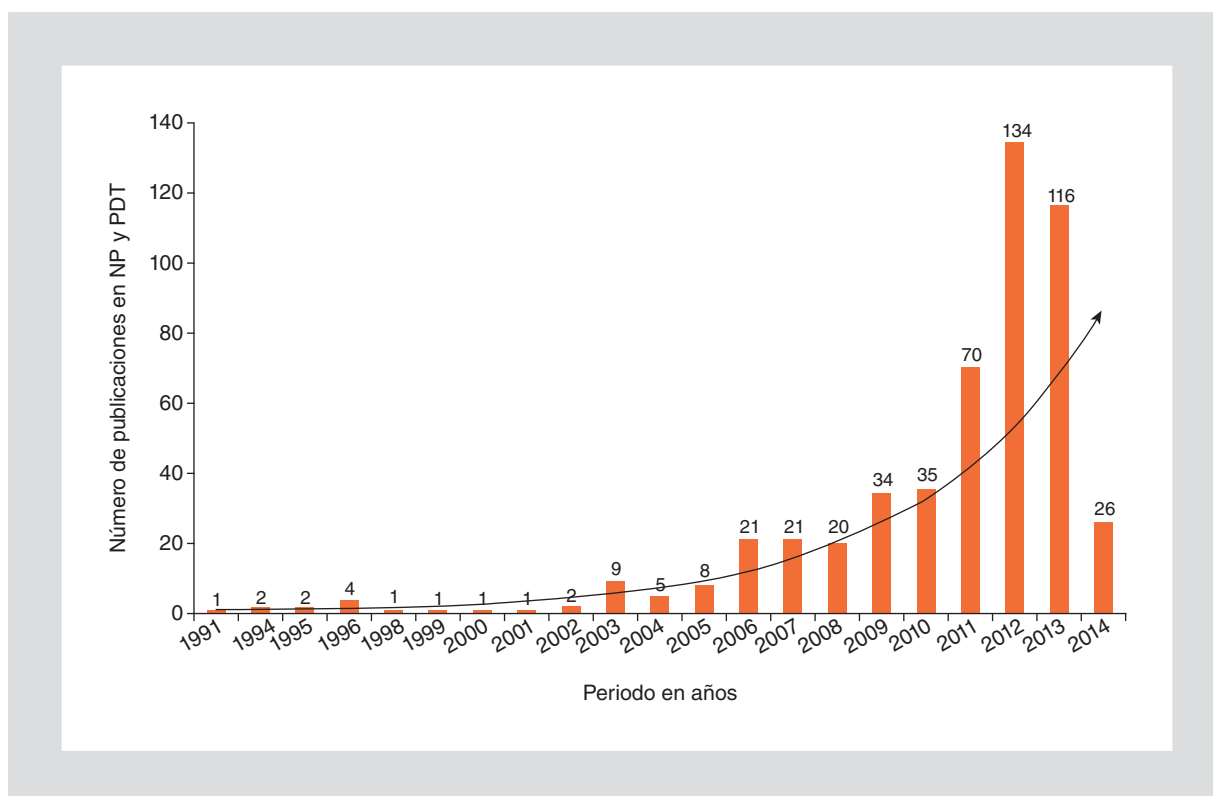


Figura 2. Número de publicaciones realizadas en el área de las NP y la PDT.

presentan los PS que han sido conjugados a distintos tipos de NP, así como la longitud de onda de absorción máxima de cada PS, mostrando que se encuentra dentro del espectro de absorción de luz visible, mejorando la eficiencia de excitación de cada PS. La ventaja de usar NP es que el PS se entrega al sitio del tumor de una manera más selectiva y con baja toxicidad, lo cual hace muy poco daño a los tejidos normales^{15,34}.

Los primeros estudios en el área de las NP acopladas a los PS se iniciaron en 1991; para esta revisión se han examinado las publicaciones realizadas en el área en diferentes bases de datos latinoamericanas como BIREME⁵¹, LILAC⁵² y SCIELO⁵³, en bases de datos europeas como SCOPUS⁵⁴ y SCIENCE DIRECT⁵⁵, y finalmente dentro del sistema de PubMed⁵⁶. Se han encontrado 514 artículos originales publicados hasta el primer trimestre del año 2014; realizando una búsqueda del número de patentes en la base de datos USPTO con las palabras clave *nanopartículas y terapia fotodinámica* se encontraron 196 patentes registradas hasta la fecha⁵⁷. En la figura 2 se presenta la gráfica del número de publicaciones por año.

Los primeros trabajos fueron publicados por dos grupos, uno de ellos el de Brasseur, et al., en 1991, que utilizó el PS hematoporfirina acoplado a NP orgánicas de polialquilcianoacrilato; el conjugado demostró una fácil liberación del PS a partir de la formulación³⁷.

El número de publicaciones, sin embargo, no se incrementó significativamente hasta el año 2003, cuando de manera simultánea comenzaron las patentes de diferentes NP acopladas a PS; se había descrito el mecanismo de síntesis y algunas pruebas *in vitro*. Entre estos trabajos se encuentran los de Konan, et al. (2003) empleando el PS meso-tetra (4-hidroxifenilo) porfirina unido a NP con poli(D,L-ácido láctico co-glicólico) (PLGA) usando la técnica de emulsificación-difusión⁵⁸. La fototoxicidad fue evaluada en la línea celular de cáncer de mama EMT-6 y se encontró más efecto citotóxico con las NP a bajas concentraciones del PS que cuando éste se administró solo en la línea celular⁵⁹.

Otro tipo de NP patentadas en 2003 fueron las elaboradas por el grupo de Prasad, con NP de cerámica que servirían como acarreadores de PS⁶⁰. Continuaron otros trabajos, como el de Ricci-Junior, et al., que en

Tabla 3. Clasificación de las NP usadas en la PDT

NP pasivas		
Biodegradables	Principalmente PLA y PLGA	Matriz sólida/cápsulas que contienen PS de liberación controlada a través de la biodegradación
No biodegradables	Cerámica (sílice)	El PS es adsorbido/unido covalentemente a una superficie porosa; además se utiliza para la coencapsulación de dos fotones
	Oro	NP de 5 nm que actúan como portadores únicamente
	Óxido de hierro	Transporta los fármacos directamente o coencapsulado en las micelas
	Poliacrilamida	Encapsula dos fotones de un colorante por la microemulsión
NP activas		
PS	QD	Las NP transfieren energía de la luz incidente directamente al oxígeno circundante
Autoiluminado	BaFBr:Eu ⁺ , Mn ⁺	Centelleo (con persistencia luminosa), la excitación de los rayos X activa al PS unido
Conversión ascendente	NaYF ₄ :Yb,Er/Tm	Transduce la luz de baja energía con las emisiones de energía, activa al PS asociado

2006 propusieron la síntesis de nanocápsulas que contenían zinc acopladas a ftalocianinas recubiertas con PLGA con un diámetro de 265 nm, las cuales generaron un 60% de muerte celular después de la PDT en la línea celular P388D1, macrófagos murinos^{33,48}. Otros tipos de PS acoplados a NP se muestran en la tabla 2.

NP desarrolladas para la aplicación de la PDT

Dado que la eficacia de la PDT es atribuida a la producción del oxígeno singulete (¹O₂) utilizando NP se pueden seguir dos estrategias para lograr este objetivo: con NP biodegradables que liberan los PS o con NP no biodegradables en cuyo caso no es necesario liberarlos¹². En una revisión de Konan, et al. se dividen los procesos de entrega del PS en base pasiva y activa de acuerdo con la presencia o ausencia de la molécula blanco en la superficie de la célula blanco⁶¹. Sin embargo, esta definición no considera el papel desempeñado por las NP en el proceso de la PDT.

El uso de las NP como portadoras tiene un papel importante como intermediario activo en el proceso de activación fotodinámica. Hasta la fecha, ha surgido una nueva clasificación por su función; las NP pueden dividirse en dos clases: como portadoras pasivas o activas para la excitación del PS. Como portadoras pasivas pueden ser subclasificadas

según la composición del material en biodegradables y no biodegradables (por ejemplo, NP cerámicas y metálicas); y se denominan activas por el mecanismo de activación en la terapia que favorece el proceso de excitación del PS⁶². En la tabla 3 se muestra la clasificación de las NP que han sido utilizadas en la PDT.

Dentro de las NP acopladas a PS que se encuentran actualmente en fases preclínicas, están por ejemplo las formulaciones de meta-tetrahidroxifenilclorina (mTHPC) cubierta con liposomas de Foslip®. Sin embargo, diversos estudios han reportado efectos secundarios de Foslip®, como taquipnea, salivación y excitación⁶³, daño reducido en tejidos sanos^{64,65}, selectividad del tumor⁶⁶ y alta absorción en la piel⁶⁷. Se ha evaluado el uso potencial de una formulación liposomal de Foslip® en un modelo de ratón para la recurrencia local del cáncer de mama⁶⁸. Los datos muestran que Foslip® es un PS muy satisfactorio para la PDT, con eficacia prometedora, selectividad mejorada y efectos secundarios reducidos. Son necesarios más estudios para su desarrollo y la optimización de la formulación de liposomas para la PDT.

La ftalocianina de sílice 4 (Pc-4) se ha probado clínicamente⁴⁶. Es uno de los PS más eficientes basado en ftalocianinas y ha demostrado una alta actividad fotodinámica. Sin embargo, es un agente hidrófobo que es insoluble y tiene una tendencia a agregarse en soluciones acuosas que reducen su actividad fotodinámica⁶⁹. Se ha incorporado en NP de sílice

porosas (Pc-4SNP) logrando mejorar su solubilidad, estabilidad, entrega del PS a las células A375 de melanoma y mostrando un incremento en la actividad fotodinámica en comparación con la ftalocianina libre⁴⁶.

Un tipo diferente de portadores de PS son las NP de lípidos recubiertas de sílice mesoporosa (MSN) encapsuladas con el fin de mejorar la focalización y biocompatibilidad del PS en la PDT. Los resultados muestran una mayor absorción *in vitro* en células humanas de carcinoma de mama MCF-7 en comparación con el agente no recubierto⁷⁰. Recientemente se han realizado estudios preclínicos con un nuevo tipo de PS líquido iónico (cholinium-purpurina-18 [Chol-Pu-18]) y AuNP. Se prepararon utilizando el PS soluble basado en un hidróxido de purpurina y colina⁷¹ mostrando una mejor respuesta con el conjugado al aplicar la PDT en líneas celulares.

Estos resultados sugieren que la utilización de las NP como distribuidoras de PS incrementa la respuesta al tratamiento por la PDT. En las siguientes secciones abordamos la aplicación de diferentes tipos de NP acopladas a PS que han sido probadas en estudios *in vitro* e *in vivo* y han demostrado una mejor respuesta que con la PDT convencional.

NP biodegradables a base de polímeros

Las NP biodegradables están hechas de polímeros que se degradan liberando al PS¹². Consisten en una mezcla de polímeros de ácido láctico y ácido glicólico. El aumento en la velocidad de biodegradación se logra por el incremento de la proporción molar de ácido glicólico en el copolímero. Konan, et al., en 2003, sintetizaron NP con un diámetro de 150 nm con una combinación (50:50 PLGA:poli DL-láctico) cargada con un PS de segunda generación meso-tetra (p-hidroxifenilo) porfirina (p-THPP). En este estudio encontraron que los efectos de la PDT utilizando el conjugado de NP con p-THPP generó el 95% de la muerte celular²¹. Sin embargo, aún no hay reportes de estudios *in vivo* acerca del uso de las NP biodegradables.

Se debe considerar que la fotoactividad *in vitro* depende principalmente de las propiedades fotoquímicas y penetrantes de las NP cargadas con el PS en las células, mientras que la actividad *in vivo* se rige por diferentes factores, como la farmacocinética y distribución tisular de las NP, las cuales son afectadas por los componentes del tejido¹².

NP no biodegradables a base de polímeros para la PDT

La utilización de NP no biodegradables presenta muchas ventajas. La principal es que no se necesita tiempo para la biodegradación de las NP; el PS está protegido del medio ambiente por las NP, que sirven como plataformas multifuncionales y son de menor tamaño⁶². Los polímeros de poli(acrilamida) pueden ser utilizados para la síntesis de NP no biodegradables, pero la mayoría son a base de cerámica (sílice) o metálicas⁷².

NP de cerámica

Son sistemas inorgánicos de superficie porosa que han emergido como vehículos para fármacos con un gran potencial; pueden estar elaborados a partir de materiales de sílice, titanio y aluminio^{73,74}.

Los primeros sistemas de NP de sílice unidas a PS fueron sintetizados y probados por Kopelman, et al. en 2003 y por Gary-Bobo, et al. en 2011^{75,76}. Utilizaron NP de sílice mesoporosa (MSN) acopladas al PS 5-p-aminofenilo-10,15,20-sulfonatofenilo-porfirina; este conjugado estuvo acoplado al ligando de galactosa y al fármaco camptotecina (CPT). El efecto fotodinámico se evaluó en líneas celulares de cáncer de colon HCT-116, de mama MDA-MB-231 y de páncreas Capan-1; se encontró un porcentaje de muerte celular del 73 y el 79% en las células del cáncer de colon y mama, respectivamente, y en las del cáncer de páncreas se observó una muerte del 100% después de la PDT⁷⁷. Por microscopia confocal se evaluó la localización del conjugado en los lisosomas de las células^{76,77}. Prasad, et al. encapsularon en una matriz de sílice el PS 2-devinilo-2-(1-hexiloxietilo) pirofeoforbido (HPPH), un PS que se encuentra actualmente en ensayos clínicos de fase I y II. Los experimentos *in vitro* mostraron que el conjugado inducía un porcentaje de muerte celular del 60% después de la PDT⁶⁰.

Quantum dots (QD)

Los QD fueron identificados en la década de 1980 y su síntesis se logró reproducir a principios de la de 1990. En la actualidad se les ha encontrado múltiples aplicaciones como celdas solares, LED y agentes de imagen y diagnóstico. Además, por sus características, Bakalova, et al. en 2004 sugirieron que podrían utilizarse como posibles PS en la PDT⁷⁸.

Debido a que muestran amplios espectros de absorción, se ha sugerido que la conjugación de éstos a los PS podría proporcionar mayor flexibilidad para utilizar diferentes longitudes de onda de excitación para activar al PS. Sin embargo, la mayoría de estos complejos no son solubles en agua y aún no se han demostrado las propiedades de biocompatibilidad y biodisponibilidad de estos compuestos, por lo cual no podrían ser óptimos para entornos biológicos⁷⁹.

NP magnéticas

Están elaboradas a partir de óxido de hierro u otros compuestos superparamagnéticos. Hay dos tipos de óxido de hierro que han sido investigados principalmente para su uso en la formulación de NP magnéticas: maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) y magnetita (Fe_3O_4), ambos biocompatibles, aunque el candidato más prometedor es la magnetita. Generalmente están recubiertos con dextrán, fosfolípidos u otros compuestos para inhibir la agregación e incrementar su estabilidad. Sus características magnéticas les confieren utilidad en técnicas para obtener imágenes por resonancia magnética^{23,73,74}.

AuNP

Las AuNP se pueden preparar fácilmente, obteniéndose sistemas coloidales monodispersos estables con un tamaño de entre 1 y 150 nm a partir del ácido tetracloroáurico (HAuCl_4)⁸⁰. Las AuNP poseen propiedades químicas únicas que les dan aplicaciones prometedoras en la terapia génica y la entrega de fármacos a células específicas. Las nanocápsulas de oro han sido probadas en varios modelos de cáncer, tanto *in vitro* como *in vivo*^{73,74}.

Entre otras nanoestructuras, las AuNP juegan un papel importante en la terapia del cáncer debido a que pueden mejorar el daño inducido por la radiación; producen calor durante la exposición a los rayos UV y radiación cercana al infrarrojo, por lo que ofrecen la posibilidad de destrucción de las células cancerosas a través de la ablación térmica; mejoran la administración de fármacos anticancerígenos que son altamente insolubles en agua o inestables en el medio biológico; aumentan el tiempo de vida media de fármacos y agentes de imagen a través de la modificación de superficies de las NP para evitar la pérdida del fármaco causada por la rápida eliminación y metabolismo⁸¹.

La utilización de AuNP acopladas a PS fue propuesta por primera vez por Russell, et al., en 2002,

mostrando un claro aumento en el rendimiento cuántico del $^1\text{O}_2$, atribuido al metal por una mayor fluorescencia²⁵. Se han empleado otros PS como porfirinas, clorinas, protoporfirina IX (PpIX)-ALA. Una característica atractiva de este enfoque es que las AuNP no son tóxicas y ya se utilizan en la terapia. Por lo tanto, se puede esperar que la aprobación y aplicación clínica al final sean más fáciles de conseguir²¹.

En 2008, Cheng, et al. desarrollaron un conjunto integrado por AuNP, polietilenglicol (PEG) y ftalocianina-4 (Pc-4), para la administración *in vivo* de fármacos en la PDT⁸². Cuando el PS Pc-4 se inyecta *in vivo* en la PDT, tarda uno o dos días hasta que se acumula en el sitio del tumor. Utilizando el conjugado de NP se redujo el tiempo de acumulación en el tumor a 2 h^{34,82,83}.

En 2011, Cheng, et al. evaluaron la eficiencia del conjugado de AuNP con ftalocianinas en ratones y demostraron un sistema de liberación rápida del fármaco y penetración en tumores en cuestión de horas. La farmacocinética de los conjugados en un periodo de prueba de siete días demostró una excreción rápida del fármaco, verificada a través de la fluorescencia de éste en la orina. Este estudio sugiere que la entrega no covalente a través de AuNP ofrece un enfoque atractivo para los fármacos contra el cáncer para penetrar profundamente en el centro de los tumores⁸⁴.

Este trabajo muestra el potencial de la PDT como diagnóstico utilizando conjugado de AuNP con ftalocianinas en ratones. El sistema mostró una versatilidad única, ya que permitió la administración de fármacos, el control cuantitativo del proceso de entrega y la terapia del cáncer. Sin embargo, en el estudio las imágenes de fluorescencia de los tumores en los ratones mostraron la localización del conjugado no sólo en el tumor, sino también en otras áreas. Estos tipos de sistemas de administración pueden ser mejorados, por ejemplo, con anticuerpos monoclonales con especificidad por los receptores-ligandos para el sitio del tumor. Utilizando este sistema de NP acopladas a PS en el futuro el proceso de entrega de fármacos podría ser fácilmente controlado y cuantificado⁸⁴.

En la tabla 4 se presentan diferentes modelos de estudios de aplicación de la PDT con PS acoplados a NP. Se muestran los principales resultados de estudios realizados en diferentes líneas celulares de cáncer (*in vitro*). La mayoría de estos estudios sugieren que existe un porcentaje de muerte celular igual o superior al 90% después de haber recibido

Tabla 4. Modelos de estudio de aplicación de la PDT con PS acoplados a NP

PS	NP	Modelo de estudio	Porcentaje de muerte celular	Dosis de luz
In vitro				
Fotofirina ⁸⁵	Complejos de micelas encapsuladas en dendrímeros de ftalocianina	Células de pulmón A-549	88%	80 J/cm ²
HPPH ⁸⁶	NP de sílice	Células de colon Colon-26	95%	3.2 mW/cm ²
Pc-4 ⁴⁶	Pc-4 encapsulada en NP de sílice	Células melanoma A375 B16F10	92%	25 mW/cm ²
ZnPc ⁴⁵	PCL	Células de pulmón A-549	92%	100 J/cm ²
PHPP ⁸⁷	NP de magnetita (Fe ₃ O ₄)	Células de colon SW480	40%	4.35 J/cm ²
Meso-tetrafenilo porpholactol ⁸⁸	Encapsulado con PLGA	Células de glioblastoma	95%	42 mW/cm ²
Ce6 ⁸⁹	NP de albúmina	Células de cáncer colorrectal HT29	90%	6 J/cm ²
	NP magnéticas ⁹⁰	Células de cáncer gástrico MGC803	80%	30 mW/cm ²
PpIX ^{91,92}	AuNP	Células de CaCU HeLa	92%	64.23 J/cm ²
In vivo				
PS	NP	Modelo de estudio in vivo	Modelo de estudio in vivo	
Zinc Ftalocianina ³⁵	Encapsulado con PLGA	Ratones atímicos con tumores implantados	Disminución del tamaño del tumor en comparación con los controles después de la PDT	
Ce6 ⁸⁹	NP de albúmina (Ce6-HSA-NP)	Ratones atímicos con tumores implantados con células HT-29	Disminución significativa del tamaño del tumor; hubo una alta acumulación del conjugado en el sitio del tumor. Efectos secundarios con daños al hígado	
Ce6 ⁹³	Nanorods de oro	Ratones atímicos con tumores implantados	Disminución del tumor después de la PDT seguida de la PTT. Tratamiento sinérgico	
Pc-4 ^{82,84}	AuNP	Ratones atímicos con tumores implantados con células de glioma (9L)	No se observaron efectos secundarios con el conjugado. Se encontró una disminución del tumor y una penetración eficiente del fármaco en el tumor	
Ensayos clínicos				
PS	NP	Pacientes	Fase ensayo	Observaciones
Pc-4 ⁹⁴	Pc-4 encapsulada en NP de sílice	Pacientes con linfoma no Hodgkin en estadio IA-IIA	Fase I	Captura de pacientes

PCL: poli-ε-capro-lactona; PHPP: 2,7,12,18-tetrametilo-3,8-di(1-propoxietilo)-13,17-bis-(3-hidroxipropilo)porfirina; Ce6: clorina e6; PTT: terapia fototérmica.

PDT en comparación con los controles. Se presentan los resultados de estudios *in vivo* realizados en ratones atímicos con tumores implantados: se han encontrado efectos sorprendentes con la PDT logrando una disminución del tamaño de los tumores o incluso

la ablación del tumor en tratamientos combinados con terapia térmica y PDT. Finalmente, se reporta el comienzo de un ensayo clínico en pacientes con linfoma utilizando como PS Pc-4 encapsulada en NP de sílice.

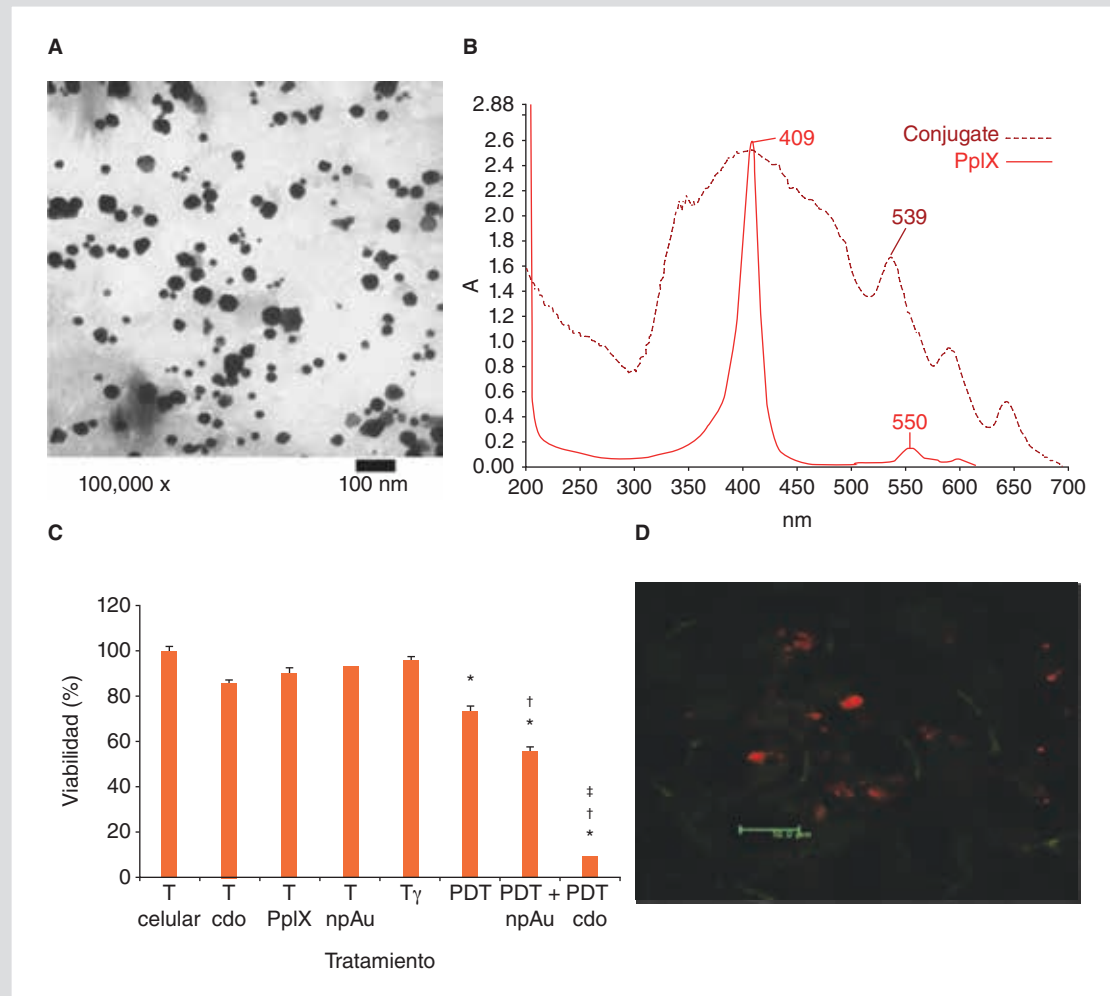


Figura 3. Desarrollo de AuNP acopladas al PS PpIX en México. **A:** micrografía del conjugado tomada por TEM. **B:** espectro de absorción de la PpIX en la línea roja y espectro de absorción del conjugado en la azul. **C:** tratamiento con PDT en células HeLa con PpIX y con el conjugado. **D:** colocalización del conjugado en las células HeLa (imágenes tomadas con permiso de los autores)¹⁰¹.

Desarrollo de NP acopladas a PS en México

En México existen varias instituciones adscritas a diferentes centros de investigación que trabajan con nanotecnología y nanociencia. Diferentes grupos están en desarrollando NP acopladas a PS para la PDT. El primer trabajo publicado en México de NP combinadas con la PDT lo realizó nuestro grupo de trabajo: probamos que el uso de la PDT acoplada a AuNP incrementaba el porcentaje de muerte celular en células de carcinoma cervicouterino C33-A del 50% con PDT convencional al 70% con PDT utilizando el conjugado de NP^{95,96}.

Se caracterizaron estas NP y se determinó la difusividad térmica por espectroscopia de lente térmica (TLS) del PS, la PpIX, en solución mezclada con AuNP a diferentes concentraciones. Los resultados mostraron que este valor aumentaba proporcionalmente con la concentración de las NP debido a la fuerte interacción electrostática entre la PpIX y las NP, favoreciendo el aumento de la intensidad del pico de absorción de luz, así como la transferencia de calor entre el PS y las NP⁹⁷. Esto se demostró en medios de cultivo que contenían AuNP, en los cuales incrementó la difusividad térmica en comparación con el control⁹⁸.

Por otro lado, la evaluación del tiempo de relajación no radiactiva (NRRT) *in vitro* de la PpIX en combinación

con AuNP se realizó con espectroscopia fotoacústica (PAS), encontrando un valor de la señal NRRT de la PpIX con AuNP mayor al valor medio de la PpIX estándar. Se demostró que el tiempo de relajación concordaba con la vida útil del estado triplete de las porfirinas usadas en la PDT⁹⁸. Además, se observó un pico de absorción máxima a 404 nm en un rango de frecuencia de 17-80 Hz⁹⁹. Esto llevó a proponer la síntesis de AuNP acopladas a PpIX, un conjugado llamado AuNP-PpIX por el método de coloides mono-dispersos de Maldonado, et al. En 2010⁹¹, se obtuvieron NP con un diámetro de 25 nm caracterizadas por microscopia electrónica de transmisión (TEM)^{91,100} (Fig. 3 A). Se encontró que la PpIX tenía un pico de absorción a 409 nm y uno secundario a 550 nm, mientras que el conjugado presentaba un pico ancho principal a 409 nm y uno secundario a 620 nm¹⁰⁰ (Fig. 3 B), característica muy deseable en todos los nanobiosistemas diseñados para una futura aplicación en el diagnóstico del cáncer.

Al aplicar la PDT en las células de cáncer cervicouterino (HeLa) se encontró que había un incremento significativo de la efectividad utilizando el conjugado como PS, en comparación con la efectividad obtenida al aplicar la PDT clásica (con PpIX) (Fig. 3 C). En las células HeLa al aplicar la PDT con PpIX + NP se obtuvo una mayor efectividad (45% de mortalidad) con respecto al tratamiento con la PDT clásica (27% de mortalidad), pero al emplear el conjugado como PS se alcanzó una muerte celular del 91%⁹¹.

En 2012, Roblero-Bartolón, et al. demostraron que las AuNP-PpIX se acumulan en el núcleo y el citoplasma de las células HeLa, y no tienen afinidad por la mitocondria¹⁰¹. En la figura 3 D se muestra la fluorescencia que indica la localización intracelular del conjugado en células HeLa por microscopia confocal. Nuestro grupo se ha integrado de forma interdisciplinaria en el diseño, síntesis y caracterización de AuNP acopladas a la PpIX. Por otro lado, Eshghi, et al., en 2013, publicaron la síntesis de un conjugado semejante al nuestro, de AuNP acopladas a PpIX (GNP), pero de un diámetro de 7 nm. Encontraron que el conjugado tenía un pico de absorción de 630 nm y alta eficiencia para la producción de ROS. El GNP demostró ser un eficiente PS para la PDT en la línea celular HeLa. El efecto de la toxicidad inducida por el conjugado fue comparado con los experimentos control, y se encontró un porcentaje de muerte celular del 92% en las líneas tratadas, lo que sugiere que el conjugado de PpIX-GNP es un excelente candidato para la PDT⁹². Esto indica el

potencial que tienen los nanoconjugados de oro y PS en la optimización de la PDT.

Otro grupo de trabajo en México se encuentra en la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) y está dirigido por la Dra. Tessy López. Este grupo ha publicado la síntesis de NP de dióxido de titanio (TiO₂) acopladas con el PS zinc-ftalocianina (ZnPc). El conjugado fue estable a temperaturas altas de 250 °C, y el efecto fotodinámico se probó en cuatro líneas celulares: células epiteliales de mono (Vero), células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2), células de leucemia aguda monocítica (THP-1) y células de un cultivo primario de fibroblastos derivados de humano (HDF). Demostraron que el conjugado se localizaba preferentemente en los orgánulos como las mitocondrias y los lisosomas, lo cual podría sugerir el mecanismo de muerte celular por apoptosis después de la PDT. Además, en este trabajo se encontró que la línea celular HepG2 fue sensible a la PDT, induciéndose un porcentaje de muerte celular de hasta el 90%¹⁰².

Conclusiones y perspectivas

Es importante observar que en los últimos 35 años miles de pacientes han sido tratados con la PDT en el mundo. El uso de esta terapia ha ido en aumento, pero, aunque podemos observar que la PDT para enfermedades como la degeneración macular, el cáncer de piel y el esófago de Barret ya está bien establecida y aprobada por la FDA, a nivel internacional su uso aún resulta marginal. Esto puede deberse en parte a los siguientes factores relacionados con los PS: la capacidad de absorción de luz se encuentra en las regiones espectrales visibles por debajo de 600 nm, lo cual obstaculiza la penetración en los tejidos; la preparación de formulaciones que permitan la administración parenteral es compleja debido a que la mayoría de los PS son hidrófobos, y la selectividad para la acumulación en tejidos enfermos a menudo no es suficiente para el uso clínico. Esto dificulta la aceptación de la PDT, porque es una terapia personalizada, es decir, dependiendo del tipo de tumor se tienen que ajustar variables como tipo y dosis del PS, longitud de onda a irradiar, tipo de tejido (si está más o menos irrigado), intervalo de tiempo entre la administración del PS y la irradiación (intervalo fármaco-luz) y concentración de oxígeno en el tejido a tratar. Por todo esto, las NP ofrecen soluciones para mejorar la aplicación de la PDT, favorecen las propiedades de los PS confiriéndoles propiedades de carácter hidrófilo y

el tamaño apropiado para la orientación a los tejidos tumorales, aumentando la permeabilidad, el efecto de retención y la especificidad, esta última con el uso de biomarcadores como anticuerpos y péptidos. Además, permiten la activación de luz de baja energía, lo cual permitiría penetrar en los tejidos.

Las propiedades físicas y químicas de las NP las convierten en una herramienta útil en terapias contra el cáncer. Varios investigadores se han centrado en buscar estrategias para incrementar la eficiencia de la PDT, y las NP ofrecen esa posibilidad, ya que se ha visto que existe una transferencia energética entre las NP y el PS siempre y cuando ambos se encuentren a una distancia menor o igual a 10 nm. Para este fin se han empleado NP de ZnO, Au y Fe₃O₄, y PS, principalmente porfirinas y ftalocianinas. Algunas ventajas que ofrece el uso de las NP en la PDT es que se evita la dispersión del PS remanente hacia otras partes del cuerpo, disminuyendo la fotosensibilidad; otra ventaja es que aumenta la capacidad de *quantum* del PS utilizado, incrementando la eficiencia de la terapia.

La aplicación de la PDT utilizando conjugados de NP con PS ayuda a mejorar significativamente la eficiencia de dicha terapia. Estos resultados son alentadores y nos llevan a la búsqueda de aquellos aspectos que hagan posible incrementar aún más la efectividad de la terapia hasta lograr el 100% de eliminación de células cancerosas, así como a mejorar la PDT como método de diagnóstico, de tal manera que permita detectar el cáncer en etapas tempranas de la enfermedad para mejorar las expectativas del paciente. Para ello es necesario realizar más estudios para asegurar que no existan efectos secundarios adversos que no hayan sido reportados hasta la fecha en los modelos *in vivo*.

La PDT ha sido adoptada como una terapia emergente para algunas enfermedades en EE.UU., la Comunidad Europea, Inglaterra, Canadá, Rusia, Japón, Corea del Sur y países de América Latina como Brasil, Argentina, Chile, México, Venezuela, San José, Costa Rica, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Panamá, República Dominicana, El Salvador y Trinidad y Tobago. Consideramos que la PDT combinada con la nanotecnología pronto estará al alcance de todos como una terapia establecida más que experimental.

Agradecimientos

Gabriela Victoria Roblero-Bartolón fue becaria del CONACyT con la beca n.º 304757 durante la realización

del presente trabajo. Eva Ramón-Gallegos es miembro del SNI, becaria EDI y COFAA.

Bibliografía

1. Dothager RS, Piwnica-Worms D. Nano in cancer: linking chemistry, biology, and clinical applications in vivo. *Cancer Res.* 2011; 71(17):5611-5.
2. Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(3):161-71.
3. Sinha R, Kim GJ, Nie S, Shin DM. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(8):1909-17.
4. Ding H, Mora R, Gao J, Sumer BD. Characterization and optimization of mTHPP nanoparticles for photodynamic therapy of head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2011;145(4):612-7.
5. Praetorius NP, Mandal TK. Engineered nanoparticles in cancer therapy. *Recent Pat Drug Deliv Formul.* 2007;1(1):37-51.
6. Mrózek E, Rhoades CA, Allen J, Hade EM, Shapiro CL. Phase I trial of liposomal encapsulated doxorubicin (Myocet; D-99) and weekly docetaxel in advanced breast cancer patients. *Ann Oncol.* 2005; 16(7):1087-93.
7. Jain KK. Advances in the field of nanooncology. *BMC Med.* 2010;8:83.
8. Yu MK, Park J, Jon S. Targeting strategies for multifunctional nanoparticles in cancer imaging and therapy. *Theranostics.* 2012;2(1):3-44.
9. Peer D KJ, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol.* 2007; 2(12):751-60.
10. Shi J, Xiao Z, Kamaly N, Farokhzad OC. Self-assembled targeted nanoparticles: evolution of technologies and bench to bedside translation. *Acc Chem Res.* 2011;44(10):1123-34.
11. Pastan I, Hassan R, Fitzgerald DJ, Kreitman RJ. Immunotoxin therapy of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(7):559-65.
12. Bechet D, Couleaud P, Frochot C, Viriot ML, Guillemin F, Barberi-Heyob M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends Biotechnol.* 2008;26(11):612-21.
13. Sinha R, Kim G, Nie S, Shin DM. Nanotechnology: a novel approach to drug delivery in cancer therapeutics. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(8): 1909-17.
14. Heidel JD, Davis ME. Clinical developments in nanotechnology for cancer therapy. *Pharmaceut Res.* 2011;28(2):187-99.
15. Harris TJ, Maltzahn G, Bhatia SN. Multifunctional Nanoparticles for Cancer Therapy. En: Amiji MM, ed. *Nanotechnology for Cancer Therapy.* Taylor & Francis Group L; 2007. p. 50-74.
16. Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev.* 2003;3(5):380-7.
17. Celli JP, Spring BQ, Rizvi I, et al. Imaging and Photodynamic Therapy: Mechanisms, Monitoring, and Optimization. *Chem Rev.* 2010;110 (5):2795-838.
18. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, et al. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(12):889-905.
19. Foote CS. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol.* 1991;54(5):659.
20. Hillemanns P, Pretty KU, Soergel P, et al. Efficacy and safety of hexamino-levulinic acid photodynamic therapy in patients with low-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Lasers Surg Med.* 2014;44(6):468-74.
21. Nann T. Nanoparticles in Photodynamic Therapy. *Nano Biomed Eng.* 2011;3(2):137-43.
22. Allison RR, Downie GH, Cuenca R, Hu XH, Childs CJH, Sibata CH. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagn Photodyn Ther.* 2004; 1(1):27-42.
23. Allison RR, Mota HC, Bagnato VS, Sibata CH. Bio-nanotechnology and photodynamic therapy-state of the art review. *Photodiagn Photodyn Ther.* 2008;5(1):19-28.
24. Paszko E, Ehrhardt C, Senge MO, Kelleher DP, Reynolds JV. Nanodrug applications in photodynamic therapy. *Photodiagn Photodyn Ther.* 2011;8(1):14-29.
25. Russell D. Photosensitizer-nanoparticle conjugates for targeted PDT. *Photodiagn Photodyn Ther.* 2011;8(2):158.
26. Derycke AS, de Witte PA. Liposomes for photodynamic therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004;56(1):17-30.
27. Li B, Moriyama EH, Li F, Jarvi MT, Allen C, Wilson BC. Diblock copolymer micelles deliver hydrophobic protoporphyrin IX for photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 2007;83(6):1505-12.
28. Nishiyama N, Morimoto Y, Jang WD, Kataoka K. Design and development of dendrimer photosensitizer-incorporated polymeric micelles for enhanced photodynamic therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61(4): 327-38.
29. van Nostrum CF. Polymeric micelles to deliver photosensitizers for photodynamic therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004;56 (1):9-16.

30. Zhang GD, Harada A, Nishiyama N, et al. Polyion complex micelles entrapping cationic dendrimer porphyrin: effective photosensitizer for photodynamic therapy of cancer. *J Control Release*. 2003;93(2):141-50.
31. Roy I, Ohulchansky TY, Pudavar HE et al. Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: a novel drug-carrier system for photodynamic therapy. *J Am Chem Soc*. 2003;125(26):7860-5.
32. Wieder ME, Hone DC, Cook MJ, Handsley MM, Gavrilovic J, Russell DA. Intracellular photodynamic therapy with photosensitizer-nanoparticle conjugates: cancer therapy using a 'Trojan horse'. *Photochem Photobiol Sci*. 2006;5(8):727-34.
33. Ricci-Junior E, Marchetti JM. Preparation, characterization, photocytotoxicity assay of PLGA nanoparticles containing zinc (II) phthalocyanine for photodynamic therapy use. *J Microencapsul*. 2006;23(5):523-38.
34. Olivo M, Bhuvaneshwari R, Lucky S, Dendukuri N, Soo-Ping Thong P. Targeted therapy of cancer using photodynamic therapy in combination with multi-faceted anti-tumor modalities. *Pharm J*. 2010;3(5):1507-29.
35. Qian J, Gharibi A, He S. Colloidal mesoporous silica nanoparticles with protoporphyrin IX encapsulated for photodynamic therapy. *J Biomed Opt*. 2009;14(1):014012.
36. Simon V, Devaux C, Darmon A, et al. Pp IX silica nanoparticles demonstrate differential interactions with in vitro tumor cell lines and in vivo mouse models of human cancers. *Photochem Photobiol*. 2010;86(1):213-22.
37. Brasseur N, Brault D, Couvreur P. Adsorption of hematoporphyrin onto polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: carrier capacity and drug release. *Int J Pharm*. 1991;70(1-2):129-35.
38. Oo MK, Yang X, Du H, Wang H. 5-aminolevulinic acid-conjugated gold nanoparticles for photodynamic therapy of cancer. *Nanomedicine*. 2008;3(6):777-86.
39. Yang SJ, Lin FH, Tsai HM, et al. Alginate-folic acid-modified chitosan nanoparticles for photodynamic detection of intestinal neoplasms. *Biomaterials*. 2011;32(8):2174-82.
40. Compagnin C, Bau L, Mognato M, et al. The cellular uptake of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin entrapped in organically modified silica nanoparticles is mediated by serum proteins. *Nanotechnology*. 2009;20(34):345101.
41. Gomes AJ, Lunardi CN, Tedesco AC. Characterization of biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles loaded with bacteriochlorophyll-a for photodynamic therapy. *Photomed Laser Surg*. 2007;25(5):428-35.
42. Lee SJ, Koo H, Jeong H, et al. Comparative study of photosensitizer loaded and conjugated glycol chitosan nanoparticles for cancer therapy. *J Control Release*. 2011;152(1):21-9.
43. Masilela N, Nyokong T. Conjugates of low-symmetry Ge, Sn and Ti carboxy phthalocyanines with glutathione capped gold nanoparticles: An investigation of photophysical behaviour. *J. Photochem. Photobiol A-Chem*. 2011;223(2):124-31.
44. Nombona N, Maduray K, Antunes E, Karsten A, Nyokong T. Synthesis of phthalocyanine conjugates with gold nanoparticles and liposomes for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 2012;107:35-44.
45. Master AM, Rodriguez ME, Kenney ME, Oleinick NL, Gupta AS. Delivery of the photosensitizer Pc 4 in PEG-PCL micelles for in vitro PDT studies. *J Pharm Sci*. 2010;99(5):2386-98.
46. Zhao B, Yin JJ, Bilski PJ, Chignell CF, Roberts JE, He YY. Enhanced photodynamic efficacy towards melanoma cells by encapsulation of Pc4 in silica nanoparticles. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009;241(2):163-72.
47. Fadel M, Kassab K, Fadeel DA. Zinc phthalocyanine-loaded PLGA biodegradable nanoparticles for photodynamic therapy in tumor-bearing mice. *Laser Med Sci*. 2010;25(2):283-72.
48. Ricci-Junior E, Marchetti JM. Zinc(II) phthalocyanine loaded PLGA nanoparticles for photodynamic therapy use. *Int J Pharm*. 2006;310(1-2):187-95.
49. Duygu Aydın Tekdaş MD, Hülya Yanık, Vefa Ahsen. Photodynamic therapy potential of thiol-stabilized CdTe quantum dot-group 3A phthalocyanine conjugates (QD-Pc). *Spectrochim Acta Mol Biomol Spectros*. 2012;93:313-20.
50. D'Souza S, Nyokong T. Synthesis and photophysical studies of CdTe quantum dot-monosubstituted zinc phthalocyanine conjugates. *Inorg Chim Acta*. 2010;367(1):173-81.
51. Salud CLyDCdeCdl. BIREME. [Internet] Consultado el 2014. Disponible en: <http://new.paho.org/bireme/>.
52. Médicas AdB. LILACS. Brasil, 1988. [Internet] Consultado el 2014. Disponible en: <http://lilacs.bvsalud.org/es/>.
53. (CONICYT). Scientific Electronic Library Online. Chile. [Internet] Consultado el 2014. Disponible en: <http://www.scielo.org/php/index.php>.
54. Elsevier. SCOPUS. [Internet] Consultado el 2014. Disponible en: <http://www.scopus.com/home.url?null>.
55. Elsevier. SCIENTIFIEDIRECT. [Internet] Consultado el 2014. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/>.
56. NCBI. PUBMED. [Internet] Consultado el 2014. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.
57. United States Patent and Trademark Office. Patent Full-Text Database. [Internet] Consultado el 2014. Disponible en: <www.patft.uspto.gov >.
58. Konan YN, Cerny R, Favet J, Berton M, Gurny R, Allemann E. Preparation and characterization of sterile sub-200 nm meso-tetra(4-hydroxyphenyl) porphyrin-loaded nanoparticles for photodynamic therapy. *Eur J Pharm Biopharm*. 2003;55(1):115-24.
59. Konan YN, Berton M, Gurny R, Allemann E. Enhanced photodynamic activity of meso-tetra(4-hydroxyphenyl)porphyrin by incorporation into sub-200 nm nanoparticles. *Eur J Pharm Sci*. 2003;18(3-4):241-9.
60. Prasad PN. Polymer science and technology for new generation photonics and biophotonics. *Curr Opin Solid State Mater Sci*. 2004;8(1):11-9.
61. Konan YN, Gurny R, Allemann E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol*. 2002;66(2):89-106.
62. Chatterjee DK, Fong LS, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008;60(15):1627-37.
63. Buchholz J, Kaser-Hotz B, Khan T, et al. Optimizing photodynamic therapy: in vivo pharmacokinetics of liposomal meta-(tetrahydroxyphenyl)chlorin in feline squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2005;11(20):7538-44.
64. Kiesslich T, Berlanda J, Plaetzer K, Krammer B, Berr F. Comparative characterization of the efficiency and cellular pharmacokinetics of Foscan- and Foslip-based photodynamic treatment in human biliary tract cancer cell lines. *Photochem Photobiol Sci*. 2007;6(6):619-27.
65. Lassalle HP, Dumas D, Grafe S, D'Hallewin MA, Guillemin F, Bezdetnaya L. Correlation between in vivo pharmacokinetics, intratumoral distribution and photodynamic efficiency of liposomal mTHPC. *J Control Release*. 2009;134(2):118-24.
66. Svensson J, Johansson A, Gräfe S, et al. Tumor selectivity at short times following systemic administration of a liposomal temoporfin formulation in a murine tumor model. *Photochem Photobiol*. 2007;83(5):1211-9.
67. Dragicevic-Curic N, Scheglmann D, Albrecht V, Fahr A. Development of liposomes containing ethanol for skin delivery of temoporfin: characterization and in vitro penetration studies. *Colloids Surf*. 2009;14(1):114-22.
68. D'Hallewin MA, Kochetkov D, Viry-Babel Y, et al. Photodynamic therapy with intratumoral administration of Lipid-Based mTHPC in a model of breast cancer recurrence. *Lasers Surg Med*. 2008;40(8):543-9.
69. Anderson CY, Freye K, Tubesing KA, et al. A comparative analysis of silicon phthalocyanine photosensitizers for in vivo photodynamic therapy of RIF-1 tumors in C3H mice. *Photochem Photobiol*. 1998;67(3):332-6.
70. Yang Y, Song W, Wang A, Zhu P, Fei J, Li J. Lipid coated mesoporous silica nanoparticles as photosensitive drug carriers. *Phys Chem Chem Phys*. 2010;12(17):4418-22.
71. Demberelnyamba D, Ariunaa M, Shim YK. Newly synthesized water soluble cholinium-purpurin photosensitizers and their stabilized gold nanoparticles as promising anticancer agents. *Int J Mol Sci*. 2008;9(5):864-71.
72. Kuruppuarachchi M, Savoie H, Lowry A, Alonso C, Boyle RW. Polyacrylamide nanoparticles as a delivery system in photodynamic therapy. *Mol Pharmacol*. 2011;8(3):920-31.
73. Pathak P, Katiyar VK. Multi-Functional Nanoparticles and Their Role in Cancer Drug Delivery – A Review. *J Nanopart Online*. 2007;3:1-17.
74. Magadala P, Vlerken LE, Shahiwala A, Amiji MM. Multifunctional Polymeric Nanosystems for Tumor-Targeted Delivery Multifunctional Pharmaceutical Nanocarriers. En: Torchilin V, ed. Volume 4. Nueva York: Springer; 2008. p. 33-66.
75. Gary-Bobo M, Hocine O, Brevet D, et al. Cancer therapy improvement with mesoporous silica nanoparticles combining targeting, drug delivery and PDT. *Int J Pharm*. 2011;423(2):509-15.
76. Hocine O, Gary-Bobo M, Brevet D, et al. Silicalites and Mesoporous Silica Nanoparticles for photodynamic therapy. *Int J Pharm*. 2010;402(2):221-30.
77. Gary-Bobo M, Hocine O, Brevet D, et al. Cancer therapy improvement with mesoporous silica nanoparticles combining targeting, drug delivery and PDT. *Int J Pharm*. 2012;423(2):509-15.
78. Bakalova R, Ohba H, Zhelev Z, Ishikawa M, Baba Y. Quantum dots as photosensitizers? *Nat Biotech*. 2004;22(11):1360-1.
79. Geszke-Moritz M, Moritz M. Quantum dots as versatile probes in medical sciences: synthesis, modification and properties. *Mater Sci Eng Mater Biol Appl*. 2013;33(3):1008-21.
80. Rico-Moctezuma A, Vilchis-Nestor AR, Sanchez-Mendieta V. Biosíntesis de nanopartículas de oro mediante el extracto de *Opuntia ficus-indica*. *Superficies y Vacío*. 2010;23(S):94-7.
81. Cai W, Gao T, Hong H, Sun J. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. *Nanotechnol Sci Appl*. 2008;1(1):17-32.
82. Cheng Y, A CS, Meyers JD, Panagopoulos I, Fei B, Burda C. Highly efficient drug delivery with gold nanoparticle vectors for in vivo photodynamic therapy of cancer. *J Am Chem Soc*. 2008;130(32):10643-7.
83. Jelveh S, Chithrani DB. Gold nanostructures as a platform for combinational therapy in future cancer therapeutics. *Cancers (Basel)*. 2011;3(1):1081-110.

84. Cheng Y, Meyers JD, Broome AM, Kenney ME, Basilion JP, Burda C. Deep penetration of a PDT drug into tumors by noncovalent drug-gold nanoparticle conjugates. *J Am Chem Soc.* 2011;133(8):2583-91.
85. Nishiyama N, Nakagishi Y, Morimoto Y, et al. Enhanced photodynamic cancer treatment by supramolecular nanocarriers charged with dendrimer phthalocyanine. *J Control Release.* 2009;133(3):245-51.
86. Ohulchanskyy TY, Roy I, Goswami LN, et al. Organically modified silica nanoparticles with covalently incorporated photosensitizer for photodynamic therapy of cancer. *Nano Lett.* 2007; 7(9):2835-42.
87. Chen ZL, Sun Y, Huang P, Yang XX, Zhou XP. Studies on Preparation of Photosensitizer Loaded Magnetic Silica Nanoparticles and Their Anti-Tumor Effects for Targeting Photodynamic Therapy. *Nanoscale Res Lett.* 2009;4(5):400-8.
88. McCarthy JR, Perez JM, Brückner C, Weissleder R. Polymeric nanoparticle preparation that eradicates tumors. *Nano Lett.* 2005;5(12):2552-6.
89. Jeong H, Huh M, Lee SJ, et al. Photosensitizer-conjugated human serum albumin nanoparticles for effective photodynamic therapy. *Theranostics.* 2011;1:230-9.
90. Huang P, Lin J, Wang X, et al. Light-triggered theranostics based on photosensitizer-conjugated carbon dots for simultaneous enhanced-fluorescence imaging and photodynamic therapy. *Adv Mater.* 2012;24(37):5104-10.
91. Maldonado-Alvarado E. Determinación de la actividad biológica de nanopartículas de oro acopladas a la protoporfirina IX en la terapia fotodinámica. Tesis dirigida por Ramón-Gallegos E. México, D.F.: Instituto Politécnico Nacional; 2010. p. 57.
92. Eshghi H, Sazgarnia A, Rahimizadeh M, Attaran N, Bakavoli M, Soudmand S. Protoporphyrin IX-gold nanoparticle conjugates as an efficient photosensitizer in cervical cancer therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2013;10(3):304-12.
93. Kim JY, Choi WI, Kim M, Tae G. Tumor-targeting nanogel that can function independently for both photodynamic and photothermal therapy and its synergy from the procedure of PDT followed by PTT. *J Control Release.* 2013;171(2):113-21.
94. Cooper K. Silicon Phthalocyanine 4 and Photodynamic Therapy in Stage IA-IIA Cutaneous T-Cell Non-Hodgkin Lymphoma. En: *ClinicalTrials.gov*, 2013.
95. Ramón-Gallegos E. Eficiencia de la terapia fotodinámica utilizando nanopartículas en la eliminación de células cancerosas. Proyecto n.º 20070480, financiado por la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional. México; 2007. [Internet] Disponible en: http://www.sappi.ipn.mx/cgpi/informes/reporteHTML.jsp?anho_inicio=2007&folio=480&idp=228&cvelInfo=4842&tipo_inf=F.
96. Maldonado-Alvarado E, Ramón-Gallegos E, Tánori-Córdova J, et al. Efficiency Of The Photodynamic Therapy Using Gold Nanoparticles (npAu) And PpIX Induced And Not Induced. *AIP Conf Proc.* 2008;1032:295-8.
97. Gutiérrez-Fuentes R, Sánchez-Ramírez J, Jiménez-Pérez J, Pescador-Rojas J, Ramón-Gallegos E, Cruz-Orea A. Thermal Diffusivity Determination of Protoporphyrin IX Solution Mixed with Gold Metallic Nanoparticles. *Int J Thermophys.* 2007;28(3):1048-55.
98. Jiménez-Pérez JL, Fuentes RG, Alvarado EM, et al. Enhancement of the thermal transport in a culture medium with Au nanoparticles. *Appl Surf Sci.* 2008;255(3):701-2.
99. Jiménez-Pérez JL, Cruz-Orea A, Alvarado EM, Ramírez JFS, Ramón-Gallegos E, Mendoza-Alvarez JG. Monitoring the non-radiative relaxation time of PpIX solution with Au nanoparticles using Photoacoustic Spectroscopy. *Appl Surf Sci.* 2008;255(3):643-5.
100. Maldonado-Alvarado E, Ramón-Gallegos E, Jiménez Pérez J, Cruz-Orea A, Hernández Rosas J. Photothermal Techniques Applied to the Thermal Characterization of L-Cysteine Nanofluids. *Int J Thermophys.* 2012; 27(3):1-7.
101. Roblero-Bartolón G, Maldonado-Alvarado E, Galván-Mendoza JI, Ramón-Gallegos E. Intracellular localization analysis of npAu-PpIX in HeLa cells using specific dyes and confocal microscopy. In: *Physics AIO (ed).* AIP Conference Proceedings. 2012;137-9.
102. Lopez T, Ortiz E, Alvarez M, et al. Study of the stabilization of zinc phthalocyanine in sol-gel TiO2 for photodynamic therapy applications. *Nanomedicine.* 2010;6(6):777-85.