

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

TESIS DOCTORAL 2025

# FOTOINMUNOTERAPIA

EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA HER2 POSITIVO

ANA MARÍA PIQUERAS HINOJO

DIRECTORES:

Joan Francesc Julián Ibáñez

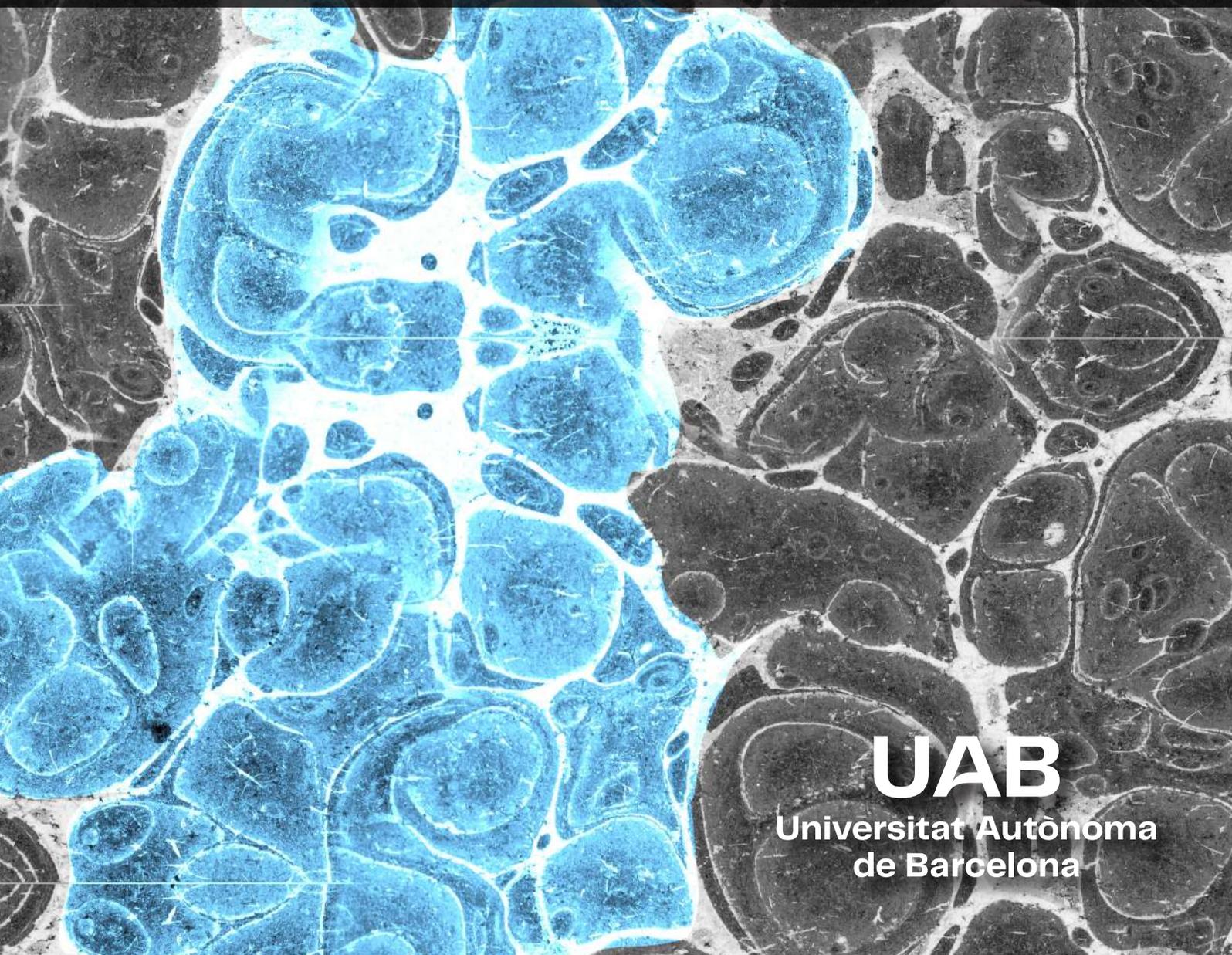
Santiago Nonell Marrugat

Lidia Blay Aulina

TUTOR:

Joan Francesc Julián Ibáñez

Programa de Doctorado en Cirugía  
y Ciencias Morfológicas  
Departamento de Cirugía  
Barcelona, 2025



**UAB**

Universitat Autònoma  
de Barcelona





# **FOTOINMUNOTERAPIA EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA HER2 POSITIVO**

Tesis presentada por

**Ana Maria Piqueras Hinojo**

Para optar por el grado académico de Doctora

Bajo la dirección de:

**Joan Francesc Julián Ibáñez**

**Santiago Nonell Marrugat**

**Lidia Blay Aulina**

Y tutorizada por:

**Joan Francesc Julián Ibáñez**

**Programa de Doctorado en Cirugía y Ciencias Morfológicas**

**Departamento de Cirugía**

**Barcelona, 2025**



# AGRADECIMIENTOS

Esta tesis me ha acompañado durante diferentes etapas de mi vida, y echando la vista atrás, en cada una de ellas encuentro a personas a las que estar inmensamente agradecida. Mi mayor agradecimiento es para aquellos que han estado conmigo en todas ellas, los constantes.

Al Dr Joan Francesc Julian, jefe de servicio, tutor y director de esta tesis y, sobre todo, mentor. Gracias por enseñarme el valor de la generosidad, en el trabajo y en la vida, y por haberme contagiado ese entusiasmo por querer ir más allá de lo que a veces, erróneamente, consideramos nuestros límites. Misión, visión y valores. Sin todo ello, este trabajo no habría sido posible.

A la Dra Lidia Blay, directora de tesis, tutora, amiga. Gracias por haber sido mi guía y referente desde mi primera apendicectomía laparoscópica, pasando por mi inolvidable primera visita al estabulario del CMCiB, hasta el día de hoy. Gracias por enseñarme que la profesionalidad y la sensibilidad pueden y deben ir de la mano.

Al Dr Santi Nonell, gracias por abrirme la puerta a una disciplina que parecía muy lejana a la mía y de la que hoy también me siento parte. Gracias por hacerme fácil lo difícil.

Una de las principales dificultades para la realización de una tesis, es la logística, y eso cuesta mucho plasmarlo en papel. Aunque podría ser un apartado del Material y Métodos, como creo que no acaba de encajar entre ratones y revisiones, aprovecho este espacio para agradecer a todos aquellos que estuvieron haciendo el trabajo asistencial mientras yo estaba experimentando.

Gracias a mis compañeros de residencia, Albert, Andrea, Iva, Edward, Carlota, Marta, Sara, Clara, Laura, Cristina, Christian, Anna, Dani, Rosa, Carla, Aleix y Celia. Gracias por la buena predisposición, el apoyo logístico y moral, y por haberos adaptado siempre que ha sido necesario a cambios organizativos de última hora. Y a mi coR, Laura, gracias por haber sido la mejor compañera y amiga que hubiera podido encontrar en este camino y en todos los que hemos recorrido y recorreremos juntas.

A mis compañeros de la UTCU: Protti, Enrico y Esther. Gracias por ser el mejor equipo con quien compartir la montaña rusa de emociones que conlleva la Cirugía de Urgencias.

Gracias también al Dr Jose Balibrea, nuestro jefe clínico, por escucharme, entenderme y asesorarme siempre que lo he necesitado.

A mis compañeros adjuntos, residentes y secretarios del Servicio de Cirugía, gracias a todos.

Otra gran dificultad para realizar un proyecto de tesis, es que en ocasiones abarca áreas de conocimiento que se salen de nuestra zona de confort, y esto puede suponer todo un reto. En mi caso me siento profundamente agradecida de haberme podido rodear de los mejores.

Gracias a la Dra Mireia Jordà por haber complementado este camino, y al Dr Roger Bresolí, por sus aportaciones fotoquímicas.

Gracias al equipo del CMCiB, a Sara Capdevila, Rosa Ampudia, Sergi Sunyé y el resto del equipo, tanto por su colaboración metodológica como por sus enseñanzas en experimentación animal. Como ya menciono en el apartado de metodología “Todos los procedimientos se realizaron conforme a la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio”, y aunque si bien es cierto que ningún animal sufrió durante los experimentos, 43 ratones fueron sacrificados para realizar esta tesis. Me gustaría agradecer aquí su contribución en los avances científicos que de ella han derivado.

Decía Virginia Woolf que para escribir novelas, una mujer debe tener dinero y una habitación propia. Nos quería decir, en verdad, que para podernos dedicar a escribir sobre temas fuera de lo cotidiano, debemos tener nuestras necesidades cotidianas cubiertas. No podría estar más de acuerdo. Gracias a mis constantes, a los que han estado conmigo en todas las etapas de este proyecto, he podido dedicarme a él.

Gracias a mis amigos y a mi familia, a mi madre, a mi hermano Alejandro y a Antonio, por tener siempre una habitación preparada para mí, al igual que mi familia en Dos Hermanas, mi abuela, mis tíos y mis primos. Y los que ya no están. Gracias por haber sido mi paracaídas mientras yo salía a volar.

Y finalmente, gracias a Joan, el constante adquirido, por haberse quedado viviendo en el ojo del huracán, disfrutando de las vistas y haciéndome disfrutar de ellas a mí también.

*“Thinking is my fighting”*

— Virginia Woolf,  
Carta a Ethel Smyth,  
25 de septiembre de 1940



# ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
<b>NIR</b>	Near Infrared / Infrarrojo cercano
<b>PIT</b>	Photoimmunotherapy / Fotoimmunoterapia
<b>PDT</b>	Photodynamic Therapy/Terapia fotodinámica
<b>PS</b>	Photosensitizer / Fotosensibilizador
<b>Tz</b>	Trastuzumab
<b>PIC</b>	Photoimmunoconjugate / Foto-inmunoconjugado
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species/Especies Reactivas de Oxígeno
<b>IVIS</b>	In Vivo Imaging System / Sistema de imagen in vivo
<b>TNM</b>	Tumor, Node, Metastasis / Clasificación de tumor, ganglios y metástasis
<b>ER</b>	Estrogen Receptor / Receptor de estrógenos
<b>PR</b>	Progesterone Receptor / Receptor de progesterona
<b>HER</b>	Human Epidermal growth factor Receptor / Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano
<b>EGFR</b>	Epidermal Growth Factor Receptor / Receptor del factor de crecimiento epidérmico
<b>CAF</b>	Cancer Associated Fibroblast / Fibroblasto asociado al cáncer
<b>FAP</b>	Fibroblast Activation Protein / Proteína de activación de fibroblastos
<b>CEA</b>	Carcinoembryonic Antigen / Antígeno carcinoembrionario
<b>CD206</b>	Macrophage Mannose Receptor/Receptor de manosa de macrófagos
<b>c-kit</b>	Proto-oncogene Receptor Tyrosine Kinase/Receptor tirosina quinasa de protooncogenes
<b>BLI</b>	Bioluminescence Imaging/Imagen por bioluminiscencia
<b>ICG</b>	Indocyanine Green / Verde de indocianina
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein / Proteína fluorescente verde
<b>SC</b>	Search Component / Componente de búsqueda
<b>PRISMA</b>	Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses / Directrices para revisiones sistemáticas y metaanálisis
<b>CAMARADES</b>	Collaborative Approach to Meta-Analysis and Review of Animal Data from Experimental Studies/Enfoque colaborativo para metaanálisis y revisión de datos animales en estudios experimentales
<b>SYRCLE</b>	Systematic Review Centre for Laboratory Animal Experimentation/Centro para Revisiones Sistemáticas en Experimentación Animal de Laboratorio



# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>5</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>9</b>
<b>RESUMEN / ABSTRACT</b> .....	<b>15</b>
RESUMEN .....	17
ABSTRACT .....	19
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>21</b>
<b>1.1. TERAPIA FOTODINÁMICA</b> .....	<b>23</b>
<b>1.1.1. INTRODUCCIÓN A LA TERAPIA FOTODINÁMICA</b> .....	<b>23</b>
<b>1.1.2. ACTIVACIÓN LUMÍNICA Y PROPIEDADES DEL FOTOSENSIBILIZADOR</b> .....	<b>23</b>
<b>1.1.3. EFECTOS CELULARES E INMUNOMODULACIÓN</b> .....	<b>24</b>
<b>1.1.4. APLICACIONES CLÍNICAS Y LIMITACIONES ESTRUCTURALES</b> .....	<b>24</b>
<b>1.2. FOTOINMUNOTERAPIA</b> .....	<b>25</b>
<b>1.2.1. FUNDAMENTOS Y MECANISMO DE ACCIÓN</b> .....	<b>25</b>
<b>1.2.2. ESPECIFICIDAD MOLECULAR: LIMITACIÓN TERAPÉUTICA Y VENTAJA INMUNOLÓGICA</b> .....	<b>26</b>
<b>1.2.3. EVIDENCIA EXPERIMENTAL Y CLÍNICA</b> .....	<b>26</b>
<b>1.3. CÁNCER DE MAMA</b> .....	<b>27</b>
<b>1.3.1. INTRODUCCIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA</b> .....	<b>27</b>
<b>1.3.2. CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA</b> .....	<b>27</b>
<b>1.3.3. TRATAMIENTO Y PRONÓSTICO</b> .....	<b>29</b>
<b>1.3.4. PRINCIPIOS DEL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO</b> .....	<b>30</b>
<b>1.3.5. CÁNCER DE MAMA HER2+</b> .....	<b>31</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO</b> .....	<b>33</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1. HIPÓTESIS PRINCIPAL</b> .....	<b>39</b>
<b>3.2. HIPÓTESIS SECUNDARIAS</b> .....	<b>39</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>41</b>
<b>4.1. OBJETIVO PRINCIPAL</b> .....	<b>43</b>
<b>4.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS</b> .....	<b>43</b>

<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
<b>5.1. ESTUDIO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>47</b>
<b>5.1.1. CONTEXTUALIZACIÓN .....</b>	<b>47</b>
<b>5.1.2. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL FOTOINMUNOCONJUGADO TZ-IR700 .....</b>	<b>48</b>
<b>5.1.3. ESTUDIOS MECANÍSTICOS .....</b>	<b>49</b>
<b>5.1.4. ENSAYOS IN VITRO .....</b>	<b>49</b>
<b>5.1.5. ESTUDIO IN VIVO.....</b>	<b>51</b>
<b>5.1.5.1. MODELO ANIMAL Y TUMORAL .....</b>	<b>51</b>
<b>5.1.5.2. FOTOINMUNOTERAPIA IN VIVO .....</b>	<b>52</b>
<b>5.1.5.3. ESTUDIOS DE FLUORESCENCIA IN VIVO .....</b>	<b>52</b>
<b>5.1.5.4. ANÁLISIS HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO .....</b>	<b>53</b>
<b>5.1.6. ESTUDIOS PILOTO.....</b>	<b>54</b>
<b>5.1.6.1. PRIMER ESTUDIO PILOTO .....</b>	<b>54</b>
<b>5.1.6.2. SEGUNDO ESTUDIO PILOTO .....</b>	<b>57</b>
<b>5.1.6.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PRELIMINAR .....</b>	<b>59</b>
<b>5.2. REVISIÓN SISTEMÁTICA .....</b>	<b>61</b>
<b>5.2.1. CONTEXTUALIZACIÓN .....</b>	<b>61</b>
<b>5.2.2. ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA Y CRITERIOS DE INCLUSIÓN .....</b>	<b>61</b>
<b>5.2.3. SELECCIÓN DE ESTUDIOS Y EXTRACCIÓN DE DATOS .....</b>	<b>63</b>
<b>5.2.4. ANÁLISIS DE CALIDAD Y DEL RIESGO DE SESGO .....</b>	<b>64</b>
<b>5.2.5. SÍNTESIS DE DATOS.....</b>	<b>64</b>
<b>5.3. FUENTES DE FINANCIACIÓN .....</b>	<b>65</b>
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>67</b>
<b>6.1. ESTUDIO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>69</b>
<b>6.1.1. EVALUACIÓN DEL EFECTO TERAPÉUTICO DEL TRATAMIENTO CON TZ-IR700 Y LUZ NIR .....</b>	<b>69</b>
<b>6.1.2. FLUORESCENCIA IN VIVO Y VISUALIZACIÓN TUMORAL .....</b>	<b>72</b>
<b>6.1.3. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO .....</b>	<b>73</b>
<b>6.1.4. ESTUDIOS DE FLUORESCENCIA CON CÁMARA DISEÑADA PARA CAPTACIÓN DE ICG .....</b>	<b>74</b>
<b>6.2. REVISIÓN SISTEMÁTICA.....</b>	<b>77</b>
<b>6.2.1. RESULTADOS GENERALES .....</b>	<b>77</b>
<b>6.2.2. RESULTADOS POR LOCALIZACIÓN ANATÓMICA .....</b>	<b>85</b>

<b>7. DISCUSIÓN .....</b>	<b>87</b>
<b>7.1. APLICACIÓN PRECLÍNICA DE LA NIR-PIT EN UN MODELO DE CANCER DE MAMA HER2+ RESISTENTE AL TRASTUZUMAB .....</b>	<b>89</b>
<b>7.2. PROYECCIÓN QUIRÚRGICA Y MADUREZ TRASLACIONAL .....</b>	<b>91</b>
<b>7.3. APLICABILIDAD DE LA NIR-PIT SEGÚN LOCALIZACIÓN TUMORAL .....</b>	<b>92</b>
<b>7.4. INTEGRACIÓN QUIRÚRGICA Y RETOS DE IMPLEMENTACIÓN .....</b>	<b>94</b>
<b>7.5. FORTALEZAS Y LIMITACIONES.....</b>	<b>96</b>
<b>7.6. PERSPECTIVA TRASLACIONAL, IMPACTO SOCIAL Y DE GÉNERO .....</b>	<b>97</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>99</b>
<b>9. LÍNEAS DE FUTURO .....</b>	<b>103</b>
<b>9.1. PROYECTO DE INNOVACIÓN: SNIPer .....</b>	<b>105</b>
<b>9.1.1. DEFINICIÓN .....</b>	<b>105</b>
<b>9.1.2. RECONOCIMIENTOS Y APOYO INSTITUCIONAL .....</b>	<b>106</b>
<b>9.1.2.1. “HEALTHCARE ENTREPRENEUR EXCHANGE PROGRAMME (HEEP)” .....</b>	<b>106</b>
<b>9.1.2.2. PROGRAMA “GROWINN” .....</b>	<b>107</b>
<b>9.1.2.3. PROGRAMA “DE LA CIÈNCIA AL MERCAT” .....</b>	<b>107</b>
<b>9.1.3. FINANCIACIÓN EXTERNA PARA EL PROYECTO SNIPer .....</b>	<b>108</b>
<b>9.1.4. NIVEL DE DESARROLLO ADQUIRIDO DEL PROYECTO SNIPer Y SIGUIENTES PASOS .</b>	<b>108</b>
<b>9.2. DIFUSIÓN NO ACADÉMICA E IMPACTO SOCIAL .....</b>	<b>109</b>
<b>10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>111</b>
<b>11. ANEXOS .....</b>	<b>123</b>
<b>11.1. APROBACIÓN DEL COMITÉ ÉTICO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL (CEEA) DEL INSTITUT GERMANS TRIAS I PUJOL (IGTP) .....</b>	<b>125</b>
<b>11.2. RESOLUCIÓN DE LA AUTORIZACIÓN DE PROYECTO DE EXPERIMENTACIÓN DE LA GENERALITAT DE CATALUNYA .....</b>	<b>126</b>
<b>11.3. INFORME DE EVALUACIÓN DEL PROYECTO POR LA COMISIÓN DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL COMO ÓRGANO HABILITADO POR LA GENERALITAT DE CATALUNYA .....</b>	<b>129</b>
<b>11.4. CAPACITACIÓN DEL EQUIPO EN EL DISEÑO DE PROYECTOS Y PROCEDIMIENTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL, REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS Y EUTANASIA .....</b>	<b>134</b>
<b>11.5. ARTÍCULO PUBLICADO DERIVADO DE LA INVESTIGACIÓN DE LA TESIS.....</b>	<b>137</b>
<b>11.6. PROTOCOLO A PRIORI REGISTRADO EN LA BASE DE DATOS PROSPERO .....</b>	<b>148</b>
<b>11.7. DIFUSIÓN NO ACADÉMICA: COBERTURA MEDIÁTICA DE LA INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>156</b>





**RESUMEN / ABSTRACT**



# RESUMEN

## Introducción

La fotoimmunoterapia activada por luz infrarroja cercana (NIR-PIT) es una estrategia terapéutica emergente que combina la especificidad de los anticuerpos monoclonales con la acción citotóxica y fluorescente de fotosensibilizadores. En el cáncer de mama HER2+, la resistencia al trastuzumab plantea una necesidad clínica no cubierta. Esta tesis evalúa la eficacia de la NIR-PIT en un modelo preclínico de cáncer de mama HER2+ resistente al trastuzumab, así como su aplicabilidad en cirugía oncológica.

## Métodos

Se empleó un modelo murino implantado con la línea celular HCC1954. Todos los animales recibieron dos dosis sistémicas de un fotoinmunoconjugado (PIC) trastuzumab-IR700; solo el grupo tratamiento fue irradiado con luz NIR. Se valoraron el diámetro tumoral máximo (MTD), la tolerancia clínica y la captación fluorescente in vivo (IVIS). En paralelo, se realizó una revisión sistemática sobre NIR-PIT en neoplasias de interés quirúrgico, conforme a las guías PRISMA (registro PROSPERO: CRD42024523715).

## Resultados

La NIR-PIT redujo significativamente el crecimiento tumoral respecto al grupo control, con diferencias significativas en la progresión del MTD tras cada sesión ( $p < 0,05$ ). No se observaron signos de toxicidad ni se alcanzaron criterios de eutanasia. El PIC mostró una acumulación preferente en el tumor, con fluorescencia superior a la de los tejidos adyacentes. La revisión identificó 24 estudios preclínicos que confirmaron la eficacia de la NIR-PIT sobre modelos murinos en neoplasias en cinco localizaciones anatómicas (mama, esófago, estómago, páncreas y colon) e identificó limitaciones comunes como el uso de modelos inmunodeficientes, la falta de estandarización terapéutica y barreras técnicas para su aplicación intraoperatoria. Se destacaron posibles aplicaciones futuras como el tratamiento de carcinomatosis peritoneal, el tratamiento de márgenes en resecciones complejas y el direccionamiento dual tumoral-estromal.

## Conclusiones

La NIR-PIT demostró eficacia y seguridad en un modelo de cáncer de mama HER2+ resistente al trastuzumab. La evidencia apoya su uso como herramienta adyuvante de precisión en cirugía oncológica. Su implementación clínica requerirá superar barreras técnicas y metodológicas, y avanzar hacia modelos inmunocompetentes y estudios traslacionales.



# ABSTRACT

## Introduction

Near-infrared photoimmunotherapy (NIR-PIT) is an emerging therapeutic strategy that combines the specificity of monoclonal antibodies with the cytotoxic and fluorescent effects of photosensitizers (PS). In HER2-positive breast cancer, resistance to trastuzumab remains a clinically significant challenge. This thesis evaluates the efficacy of NIR-PIT in a preclinical model of trastuzumab-resistant HER2+ breast cancer, as well as its applicability in oncologic surgery.

## Methods

A murine model implanted with the HCC1954 cell line was used. All animals received two systemic doses of a photoimmunoconjugate (PIC) consisting of trastuzumab-IR700; only the treatment group was exposed to NIR light. Tumor progression was assessed through maximum tumor diameter (MTD), clinical tolerance, and in vivo fluorescence imaging (IVIS). In parallel, a systematic review of NIR-PIT in surgically relevant neoplasms was conducted according to PRISMA guidelines (PROSPERO registration: CRD42024523715).

## Results

NIR-PIT significantly reduced tumour growth compared to controls, with statistically significant differences in MTD progression after each session ( $p < 0.05$ ). No signs of toxicity were observed and no euthanasia criteria were met. The PIC preferentially accumulated in tumour tissue, showing higher fluorescence than surrounding tissues. The systematic review identified 24 preclinical studies demonstrating NIR-PIT efficacy in murine models across five anatomical sites (breast, oesophagus, stomach, pancreas, colon), while also highlighting common limitations: use of immunodeficient models, lack of treatment standardisation, and technical barriers to intraoperative application. Potential future applications include treatment of peritoneal carcinomatosis, margin ablation in complex resections, and dual targeting of tumour and stroma.

## Conclusions

NIR-PIT demonstrated efficacy and safety in a clinically relevant model of trastuzumab-resistant HER2+ breast cancer. The evidence supports its use as a precision adjuvant tool in oncologic surgery. Clinical implementation will require overcoming technical and methodological barriers and advancing toward immunocompetent models and translational studies.



The background of the page is a marbled paper pattern. The top half is a vibrant teal color with a pattern of irregular, rounded shapes that resemble marbled paper or perhaps a microscopic view of certain biological tissues. The bottom half is a dark, almost black, pattern with similar rounded, irregular shapes, creating a high-contrast, textured effect. The overall appearance is that of a classic marbled book cover or endpaper.

# 1. INTRODUCCIÓN



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. TERAPIA FOTODINÁMICA

### 1.1.1. INTRODUCCIÓN A LA TERAPIA FOTODINÁMICA

La terapia fotodinámica (PDT, *Photodynamic Therapy*), es un tipo de tratamiento local en el que una molécula que actúa como fotosensibilizador (PS, *Photosensitizer*), al ser expuesta a una luz con una longitud de onda correspondiente a su banda de absorción y en presencia de oxígeno, genera tanto especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) citotóxicas, como fluorescencia. Dichas ROS, producen la muerte por estrés oxidativo de las células en las que se encuentra el fotosensibilizador a través de daños celulares irreparables, mediante mecanismos apoptóticos, necróticos o autofágicos, así como daños en la microvascularización y una reacción inflamatoria local.<sup>1,2</sup>

### 1.1.2. ACTIVACIÓN LUMÍNICA Y PROPIEDADES DEL FOTOSENSIBILIZADOR

Los PS más usados son estructuras tetrapirrólicas similares a la protoporfirina contenida en la hemoglobina, capaces de absorber luz con diferentes longitudes de onda de manera eficiente y convertir la energía lumínica en reacciones químicas.<sup>2,3</sup> Suelen tener un pico de absorción alta, entre 600 y 800 nanómetros (nm) (rojo a infrarrojo cercano – NIR, *Near Infrared*), ya que la absorción de fotones con longitudes de onda mayores a 800nm no proporciona suficiente energía para generar ROS, y la penetración en el tejido humano es mayor en agentes con absorbancia fuerte en el espectro NIR (como clorinas, bacterioclorinas y ftalocianinas).<sup>2</sup> La luz NIR es la que posee una mayor capacidad de penetrar los tejidos celulares humanos, la cual además es no ionizante, no daña el ADN celular y es inocua para las células en las que el PS no se encuentre presente.<sup>4</sup>

Por lo tanto, ni el PS, ni el estímulo lumínico, ni el oxígeno, son elementos citotóxicos *per se*; el efecto de la terapia fotodinámica viene dado de la combinación de todos ellos siguiendo una estrategia secuencial: administración del PS en el locus tumoral – estimulación lumínica del PS en presencia de oxígeno - citotoxicidad.

### 1.1.3. EFECTOS CELULARES E INMUNOMODULACIÓN

El efecto de la PDT va más allá de la fototoxicidad directa. El daño a la vascularización tumoral produce la liberación de moléculas pro-inflamatorias y la consecuente activación de la cascada inmune, tanto innata como adaptativa.<sup>5</sup> Por una parte, la PDT ha demostrado activar células T citotóxicas con especificidad tumoral capaces de eliminar células tumorales residuales distantes al tumor, fenómeno conocido como efecto abscopal. Este efecto puede acompañarse del desarrollo de memoria inmunológica antitumoral, capaz de prevenir las recurrencias.<sup>5</sup> Además, la generación de fluorescencia hace que la PDT pueda ser usada como elemento terapéutico.<sup>6-8</sup> Se trata, por tanto, de una modalidad terapéutica universal (la histología tumoral no modifica su eficacia), de aplicación local y con efecto inmunológico antitumoral sistémico, así como con propiedades fluorescentes de uso diagnóstico.

### 1.1.4. APLICACIONES CLÍNICAS Y LIMITACIONES ESTRUCTURALES

La facilidad para aplicar el PS de manera tópica en la piel, hace que la PDT sea ampliamente utilizada en el tratamiento de enfermedades cutáneas como la queratosis actínica o cáncer cutáneo no-melanoma de bajo riesgo, entre otras.<sup>9</sup> Los principales efectos adversos registrados de la PDT son reacciones cutáneas leves e hipersensibilidad a la exposición solar.<sup>10,11</sup>

Que la principal aplicación de la PDT sea en el campo de la Dermatología no se trata de un hecho arbitrario, ya que la limitación de la luz para penetrar los tejidos más allá de unos milímetros hace que el tratamiento de neoplasias en localizaciones distintas a la piel sea un reto clínico.<sup>12</sup> Esto se debe a que aunque la luz con una longitud de onda entre los 600 y 800 nm ha demostrado ser la óptima para la PDT, su penetración en los tejidos viene modificada también por la difusión, reflexión, transmisión o absorción de la luz por elementos como las diferentes estructuras celulares (núcleo, membrana), el agua o la hemoglobina y la melanina, que son tintes endógenos que absorben la luz en longitudes de onda más cortas.<sup>10,13-16</sup> Factores como la densidad y la potencia de la luz a administrar son también elementos a tener en cuenta, lo que hace que cada una de las aplicaciones de la PDT requiera una fuente de luz con unas características concretas.<sup>10</sup>

Otra de las limitaciones de la PDT es que es una terapia dependiente de la concentración molecular de oxígeno en los tejidos tumorales, frecuentemente carentes del mismo a causa del rápido crecimiento tisular y del consecuente aumento de las distancias de difusión.<sup>17</sup> Se trata, por tanto, de una terapia autolimitante, ya que a medida que se va destruyendo la vascularización tumoral, el efecto de la PDT va disminuyendo, de la misma manera que ocurre con fármacos como el carboplatino o la doxorubicina, quimioterápicos de uso frecuente.<sup>10,18,19</sup>

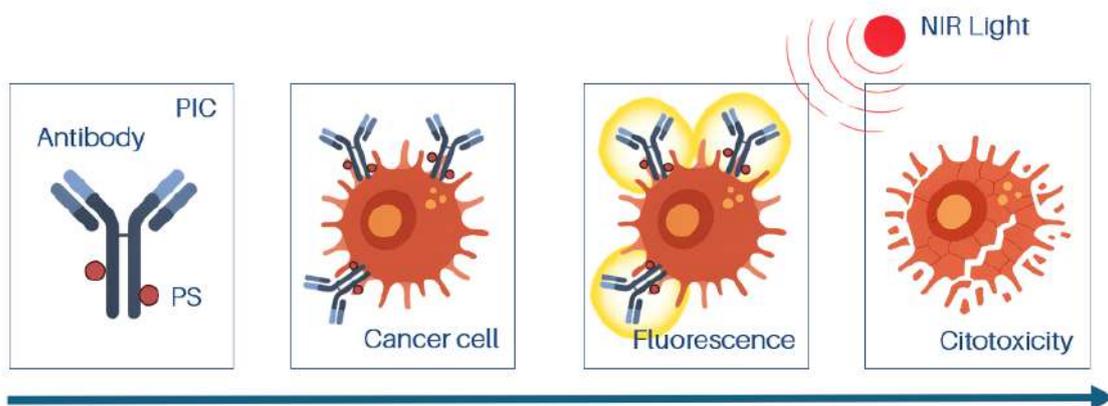
## 1.2. FOTOINMUNOTERAPIA

### 1.2.1. FUNDAMENTOS Y MECANISMO DE ACCIÓN

La fotoimmunoterapia (PIT, *Photoimmunotherapy*), es un tipo avanzado de PDT en el que el PS es transportado selectivamente hacia las células tumorales mediante su conjugación con anticuerpos monoclonales (mAb, *monoclonal antibody*), lo que da lugar a lo que se conoce como fotoinmunoconjugados (PIC, *Photoimmunoconjugates*).<sup>20</sup>

Los PIC se unirán selectivamente a receptores celulares de membrana específicos, en función del mAb que los conforme, y tras la exposición lumínica correspondiente, se producirá la muerte selectiva de las células en las que el PIC se encuentre unido (**Figura 1**).<sup>20</sup>

Dicha muerte celular se produce de manera precoz, aproximadamente 1 minuto tras la exposición a la luz, y aunque algunos estudios sugieren que los efectos fototóxicos se deben principalmente a cambios fotoinducidos irreversibles en la morfología de la membrana celular en relación con el receptor y el ligando, otros enfatizan el papel central del oxígeno singlete como mediador de fototoxicidad.<sup>4,21</sup> Por el contrario, las células adyacentes que no expresen el receptor, permanecerán inalteradas pese a la exposición lumínica.



**Figura 1.** Mecanismo de acción de la PIT. El PS se conjuga a un anticuerpo monoclonal formando un PIC, que se une de forma específica a receptores de membrana en células tumorales. Tras la exposición a luz NIR, el conjugado emite fluorescencia y desencadena un efecto citotóxico localizado.

### 1.2.2. ESPECIFICIDAD MOLECULAR: LIMITACIÓN TERAPÉUTICA Y VENTAJA INMUNOLÓGICA

La eficacia de la PIT depende de la expresión homogénea y sostenida del receptor diana en la superficie de las células tumorales, dado que su mecanismo de acción se basa en una alta especificidad molecular que limita el efecto citotóxico exclusivamente a aquellas células que expresan dicho receptor. En muchos tumores, dicha expresión puede ser heterogénea, tanto entre diferentes zonas del tumor como entre células de una misma población, lo que puede dar lugar a regiones no tratadas, recidiva precoz o selección clonal de células negativas para la diana terapéutica.<sup>22</sup>

Esta misma hiperespecificidad hace que la PIT presente un bajo perfil de toxicidad. De hecho, estudios del microambiente tumoral revelan que la PIT produce una maduración rápida de las células dendríticas inmaduras adyacentes a las células neoplásicas tratadas, lo que genera una reacción antitumoral en el huésped que resulta en la síntesis de CD8<sup>+</sup>T policlonales contra varios de los antígenos tumorales que se liberan, amplificando el efecto de la terapia.<sup>4</sup>

### 1.2.3. EVIDENCIA EXPERIMENTAL Y CLÍNICA

Uno de los PS más frecuentemente utilizados, aunque no el único, es el IRDye700DX (IR700), un derivado hidrosoluble de las ftalocianinas.<sup>4</sup> Su conjugación con diferentes mAb ha dado lugar a varios estudios preclínicos desde su descripción en 2011 por el grupo de H. Kobayashi, obteniendo todos ellos resultados favorables, principalmente respecto a la reducción de la velocidad de crecimiento tumoral, pero también en términos de supervivencia y recidiva.<sup>23-28</sup>

Pese a todo ello, las aplicaciones oncológicas no dermatológicas de la PIT, en la actualidad, son limitadas. En 2019 se realizó un primer ensayo clínico en humanos, que ya en fase 1/2 fue acelerado por la Food and Drug Administration (FDA), y que usa la combinación de IR700 con cetuximab (anti-EGFR) en el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello.<sup>29,30</sup> Dicho tratamiento ha sido aprobado para uso clínico en Japón,<sup>31</sup> y actualmente se está llevando a cabo un ensayo clínico internacional donde participan 8 instituciones de los Estados Unidos de América (EUA), 6 instituciones de la India y 3 instituciones de Taiwan.<sup>32,33</sup>

### 1.3. CÁNCER DE MAMA

#### 1.3.1. INTRODUCCIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA

Según Globocan, el cáncer de mama fue la neoplasia más diagnosticada a nivel mundial en 2022, con una tasa de incidencia ajustada por edad (TIAE) en personas de ambos sexos, en el grupo etario de 0 a 74 años, de 43,9 por cada 100 000 habitantes.<sup>34</sup>

Se trata también de la neoplasia más prevalente, con 1 871 979 casos diagnosticados a nivel mundial en 2022. La prevalencia es significativamente mayor en mujeres que en hombres, con una proporción estimada de 100:1.<sup>34</sup>

Es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres y la segunda causa de muerte por cáncer en ambos sexos, precedida únicamente por el cáncer de pulmón.<sup>34</sup> Se trata de una neoplasia cuya supervivencia se relaciona directamente con el grado de desarrollo de cada país, siendo significativamente menor en regiones menos desarrolladas; esta disparidad se debe a múltiples factores, como son los retrasos en el diagnóstico y la dificultad de acceso a tratamientos efectivos.<sup>35</sup> En España, gracias a la implementación de programas de cribado y la mejora en los tratamientos oncológicos, la mortalidad asociada al cáncer de mama ha disminuido desde los años 90, en contraposición al aumento objetivado en su incidencia.<sup>36,37</sup>

Por todo lo descrito anteriormente, el cáncer de mama se considera actualmente un problema de salud pública global, por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) lanzó en 2021 la *Global Breast Cancer Initiative*. Se trata de una campaña que pretende mejorar la supervivencia del cáncer de mama mediante tres pilares fundamentales: promoción de la salud, diagnóstico temprano y manejo integral de la enfermedad. El objetivo final de esta iniciativa es reducir la mortalidad por cáncer de mama en un 2,5% anual, lo que en 20 años podría salvar 2,5 millones de vidas.<sup>38</sup>

Todo ello resalta la trascendencia de toda mejora en la detección y manejo del cáncer de mama, ya que los beneficios obtenidos no solo afectan de manera directa a cada paciente tratada, sino que presentan un alto impacto socioeconómico.

#### 1.3.2. CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama se clasifica siguiendo el sistema anatómico TNM (“Tumor, Node, Metastasis”) del American Joint Committee on Cancer (AJCC), que en su octava edición actualizada en 2021 contempla tanto dichos factores anatómicos, como factores relacionados con la biología tumoral, en concreto los biomarcadores pronósticos del receptor de estrógenos (ER), el receptor de progesterona (PR), el receptor *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2* (HER2) y el Ki67.<sup>39</sup>

## 1. INTRODUCCIÓN

Los tumores ER/PR positivos son aquellos que presentan positividad para el receptor en más del 1% de las células tumorales, y pueden ser tributarios de tratamiento con hormonoterapia.<sup>40</sup> Esta positividad se relaciona con mejores resultados oncológicos, especialmente si existe para ambos receptores (tanto ER como PR).<sup>41</sup>

La sobreexpresión del receptor HER2, frecuentemente referida como positividad, se produce por la amplificación del gen HER2 y está presente en un 15-30% de los tumores de mama.<sup>42</sup> Se relaciona con un comportamiento tumoral agresivo y selecciona a las pacientes que podrían beneficiarse de tratamiento dirigido con trastuzumab, un anticuerpo monoclonal anti HER2 (ver **1.3.5 Cáncer de mama HER2+**).<sup>43</sup>

El Ki67 es un marcador de proliferación celular que posee valor pronóstico independiente y cuyo uso clínico se centra, según equipos de trabajo internacionales, en estimar grupos de buen pronóstico en tumores anatómicamente favorables (ER positivos, HER2 negativos), que pueden beneficiarse de no realizar quimioterapia adyuvante (ver **1.3.3. Tratamiento y Pronóstico**).<sup>44-46</sup>

En función de la expresión de los receptores mencionados, los tumores de mama se clasifican frecuentemente en subtipos luminales.

Los tumores Luminal A, aproximadamente el 40% de todos los tumores de mama, suelen presentar positividad para receptores hormonales (ER/PR), un bajo grado de proliferación y ausencia de sobreexpresión del receptor HER2.<sup>47,48</sup> Son el tipo de tumor de mama más común y el de mejor pronóstico.<sup>49-53</sup>

Los tumores Luminal B son algo menos frecuentes, un 20% de todos los tumores de mama, y suelen expresar, aunque en menor medida que los Luminal A, receptores hormonales. Tienen un mayor grado de proliferación y variabilidad en la sobreexpresión del receptor HER2. Tienen peor pronóstico que los Luminal A.<sup>53</sup>

Los tumores con sobreexpresión del receptor HER2, un 15-30% de los casos, suelen ser negativos para receptores hormonales y asocian un pronóstico peor al de los tumores Luminales.<sup>42,53</sup>

Los tumores negativos para receptores hormonales y sin sobreexpresión del receptor HER2 se conocen como triple negativos o de subtipo basal, corresponden a un 10-20% de todos los tumores de mama y es el subtipo que conlleva un peor pronóstico.<sup>54</sup>

Esta clasificación permite ajustar la estrategia terapéutica en los diferentes grupos pronósticos de pacientes, aunque se trata de un sistema complejo que requiere de una toma de decisiones compartida en Comité Multidisciplinar (Cirugía, Oncología Radioterápica, Oncología Médica, Radiología, Cirugía Plástica, Enfermería, Consejo Genético, Anatomía Patológica, Medicina Nuclear, Fisioterapia), cuya existencia *per se* ha demostrado disminuir la mortalidad por cáncer de mama.<sup>55,56</sup>

## 1. INTRODUCCIÓN

Pese a las múltiples posibles combinaciones de factores anatómicos y biológicos, la presencia o ausencia de metástasis divide al cáncer de mama en dos entidades con un manejo y pronóstico radicalmente distinto: el cáncer de mama metastásico y el no metastásico.

El cáncer de mama metastásico es una enfermedad incurable, aunque las mejoras en las terapias existentes han conseguido un aumento en la supervivencia. Revisiones de cohortes grandes en cáncer de mama metastásico como la de Taskindoust et al objetivan supervivencias globales (SG) de hasta 25 meses, siendo el subtipo triple negativo el de peor pronóstico.<sup>57</sup> Por tanto, los objetivos principales del tratamiento sistémico en estos casos son la prolongación de la supervivencia, el control sintomático y la mejora de la calidad de vida. Gracias a la implementación de los ya mencionados programas de cribado, en la actualidad, únicamente un 5% de las pacientes con cáncer de mama presentan metástasis al diagnóstico.<sup>58,59</sup>

Por el contrario, aunque el cáncer de mama no metastásico cuenta con pronósticos muy variables en función de factores como estado hormonal del tumor, las características de las pacientes e incluso el acceso a un sistema sanitario estructurado, se estima que la supervivencia global a los 5 años en Europa oscila entre un 80 y un 86%.<sup>60</sup> Pese a que dichas cifras son esperanzadoras, factores dependientes de cada paciente (como la edad o la raza) y del propio tumor (como el estadiaje tumoral, el subtipo, o la positividad para los receptores previamente expuestos) se relacionan con un mayor riesgo de recurrencia tumoral, incluso habiéndose sometido a tratamiento con intención curativa.<sup>61-63</sup> La gran parte de las recurrencias suceden en los primeros cinco años desde el diagnóstico, particularmente en el subtipo triple negativo.<sup>64,65</sup>

### 1.3.3. TRATAMIENTO Y PRONÓSTICO

El tratamiento del cáncer de mama se basa, por un lado, en el control locorregional de la enfermedad (cirugía, radioterapia), y por otro, en la terapia sistémica (quimioterapia, hormonoterapia, inmunoterapia), realizándose combinaciones y secuencias variables en función de cada tumor y de cada paciente.

El tratamiento de elección en pacientes con cáncer de mama no metastásico consiste en el control local primario de la enfermedad con cirugía, acompañada de radioterapia en caso de realizarse una cirugía conservadora de mama (tumorectomía), y en algunos casos tras mastectomía (ver **1.3.4. Principios del Tratamiento Quirúrgico**).<sup>66,67</sup> Durante la evaluación preoperatoria de las pacientes, tal y como se ha expuesto en la clasificación TNM, es necesario valorar si existe afectación ganglionar locorregional. En caso de que exista sospecha clínica de afectación ganglionar, deberá realizarse una biopsia y, en caso de resultar positiva, estaría indicada la linfadenectomía axilar. En caso de que no exista sospecha clínica o que la biopsia sea negativa, las pacientes deberán ser sometidas a Biopsia Selectiva del Ganglio Centinela (BSGC) en el momento de la intervención, y en función de los resultados obtenidos, se tomará una actitud terapéutica. Clásicamente, toda BSGC positiva ha implicado

## 1. INTRODUCCIÓN

necesidad de linfadenectomía, aunque Giuliano et al probaron una supervivencia no inferior y una menor morbilidad en la no realización de linfadenectomía en pacientes seleccionadas de bajo riesgo con hallazgo de hasta dos ganglios patológicos.<sup>68</sup>

Una vez realizada la cirugía, en función de las características de cada tumor, y teniendo en cuenta tanto factores anatómicos (TNM) como bioquímicos (ER, PR, HER2, Ki67), puede estar indicada la realización de terapia sistémica adyuvante. Por otra parte, algunas pacientes con cáncer de mama HER2+ o triple negativo pueden ser tributarias a tratamiento sistémico neoadyuvante.

En el cáncer de mama metastático, prima el control sistémico de la enfermedad.

Hablando en términos generales, las pacientes con tumores positivos para receptores hormonales podrán beneficiarse de tratamiento con hormonoterapia, de hecho se recomienda como primera línea de tratamiento, dado que presenta resultados oncológicos comparables a los de la quimioterapia y presenta un mejor perfil de tolerancia;<sup>69,70</sup> en pacientes con tumores que sobreexpresan el receptor HER2, el tratamiento dirigido anti-HER2 con inmunoterapia forma parte de la primera línea de tratamiento;<sup>71</sup> por último, en las pacientes con cáncer de mama triple negativo, se recomienda la quimioterapia como primera opción, pudiendo asociar pembrolizumab en aquellos casos con positividad para el *Tumor Programmed Cell Death Ligand 1* (PD-L1), un checkpoint inmunológico, lo que se relaciona con mejores resultados oncológicos.<sup>72</sup>

Estas mismas estrategias terapéuticas pueden aplicarse también en enfermedad no metastásica, aunque con esquemas de administración, combinaciones y objetivos clínicos distintos, ya sea en régimen adyuvante, neoadyuvante o como parte de tratamientos de conservación de órgano.

### 1.3.4. PRINCIPIOS DEL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO

Como ya se ha mencionado, el objetivo del tratamiento quirúrgico en cáncer de mama es el control local de la enfermedad. William Halsted propuso la mastectomía radical como técnica de elección a finales del siglo XIX, y lo fue durante aproximadamente 100 años.<sup>73</sup> Posteriormente, con la aparición de las teorías de Bernard Fisher, que sugerían que el cáncer de mama es una enfermedad sistémica, se realizaron ensayos clínicos comparando el tratamiento conservador de la mama (TCM) con la mastectomía, donde se objetivaron supervivencias globales similares.<sup>74</sup>

Sin embargo, tras 20 años de seguimiento, se realizó un reanálisis de los resultados obtenidos en uno de los ensayos (estudio EORTC), objetivando diferencias significativas en la recurrencia tumoral ipsilateral en el grupo de pacientes a las que se les realizó una cirugía conservadora de la mama.<sup>75</sup>

Fue la aparición de estudios como el de Fisher et al, comparando la mastectomía, tumorectomía y tumorectomía asociada a radioterapia, lo que verdaderamente supuso un cambio de mentalidad

## 1. INTRODUCCIÓN

hacia la cirugía conservadora de mama, ya que en dichos estudios se demostró que la tumorectomía asociada a radioterapia se relacionaba con una disminución significativa de la recurrencia ipsilateral, sin diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia global, la supervivencia libre de enfermedad o la supervivencia libre de metástasis, en comparación con la mastectomía total, siempre que los márgenes de resección se encuentren libres de tumor.<sup>76</sup>

Actualmente, la cirugía conservadora de mama es un estándar de tratamiento, y se considera de elección siempre que (I) puedan obtenerse márgenes de resección negativos y (II) no exista contraindicación para la radioterapia. Aunque no es una contraindicación absoluta, se tiene en cuenta, y siempre en consenso con la paciente, el componente estético.

Un meta-análisis incluyendo 78 ensayos clínicos con información de más de 42 000 pacientes, concluyó que los grupos de pacientes en los que se realizaron resecciones oncológicas completas (respecto a aquellas donde se objetivaron márgenes positivos) mostraron una mejora significativa en la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global, con un seguimiento de 15 años.<sup>77</sup> La presencia de enfermedad neoplásica residual se ha asociado, además, con un mayor riesgo para recurrencia distal.<sup>78</sup>

Sin embargo, Zavagno et al llevaron a cabo un ensayo donde 431 pacientes fueron sometidas a reintervención por la existencia de márgenes quirúrgicos positivos, de un total de 1 520 pacientes sometidas a tratamiento conservador de la mama. No objetivaron correlación entre la distancia del tumor al margen y la presencia de recurrencia local, lo que sugiere que la presencia de tumor residual en pacientes con márgenes positivos o tumores cercanos al margen, podría deberse principalmente a la existencia de múltiples focos cancerosos y no a los márgenes tumorales en sí.<sup>79</sup>

Esto pone de manifiesto la necesidad, no solo de optimizar la extensión de las resecciones tumorales quirúrgicas, sino de avanzar en el desarrollo de técnicas teranósticas que permitan al cirujano obtener un balance seguro entre márgenes libres y la mínima invasión, logrando con ello, además, mejores resultados estéticos.<sup>80</sup>

### 1.3.5. CÁNCER DE MAMA HER2+

El cáncer de mama con sobreexpresión del receptor HER2 o HER2 positivo, como ya se ha mencionado, supone entre un 15 y un 30% de todos los tumores de mama.<sup>42</sup> El receptor HER2 es una proteína transmembrana con actividad tirosín-quinasa que promueve la proliferación y supervivencia celular. Se expresa de forma fisiológica, en baja proporción, en la superficie de células epiteliales, y es necesario para el desarrollo normal de diferentes tejidos, como la mama, ovarios, pulmones, hígado, riñones y sistema nervioso central.<sup>81,82</sup> Sin embargo, su sobreexpresión en tejidos tumorales (con recuentos inmunohistoquímicos de hasta dos millones de receptores por célula) promueve la proliferación celular anómala, lo que clásicamente se ha asociado a una menor supervivencia global

## 1. INTRODUCCIÓN

y libre de enfermedad en cáncer de mama.<sup>43,81,82</sup>

Fue la aparición de terapias dirigidas anti-HER2, como el trastuzumab (aprobado en 1998), lo que consiguió cambiar el curso natural de la enfermedad.<sup>82</sup> Su uso rutinario consiguió equiparar el pronóstico de las pacientes con neoplasias HER2 positivas no metastásicas al de los tumores luminales y, en pacientes con enfermedad metastásica, ha supuesto un elemento crucial en la prolongación de su supervivencia.<sup>83,84</sup>

Sin embargo, menos de un 35% de las pacientes con cáncer de mama HER2+ responden inicialmente al trastuzumab, lo que sugiere una resistencia primaria al mismo, y entre las pacientes que inicialmente presentan respuesta al trastuzumab, aproximadamente un 70% presenta progresión metastásica en el primer año, lo que sugiere una resistencia secundaria o adquirida.<sup>85-87</sup> Los mecanismos de resistencia al trastuzumab son, por tanto, uno de los principales obstáculos en el manejo del cáncer de mama HER2+.<sup>82</sup>

Entre los potenciales mecanismos de resistencia al trastuzumab destacan las mutaciones estructurales del receptor (como la pérdida del dominio de unión del trastuzumab), la elevación alternativa de otros receptores de tirosin quinasa, como el receptor HER3, el IGF-1R o el c-Met (lo que puede perpetuar el comportamiento celular aberrante pese a la inhibición HER2) o alteraciones en la cascada de señalización intracelular del receptor HER2.<sup>82,88-92</sup>

Dada la heterogeneidad celular que presentan los tejidos tumorales, frecuentemente los diferentes mecanismos de resistencia actúan de forma simultánea.<sup>82</sup> Todo ello subraya la necesidad de enfoques terapéuticos personalizados capaces de superar la plasticidad tumoral.

The background of the page is a marbled paper pattern. The top half features a teal or light blue color with a pattern of irregular, rounded shapes that resemble marbled paper or perhaps a microscopic view of certain biological cells. The bottom half is a dark, almost black, version of the same pattern, creating a high-contrast, two-toned effect. The text is centered in the upper portion of the teal area.

## **2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO**



## 2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO

La presente tesis surge de la convergencia entre una necesidad clínica y una terapia emergente con alto potencial traslacional, en el contexto de un trabajo colaborativo entre dos instituciones: el Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Germans Trias i Pujol, desde la vertiente clínica y quirúrgica, y el Institut Químic de Sarrià, desde el ámbito de la fotoquímica.

La Cirugía General, desde el punto de vista oncológico, abarca el tratamiento de un amplio espectro de patologías, incluyendo tumores de mama, glándulas endocrinas (principalmente tiroides, suprarrenales y paratiroides), tracto gastrointestinal (esófago, estómago, intestino delgado, colon y recto), órganos sólidos del aparato digestivo (hígado, páncreas), peritoneo y retroperitoneo.<sup>93</sup> Independientemente del tipo de neoplasia, el control locorregional de la enfermedad, las resecciones tumorales completas y la obtención de márgenes adecuados, son retos comunes presentes en nuestra práctica diaria.

Desde esta experiencia clínica se identificó en la PIT una herramienta prometedora. Su propio mecanismo de acción, en el que la especificidad de anticuerpos monoclonales se combina con la acción citotóxica y fluorescente de un PS activado por luz NIR, plantea potenciales aplicaciones quirúrgicas.

Por un lado, su alta especificidad e inocuidad plantean la posibilidad de hacer de la PIT un complemento preciso mínimamente invasivo capaz de eliminar toda carga tumoral residual con precisión celular. Además, la activación inmunológica antitumoral que asocia la convierte en una candidata ideal para incorporarse a los protocolos oncológicos modernos.

Por otro lado, gracias a las propiedades fluorescentes del PS, se consideró que la NIR-PIT podría constituir una herramienta diagnóstica intraoperatoria que permitiera visualizar de manera selectiva las células marcadas con el PIC y facilitara, además, la realización de resecciones guiadas por fluorescencia.

El cáncer de mama se planteó como un modelo ideal para evaluar esta tecnología, dado que posee un subtipo cuya historia natural ya ha sido modificada por la aparición de terapias dirigidas que, sin embargo, todavía presentan ciertas limitaciones: el cáncer de mama HER2+. Por otra parte, se consideró que el hecho de que una de las limitaciones en el manejo del cáncer de mama HER2+ sea la resistencia primaria y secundaria al tratamiento con trastuzumab ofrecía la posibilidad de poder evaluar la eficacia de la PIT en condiciones clínicas exigentes pero con potencial aplicabilidad clínica.

Por todo lo previamente descrito, esta tesis se planteó con el objetivo de estudiar el papel de la fotoimmunoterapia en el cáncer de mama HER2+.

## 2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO

Se planteó estructurar el proyecto en dos fases: (I) una fase experimental sobre modelo murino y (II) una fase de revisión de la literatura.

Para la realización del estudio experimental se partió de un análisis bibliográfico del estado de la cuestión, lo que permitió identificar una laguna de evidencia preclínica concreta y relevante: la evaluación de la fotoinmunoterapia en un contexto de resistencia farmacológica al tratamiento estándar, el cáncer de mama HER2+ resistente al trastuzumab.

Sobre esa base, se planteó el desarrollo de un modelo murino experimental. Una vez obtenidos resultados positivos, se consideró oportuno ampliar la perspectiva mediante una revisión sistemática más extensa. Aunque el cáncer de mama HER2+ continuaba siendo parte del enfoque, se optó deliberadamente por expandir el análisis a toda nuestra disciplina quirúrgica, es decir, a las neoplasias abordadas desde la cirugía general. Esta decisión respondía, por un lado, a nuestro interés por conocer el potencial real de la PIT más allá del cáncer de mama, y por otro, a la previsión de que la literatura disponible sería todavía limitada. Así, se planteó la revisión sistemática como una herramienta para contextualizar los hallazgos experimentales dentro de un marco más amplio, con el objetivo de explorar aplicaciones potenciales y orientar futuras líneas de investigación en el ámbito de la cirugía oncológica.

Desde una perspectiva socioeconómica, se consideró además que el proyecto podía alinearse con los objetivos de la “EU Mission: Cancer”, una iniciativa de la Comisión Europea enmarcada en el programa Horizon Europe.<sup>94</sup> Esta misión tiene como objetivo mejorar la vida de más de tres millones de personas para el año 2030, a través de acciones integradas que aborden la prevención, la detección temprana, el tratamiento y la calidad de vida de pacientes oncológicos y sus familias.<sup>94</sup>

En definitiva, la presente tesis se planteó en base a su potencial científico y traslacional y en consonancia con los objetivos emergentes de salud pública europeos a corto-medio plazo, a los que consideramos que podía contribuir.



# 3. HIPÓTESIS



# 3. HIPÓTESIS

## 3.1. HIPÓTESIS PRINCIPAL

La NIR-PIT, mediante el uso de un PIC compuesto por trastuzumab y un PS, podría ser un tratamiento eficaz en el cáncer de mama HER2+ resistente al trastuzumab.

## 3.2. HIPÓTESIS SECUNDARIAS

1. La NIR-PIT permite un control locorregional del crecimiento tumoral en modelos murinos de cáncer de mama HER2+ resistente al trastuzumab.
2. La NIR-PIT ofrece ventajas como herramienta teranóstica mediante fluorescencia, lo que podría ser aplicable en cirugía.
3. La NIR-PIT presenta un perfil de toxicidad aceptable en modelos murinos de cáncer de mama HER2+ resistente al trastuzumab.
4. La revisión sistemática de la literatura permitirá identificar las limitaciones existentes para la aplicación de la NIR-PIT en Cirugía General, así como posibles aplicaciones futuras.



The background of the page is a marbled paper pattern. The top half features a teal or light blue marbled pattern with organic, cell-like shapes. The bottom half features a black marbled pattern with similar organic shapes. The two patterns meet at a wavy, irregular horizontal line.

## **4. OBJETIVOS**



# 4.OBJETIVOS

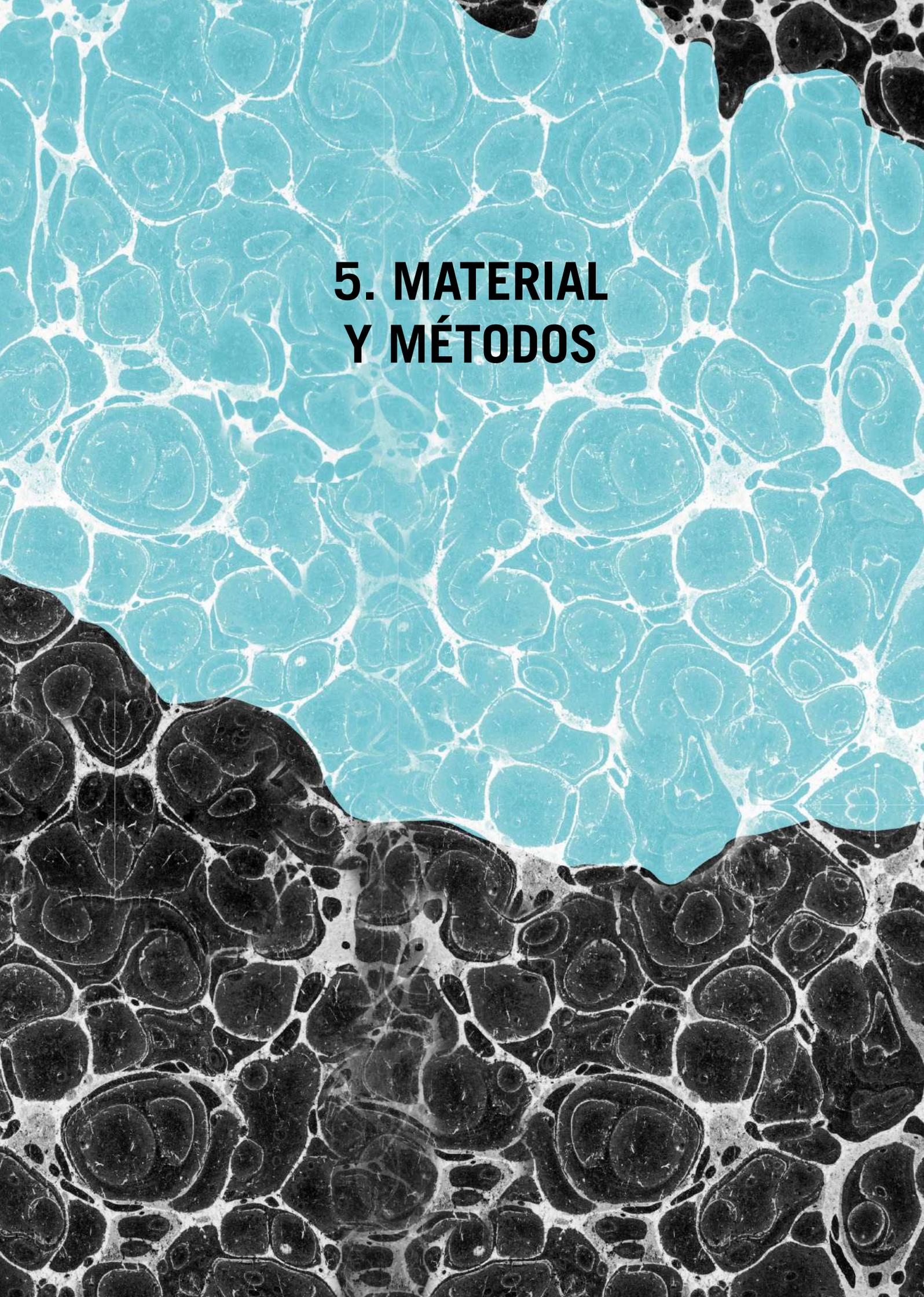
## 4.1. OBJETIVO PRINCIPAL

Evaluar la eficacia terapéutica de la NIR-PIT mediante el uso de un PIC compuesto por trastuzumab y un PS en el tratamiento del cáncer de mama HER2+ resistente al trastuzumab, evaluando su capacidad para inducir respuesta antitumoral específica en un modelo murino clínicamente relevante

## 4.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Caracterizar el patrón de respuesta locorregional al tratamiento con NIR-PIT en términos de evolución del tamaño tumoral y dinámica de crecimiento, en un modelo murino de cáncer de mama HER2+ resistente al trastuzumab.
2. Explorar las propiedades fluorescentes de la NIR-PIT in vivo y su aplicabilidad como herramienta teranóstica en cirugía oncológica.
3. Evaluar el perfil de toxicidad de la NIR-PIT en un modelo murino de cáncer de mama HER2+ resistente al trastuzumab.
4. Identificar, mediante una revisión sistemática de la literatura, las principales barreras para la implementación clínica de la NIR-PIT en el ámbito de la Cirugía General, así como sus posibles aplicaciones futuras



The image shows a microscopic view of plant tissue, likely a cross-section of a stem or root. The tissue is composed of numerous cells, many of which are arranged in concentric rings, suggesting a vascular structure. The cells are stained, and the overall appearance is that of a complex, organized biological structure. A large, irregular cyan-colored overlay covers the upper portion of the image, partially obscuring the underlying tissue. The text "5. MATERIAL Y MÉTODOS" is centered within this cyan area.

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**



# 5. MATERIAL Y MÉTODOS

En base a la justificación y planteamiento descritos, este trabajo cuenta con dos líneas metodológicas: por una parte, se ha realizado un estudio experimental in vivo (apartado **5.1. Estudio Experimental**), y por otra parte, para contextualizar los resultados obtenidos, una revisión sistemática (apartado **5.2. Revisión Sistemática**).

## 5.1. ESTUDIO EXPERIMENTAL

### 5.1.1. CONTEXTUALIZACIÓN

Partiendo de la hipótesis y objetivo principal de este proyecto, “La NIR-PIT, mediante el uso de un PIC compuesto por trastuzumab y un PS, podría ser un tratamiento eficaz en el cáncer de mama HER2+ resistente al trastuzumab”, se diseñó un estudio experimental en modelo animal, dado que la fotoinmunoterapia en cirugía se encuentra aún en fase preclínica de desarrollo y, en esta etapa, su aplicación en humanos no resultaba ética ni científicamente adecuada.

Se optó por un modelo murino debido a su idoneidad en investigaciones oncológicas preclínicas, dado que los ratones ofrecen ventajas como su tamaño reducido, facilidad de manejo, bajo coste, y la disponibilidad de modelos inmunocomprometidos que permiten la implantación de líneas tumorales humanas. La elección del modelo se realizó siguiendo los principios éticos de las 3R (Reemplazo, Reducción y Refinamiento). Asimismo, el estudio se diseñó y ejecutó en conformidad con la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

En conformidad con todo lo anterior, el proyecto cuenta con valoraciones favorables del Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) del Institut Germans Trias i Pujol (IGTP) (ver **Anexo 11.1**), la Generalitat de Catalunya (ver **Anexos 11.2 y 11.3**) y todos los estudios experimentales han sido llevados a cabo por personas capacitadas por el Departament d'Acció Climàtica, Alimentació i Agenda Rural de la Generalitat de Catalunya (ver **Anexo 11.4**).

Previa realización del estudio in vivo se llevaron a cabo tanto la síntesis del PIC como estudios mecanísticos y de eficacia in vitro en modelos celulares, realizados por la Dra Mireia Jordà en el Institut Químic de Sarrià (apartados **5.1.2, 5.1.3 y 5.1.4**), y constituyen la base sobre la cual se ha sustentado el estudio experimental, permitiendo además la minimización del uso de animales.

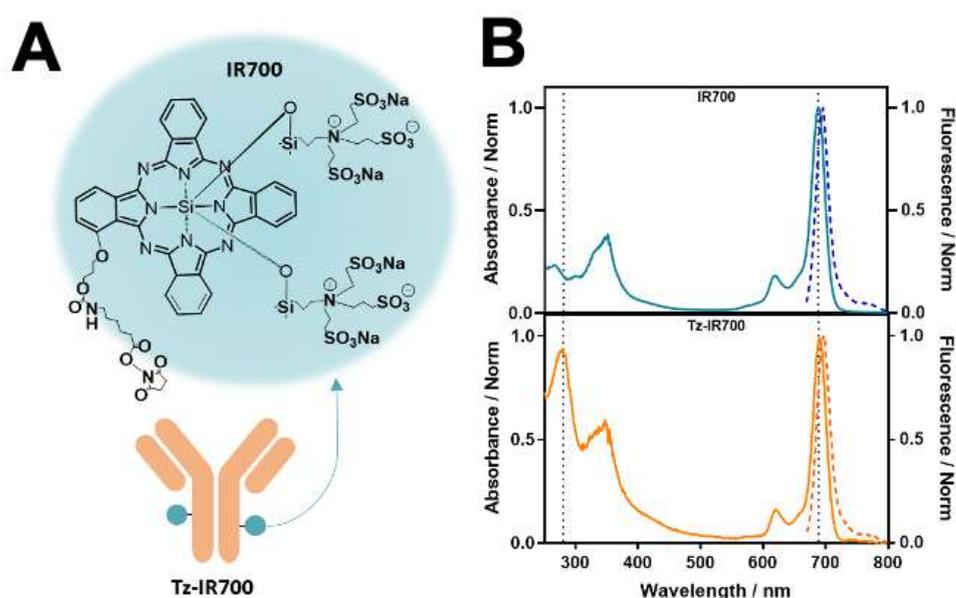
Asimismo, el diseño metodológico del experimento con animales se ha basado en los hallazgos obtenidos tras la realización de dos estudios piloto previos con ratones y un análisis estadístico preliminar, recogidos en el apartado **5.1.6** de esta sección.

Todos los experimentos realizados y sus resultados han sido compilados en un artículo colaborativo publicado en el *European Journal of Medicinal Chemistry* (ver **Anexo 11.5**), revista internacional que cuenta con un factor de impacto de 6.0 (JCR 2023) y clasificada en el primer cuartil (Q1) en todas sus categorías (Medicina, Química Orgánica, Farmacología, Descubrimiento de Fármacos).<sup>95</sup>

### 5.1.2. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL FOTOINMUNOCONJUGADO TZ-IR700

El PIC Tz-IR700 se obtuvo mediante la unión covalente del anticuerpo trastuzumab con el PS IR700. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente bajo agitación, y el producto fue purificado mediante ultrafiltración con una membrana de corte de 50 kDa. La relación de conjugación fue de aproximadamente dos moléculas de IR700 por cada Tz (**Figura 2A**), confirmada mediante espectroscopía de absorción.

La caracterización espectroscópica del conjugado reveló que mantiene la capacidad de absorción y emisión del IR700 libre, aunque con una ligera disminución en la intensidad de fluorescencia (**Figura 2B**). Este efecto se atribuye a un apantallamiento parcial del PS debido a la presencia del anticuerpo. No obstante, la fluorescencia residual resultó suficiente para aplicaciones de imagen *in vitro* e *in vivo*. Adicionalmente, el espectro de absorción del conjugado mostró una banda adicional en torno a 280 nm, característica de las proteínas, lo que confirmó la presencia del anticuerpo en el complejo. Estos resultados avalan la estabilidad estructural del conjugado y su idoneidad para aplicaciones terapéuticas y diagnósticas.



**Figura 2. Caracterización del fotoinmunoconjugado Tz-IR700.**

**(A)** Representación esquemática de la estructura del PIC, en la que el anticuerpo trastuzumab se encuentra unido covalentemente a dos moléculas del PS IR700.

**(B)** Espectros de absorción (líneas continuas) y fluorescencia (líneas discontinuas) del IR700 libre y del PIC Tz-IR700

### 5.1.3. ESTUDIOS MECANÍSTICOS

Para comprender el mecanismo responsable del efecto terapéutico observado, se realizaron estudios orientados a confirmar la participación del oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), una especie reactiva que puede inducir la muerte celular tras la activación lumínica del conjugado Tz-IR700.

En primer lugar, se empleó un inhibidor específico de oxígeno singlete (azida sódica), el cual bloqueó completamente el efecto citotóxico del tratamiento, lo que sugiere que dicha especie es esencial en la acción del fármaco. En segundo lugar, se observó que el efecto fototóxico aumentaba al modificar el medio celular para prolongar la vida útil del oxígeno singlete, reforzando su rol central en la respuesta.<sup>96</sup>

Por último, se realizó una medición directa del oxígeno singlete en las células tratadas, observándose una señal característica que desaparecía al usar el inhibidor y se intensificaba bajo condiciones que favorecen su estabilidad. Estos hallazgos confirman que la generación de oxígeno singlete es el principal mecanismo mediante el cual el Tz-IR700 elimina las células tumorales HER2+ resistentes a trastuzumab.

### 5.1.4. ENSAYOS IN VITRO

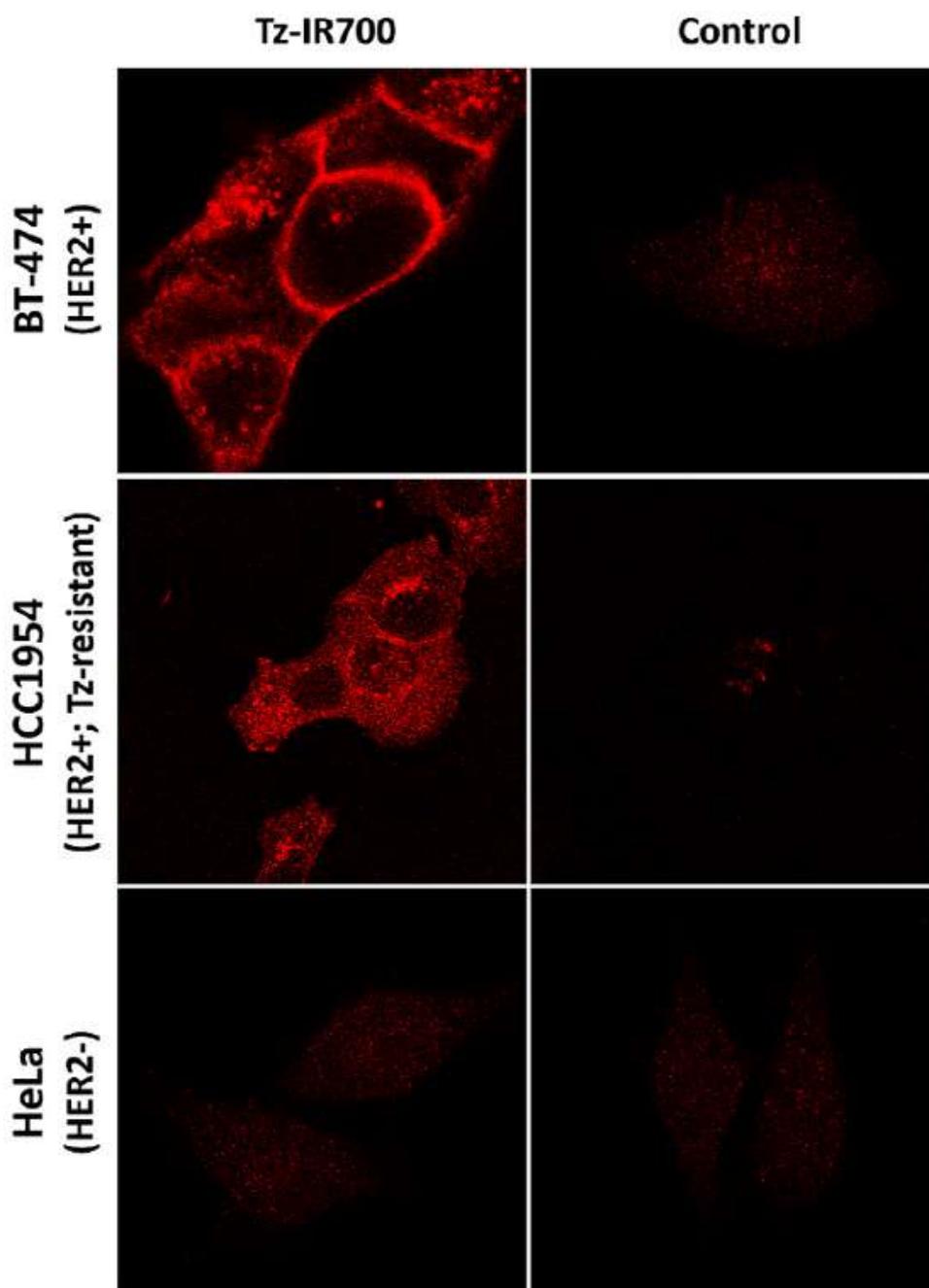
Con el objetivo de validar experimentalmente la funcionalidad del PIC antes de su aplicación in vivo, se realizaron estudios in vitro en líneas celulares humanas de cáncer de mama HER2+. Se emplearon las líneas BT-474 (HER2+ sensible a trastuzumab), HCC1954 (HER2+ resistente a trastuzumab) y HeLa (HER2-) como control negativo. Las células se incubaron con Tz-IR700 (0,1  $\mu$ MEq de IR700) durante 6 horas, se lavaron y se expusieron a luz roja ( $660 \pm 10$  nm,  $53$  mW/cm<sup>2</sup>) para inducir el efecto fotodinámico. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT, una técnica colorimétrica que detecta la reducción del compuesto tetrazólico MTT (de coloración amarilla) a formazán, un producto púrpura generado por células viables, correlacionándose con su actividad mitocondrial.<sup>97</sup>

Se observó un efecto fototóxico dependiente de la dosis de luz en células BT-474, sin toxicidad en los controles no irradiados. El tratamiento no fue activo frente a células HeLa, confirmando la especificidad del Tz-IR700 por células HER2+. Se demostró también su eficacia frente a la línea HCC1954, resistente a trastuzumab, evidenciando la capacidad del conjugado para vencer esta resistencia.

La fototoxicidad fue dependiente de la concentración del conjugado hasta 0,1  $\mu$ M, sin observarse una reducción adicional en la viabilidad celular a concentraciones superiores, en concordancia con estudios previos realizados con otros conjugados similares, como panitumumab-IR700.<sup>98</sup> Controles adicionales confirmaron que el IR700 libre no presentó actividad fototóxica en ninguna de las líneas celulares analizadas.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

La captación específica del Tz-IR700 fue confirmada por microscopía confocal, mostrando fluorescencia exclusivamente en células HER2+ (BT-474 y HCC1954), mientras que las células HeLa resultaron negativas en las mismas condiciones de imagen (ver **Figura 3**).



**Figura 3.** Imágenes de microscopía confocal fluorescente en células HER2+ sensibles al trastuzumab (BT-474), células HER2+ resistentes al trastuzumab (HCC1954) y células HER2- (HeLa) incubadas durante 3h con Tz-IR700.

### 5.1.5. ESTUDIO IN VIVO

#### 5.1.5.1. MODELO ANIMAL Y TUMORAL

Se utilizaron ratones BALB/c nude hembras de cuatro semanas de edad, adquiridos del Charles River Laboratory (Cerdanyola del Vallès, Barcelona, España). Esta cepa fue seleccionada por su baja tasa de rechazo tumoral, lo que permite la implantación eficaz de tumores humanos, y por su idoneidad para estudios de imagen y fototerapia.<sup>99</sup>

Todos los procedimientos se realizaron conforme a la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio y fueron aprobados por la Generalitat de Catalunya (ver **Anexos 11.2 y 11.3**). Los animales fueron estabulados en el Centre de Medicina Comparativa i Bioimatge de Catalunya (CMCiB), donde se llevaron a cabo todos los experimentos. Tras su llegada, permanecieron en periodo de aclimatación durante siete días, alojados en condiciones de barrera sanitaria, en grupos sociales estables de cuatro individuos por jaula. Las jaulas incluían elementos de enriquecimiento ambiental, como papel de celulosa y túneles de cartón, y los animales dispusieron en todo momento de agua y alimento estériles ad libitum.

Durante el desarrollo del estudio, se aplicó un protocolo de supervisión diaria del bienestar animal que incluía la evaluación de parámetros físicos, clínicos y de comportamiento, siguiendo una escala de puntuación estandarizada. Este protocolo permitía identificar de forma precoz signos de malestar, y se establecieron criterios objetivos de sacrificio anticipado en función de la puntuación obtenida en dicha escala. Los animales fueron anestesiados con isoflurano al 3 % vía inhalatoria durante los procedimientos invasivos.

Finalizado el protocolo experimental o en caso de alcanzar el punto final clínico definido, los animales fueron eutanasiados mediante luxación cervical, conforme a lo establecido en la normativa vigente (RD 53/2013).

Se implantaron tumores subcutáneos de la línea celular HCC1954 en el flanco dorsal izquierdo de los ratones mediante inyección de  $4 \times 10^5$  células en 100  $\mu$ L de PBS. El crecimiento tumoral se monitorizó cinco veces por semana mediante inspección visual y medición milimétrica con pie de rey. Una vez que los tumores alcanzaron un diámetro tumoral máximo (MTD) superior a 1 mm y no mayor de 10 mm, los ratones se distribuyeron por parejas homogéneas según el MTD. Posteriormente, cada individuo dentro de cada pareja fue asignado aleatoriamente a uno de los dos grupos experimentales: "Tz-IR700 Light" y "Tz-IR700 Dark". El tamaño muestral total fue de 31 ratones, con 16 asignados al grupo con irradiación y 15 al grupo sin irradiación.

El cálculo del tamaño muestral se realizó mediante el software G\*Power, considerando un tamaño del efecto de 0,5, un nivel de significación alfa de 0,05, una potencia estadística del 80 % y dos grupos de comparación. Asimismo, se respetaron los principios de reducción, reemplazo y refinamiento (3R) con el fin de minimizar el uso de animales.

### 5.1.5.2. FOTOINMUNOTERAPIA IN VIVO

Los animales recibieron una primera dosis intraperitoneal de 71  $\mu\text{g}$  del conjugado Tz-IR700. A las 24 horas de dicha administración, los ratones del grupo “Tz-IR700 Light” fueron sometidos a una primera sesión de irradiación con luz NIR, a dosis de  $100 \text{ J cm}^{-2}$ , utilizando la lámpara Red 670® ( $\lambda = 660 \pm 10 \text{ nm}$ ; intensidad:  $53 \text{ mW cm}^{-2}$ ). Inmediatamente después de esta primera irradiación, se administró una segunda dosis de 71  $\mu\text{g}$  del conjugado. Una segunda sesión de irradiación se realizó 24 horas después de esta segunda administración, es decir, a las 48 horas desde la primera inyección. 24 horas después de la segunda irradiación, lo que corresponde a 96 horas desde la administración inicial del tratamiento, se realizó la exéresis quirúrgica de los tumores, y posteriormente los animales fueron sacrificados. Los animales del grupo “Tz-IR700 Dark” siguieron el mismo régimen de dosificación, recibiendo ambas administraciones del conjugado en los mismos puntos temporales, pero sin exposición a irradiación en ningún momento del protocolo. La **Figura 4** representa gráficamente el protocolo experimental.



**Figura 4.** Línea cronológica y representación visual del protocolo experimental con Tz-IR700 en ratones.

### 5.1.5.3. ESTUDIOS DE FLUORESCENCIA IN VIVO

La biodistribución y acumulación tumoral del conjugado Tz-IR700 se evaluó mediante estudios de imagen por fluorescencia in vivo. Las imágenes se adquirieron utilizando un sistema IVIS® Lumina para pequeños animales (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, EE. UU.), con una longitud de onda de excitación de 675 nm, una ventana de emisión entre 690 y 770 nm, un tiempo de exposición de 4 segundos y el nivel de fluorescencia ajustado en modo bajo. Se realizaron adquisiciones en cuatro momentos del protocolo recogidos gráficamente en la **Figura 5**: (1) 24 horas después de la primera administración del conjugado, justo antes de la primera irradiación; (2) inmediatamente después de dicha irradiación; (3) 48 horas después de la primera administración, lo que corresponde a 24 horas

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

después de la segunda inyección del conjugado y 24 horas antes de la segunda irradiación; y (4) tras la segunda irradiación, completando el seguimiento hasta las 96 horas desde la primera dosis. En el grupo “Tz-IR700 Dark” la fluorescencia in vivo solo se evaluó en los puntos (1) y (3). Esta secuencia permitió monitorizar la evolución de la señal fluorescente tumoral en relación con las distintas fases del tratamiento.



**Figura 5.** Representación gráfica de los puntos de adquisición de imágenes de fluorescencia in vivo mediante IVIS (flecha verde) enmarcados en la cronología del protocolo de experimentación.

### 5.1.5.4. ANÁLISIS HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO

Los tumores fueron analizados en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol por los doctores Pedro L. Fernández y Anna Castillo. Las muestras se fijaron en paraformaldehído al 4 %, se embebieron en parafina, se seccionaron en cortes de 3 a 4 µm de grosor, se montaron sobre portaobjetos y se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E). La gradación histológica de los tumores se realizó según el sistema de Nottingham modificado, utilizado de forma estandarizada en el diagnóstico de cáncer de mama. Este sistema asigna una puntuación total de 3 a 9 en función de tres parámetros: la formación de túbulos (1 punto si >75 %, 2 puntos si entre 10–75 % y 3 puntos si <10 %), el pleomorfismo nuclear (puntuado de 1 a 3) y la actividad mitótica (1 a 3 puntos, según el número de mitosis observadas por campo microscópico y el área del objetivo). La suma de estas puntuaciones permite clasificar los tumores en grado 1 (3–5 puntos), grado 2 (6–7 puntos) o grado 3 (8–9 puntos).

Para los estudios inmunohistoquímicos, se emplearon anticuerpos específicos contra p53, Ki67, BCL-2 y HER2, utilizando un kit de detección comercial (Roche Diagnostics; Rotkreuz, Suiza), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La evaluación se realizó sobre secciones representativas, incluyendo los controles pertinentes. La expresión de p53 se estimó como el porcentaje de células con positividad nuclear en campos de alta magnificación (400×). La expresión de BCL-2 se valoró mediante análisis

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

combinado de marcaje nuclear y citoplasmático. La expresión de HER2 se clasificó de forma semi-cuantitativa como: 0 (ausencia de marcaje), 1+ (marcaje incompleto y tenue en >10 % de células), 2+ (marcaje completo débil o moderado en >10 %) y 3+ (marcaje completo intenso en >10 %). La expresión de Ki67 se cuantificó mediante el programa QuPath, utilizando los siguientes parámetros: imagen de detección “Optical density sum”, tamaño de píxel solicitado 0,0001  $\mu\text{m}$  y umbral de intensidad en compartimento “Nucleus: DAB OD mean”. La evaluación fue realizada de manera simultánea y ciega.

### 5.1.6. ESTUDIOS PILOTO

Toda la metodología experimental descrita se ha fundamentado en la realización de dos estudios piloto, mencionados en el artículo publicado y enmarcados dentro del protocolo de experimentación animal. Ambos se llevaron a cabo en el CMCiB antes del desarrollo del estudio experimental definitivo, con el objetivo de optimizar el modelo preclínico, definir los parámetros técnicos de la NIR-PIT y validar la utilidad del sistema IVIS<sup>®</sup> como herramienta de monitorización tumoral.

Como medidas específicas de protección del PIC frente a la luz ambiental, se utilizaron jaulas forradas con papel transparente verde, y todos los procedimientos se efectuaron con las luces de la sala apagadas. Estas condiciones se replicaron posteriormente en el estudio definitivo. El primer estudio piloto se llevó a cabo en junio de 2022, el segundo en noviembre de 2022, y el estudio experimental definitivo tuvo lugar en junio de 2023.

#### 5.1.6.1. PRIMER ESTUDIO PILOTO

El primer estudio piloto, desarrollado en junio de 2022, tuvo como finalidad (1) determinar el momento de máxima captación tumoral del PIC mediante el sistema de imagen IVIS<sup>®</sup>, (2) confirmar la utilidad de dicha visualización como herramienta de monitorización, y (3) explorar posibles tendencias de respuesta terapéutica, a pesar de la limitación del tamaño muestral ( $n = 4$ ).

Cada uno de los animales incluidos en el estudio fue portador de dos tumores subcutáneos, implantados mediante la inyección de 400.000 células HCC1954 por tumor, uno en cada flanco (ver **Imagen 1**).

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS



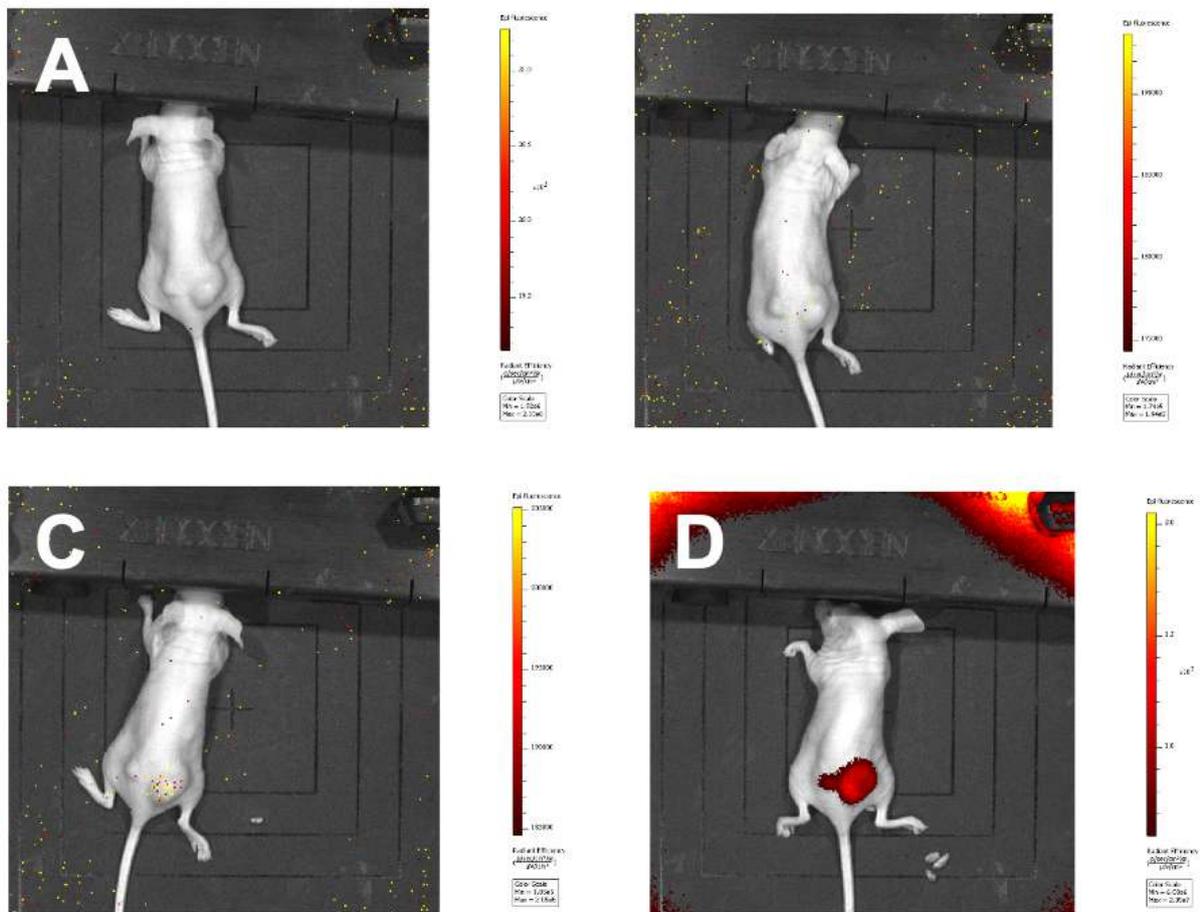
**Imagen 1.** Inyección subcutánea de células tumorales para la implantación tumoral en ambos flancos, bajo anestesia general.

Tras la inyección, los ratones fueron inspeccionados diariamente para evaluar el crecimiento tumoral. Se consideró que la implantación tumoral había finalizado cuando todos los tumores alcanzaron un tamaño  $>5\text{mm}$  (34 días tras la inyección), lo que generó una muestra heterogénea. Se observó además que existía una tasa de no implantación tumoral que debía tenerse presente para el cálculo muestral del estudio definitivo.

Tras la implantación, todos los animales recibieron una dosis única de  $71\ \mu\text{g}$  del PIC por vía intraperitoneal. Solo uno de los tumores de cada ratón, el de mayor tamaño, fue sometido a irradiación durante 30 minutos, 24h tras la inyección del fármaco, mientras que el otro se protegió mediante un obturador opaco negro, actuando como control interno para cada animal.

La curva de captación fluorescente del PIC mostró una acumulación máxima a las 24 horas tras la inyección, en concordancia con protocolos similares descritos en la literatura, lo que permitió establecer este punto temporal como el más adecuado para la aplicación de la irradiación con luz NIR. Para definir dicha cinética, se realizó adquisición de imagen antes de la administración del PIC y en las 3, 6 y 24h horas posteriores (**Figura 6**).

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS



**Figura 6. Captación fluorescente con IVIS® en diferentes puntos temporales:**

**(A)** Antes de la inyección del fármaco. Parámetros de adquisición: filtro de excitación a 675 nm, ventana de emisión correspondiente a ICG, nivel de fluorescencia alto y tiempo de exposición de 1 segundo.

**(B)** 3 horas tras la inyección intraperitoneal del PIC. Parámetros de adquisición: filtro de excitación a 675 nm, ventana de emisión correspondiente a ICG, nivel de fluorescencia alto y tiempo de exposición de 10 segundos.

**(C)** 6 horas tras la inyección intraperitoneal del PIC. Parámetros de adquisición: filtro de excitación a 675 nm, ventana de emisión entre 690 y 770 nm, nivel de fluorescencia alto y tiempo de exposición de 10 segundos.

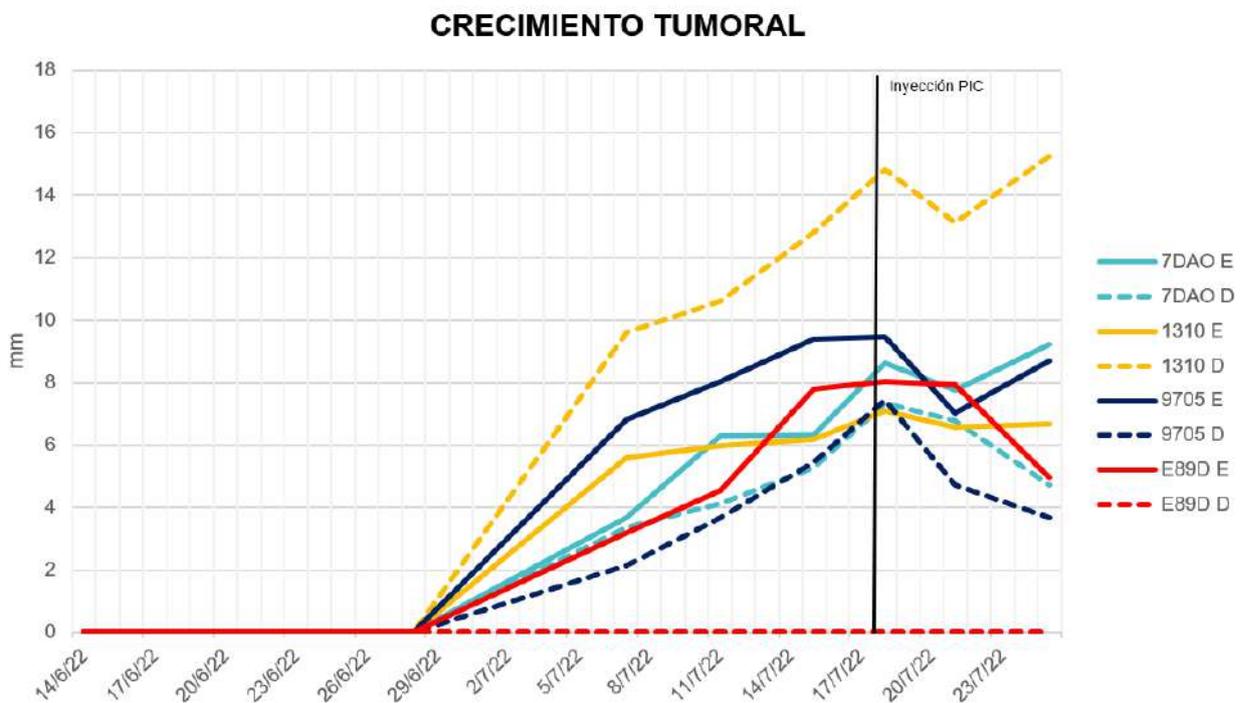
**(D)** 24h tras la inyección intraperitoneal del PIC, inmediatamente antes de la irradiación. Parámetros de adquisición: filtro de excitación a 675 nm, ventana de emisión correspondiente a Cy5.5, nivel de fluorescencia alto y tiempo de exposición de 5 segundos.

La señal fluorescente tumoral registrada mediante IVIS® fue clara y reproducible en todos los casos, habiéndose empleado diferentes parámetros de adquisición a lo largo del estudio con el fin de evaluar su impacto en la calidad de imagen y establecer las condiciones óptimas para la visualización tumoral. Esta variabilidad experimental permitió valorar el impacto de factores como la intensidad de fluorescencia, el tiempo de exposición o la selección del filtro de excitación y emisión en la captación del conjugado y en la nitidez de las imágenes obtenidas.

En cuanto a la respuesta terapéutica, representada gráficamente en el **Gráfico 1**, se observó una tendencia inicial al decrecimiento en los tumores irradiados, frente a un crecimiento progresivo en los no irradiados. No obstante, también se detectó un cierto grado de efecto en los tumores

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

control, lo que sugirió la existencia de una posible interferencia lumínica cruzada entre ambos flancos del animal, una limitación inherente al diseño bilateral del modelo. Además, se comprobó que la respuesta al tratamiento parecía depender del tamaño inicial del tumor, registrándose una mejor evolución en aquellos de menor volumen, lo que subrayó la importancia de controlar la homogeneidad tumoral entre grupos experimentales para evitar sesgos. El seguimiento se prolongó hasta el séptimo día tras la inyección del conjugado, incluyendo una medición intermedia a las 72 horas (48 h postirradiación) y una última antes de la exéresis tumoral. En algunos casos, especialmente en tumores de mayor tamaño, se observó una tendencia al recrecimiento entre ambas mediciones. Tras la intervención quirúrgica, se procedió a la eutanasia de los animales.



**Gráfico 1.** Gráfico de líneas que representa el crecimiento tumoral (en mm) desde la inyección de células tumorales.

Cada color y código corresponde a un animal distinto, con dos curvas por sujeto: una línea continua para el tumor no irradiado y una línea discontinua para el tumor irradiado. La línea vertical negra indica el momento de la inyección intraperitoneal del PIC. Los tumores representados con líneas discontinuas recibieron irradiación con luz NIR 24 horas después de la administración del PIC.

### 5.1.6.2. SEGUNDO ESTUDIO PILOTO

El segundo piloto, realizado en noviembre de 2022, incorporó modificaciones metodológicas específicas en base al aprendizaje del primer estudio: se empleó un modelo con un único tumor por ratón (implantando 400.000 células HCC1954 por animal) y los animales fueron emparejados por tamaño tumoral inicial para formar grupos homogéneos de tratamiento y control.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio tuvo como objetivos (1) Evaluar la tendencia de respuesta tumoral sin interferencias, (2) confirmar la sospecha de tratamiento indirecto en el primer piloto, (3) identificar el momento de máximo efecto terapéutico (teniendo en cuenta que existe cierta tendencia al recrecimiento tras las dosis de tratamiento empleadas) y (4) objetivar la curva de fluorescencia del PIC, desde las 24 horas post-inyección (momento de máxima captación según el primer estudio piloto) hasta las 24 h post-fototerapia, mediante seguimiento con IVIS®.

Para valorar la respuesta al tratamiento del grupo tratado respecto al grupo control, se aplicó una prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney para comparar la reducción tumoral final entre grupos. La prueba arrojó un estadístico  $U = 0,00$ , con una significación exacta bilateral de  $p = 0,029$ . El grupo tratado presentó una reducción tumoral media significativamente mayor, con un rango promedio de 6,50, frente a 2,50 en el grupo control ( $n = 4$  por grupo).

Paralelamente, se aplicó un modelo de ANOVA factorial mixto con factores de grupo (Grupo tratamiento: PIC + irradiación vs Grupo control: PIC sin irradiación) y tiempo (pre y post irradiación), que identificó un efecto significativo del tiempo sobre el crecimiento tumoral, pero sin detectar interacción significativa entre tratamiento y tiempo, una limitación atribuida a la baja potencia estadística derivada del escaso tamaño muestral.

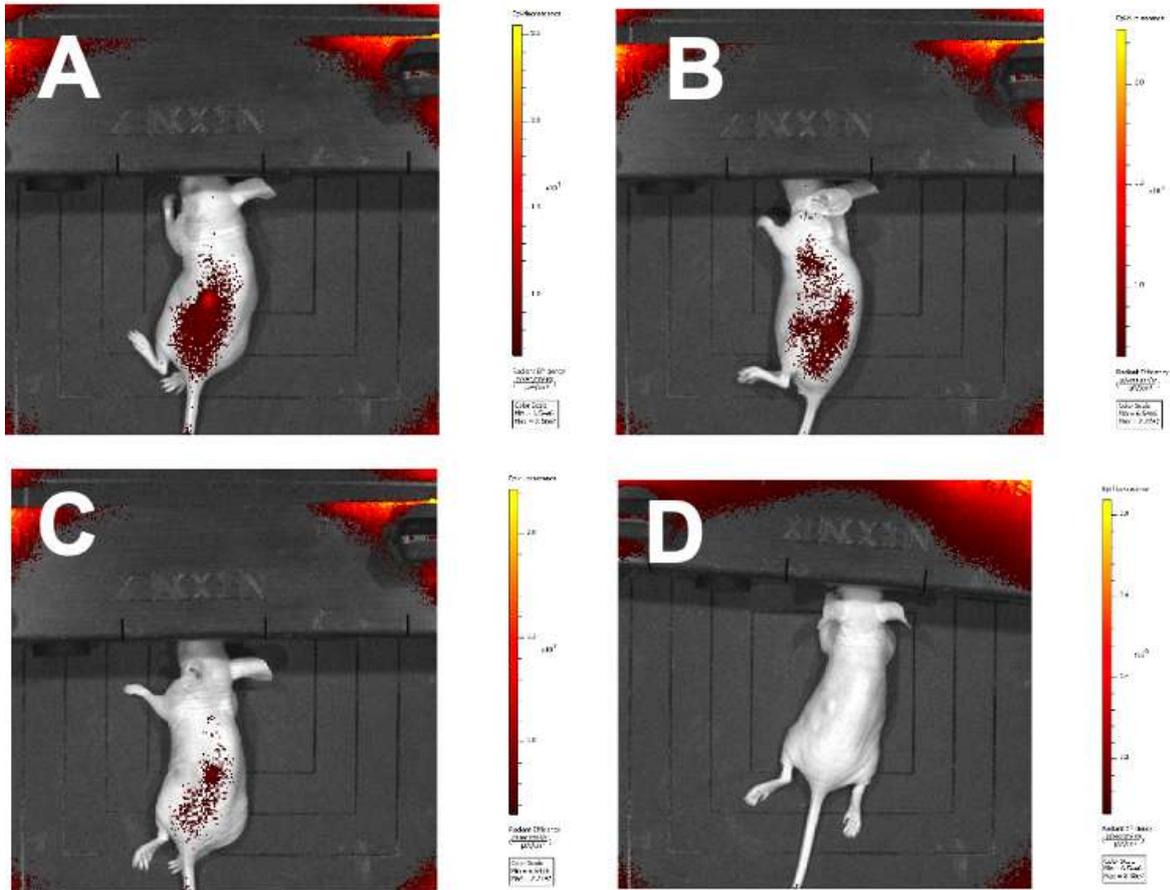
Interpretados de forma conjunta, los resultados del análisis no paramétrico y del ANOVA factorial mixto apuntaban a una tendencia coherente con la hipótesis inicial, mostrando una mayor reducción tumoral en los animales tratados. Dado que la principal limitación del estudio parecía ser el tamaño muestral reducido, y en vista de la consistencia de dicha tendencia, se planteó realizar un análisis combinado de los datos procedentes de ambos estudios piloto como estrategia para reforzar la validez de las conclusiones preliminares (ver apartado **5.1.6.3. Análisis Estadístico Preliminar**). Esta decisión se tomó con conocimiento de las limitaciones metodológicas, como la posible interferencia lumínica observada en el primer piloto, donde los tumores control parecían haber recibido tratamiento indirecto. En contraste, en este segundo piloto, no se objetivó un efecto terapéutico en el grupo control, lo que contribuyó a confirmar dicha hipótesis y puso de manifiesto la importancia del modelo unitumoral.

Teniendo en cuenta que en el primer estudio se había observado una tendencia al efecto máximo en el segundo día tras irradiación, pero siendo esta la única medida intermedia realizada entre la irradiación y el día de la exéresis tumoral, en este segundo piloto se realizaron mediciones diarias del tamaño tumoral. Esta estrategia permitió confirmar el inicio del recrecimiento entre el tercer y cuarto día tras la irradiación, lo que permitió fijar ese intervalo como referencia para el estudio definitivo. La eutanasia se realizó al cuarto día postoperatorio.

El seguimiento mediante IVIS® mostró una captación fluorescente óptima en el punto de inicio fijado en el estudio previo (24 horas tras la inyección del PIC), seguida de una desaparición progresiva tras la fototerapia, con ausencia de señal a las 24 horas post-irradiación. En base a los hallazgos obtenidos

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

en el primer estudio piloto, la adquisición de imágenes con IVIS se realizó con unos parámetros homogéneos preestablecidos (**Figura 7**).



**Figura 7. Captación fluorescente con IVIS® en diferentes puntos temporales.**

Parámetros de adquisición: filtro de excitación a 675 nm, ventana de emisión correspondiente a Cy5.5, nivel de fluorescencia bajo y tiempo de exposición de 4 segundos.

- (A) 24 horas tras la inyección intraperitoneal del PIC.
- (B) Inmediatamente tras de la irradiación con luz NIR.
- (C) 1 hora tras la irradiación con luz NIR.
- (D) 24 horas tras la irradiación con luz NIR.

### 5.1.6.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PRELIMINAR

Con el objetivo de valorar de forma más robusta la tendencia observada en los estudios piloto, y considerando que la principal limitación de ambos era el reducido tamaño muestral, se procedió a la fusión de los datos disponibles, conformando una muestra total de 16 tumores, distribuidos equitativamente entre animales tratados con fototerapia (n=8) y controles no irradiados directamente (n=8). Al revisar los supuestos estadísticos, se constató que no se cumplían los criterios de normalidad ni de homocedasticidad, motivo por el cual se optó por aplicar una prueba no paramétrica, concretamente el test de rangos con signo de Wilcoxon para muestras apareadas. Para cada tumor se consideró como valor pre-tratamiento el volumen registrado inmediatamente antes de la fototerapia, y como valor

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

post-tratamiento el volumen tumoral correspondiente al momento identificado como el punto de mínima carga tumoral antes del inicio del recrecimiento.

El análisis reveló que las diferencias entre el volumen tumoral pre y post tratamiento fueron estadísticamente significativas en el grupo tratado, con una reducción marcada del tamaño tumoral tras la irradiación directa (Wilcoxon,  $p = 0,012$ ). En cambio, en el grupo control no se observaron diferencias significativas entre ambas mediciones (Wilcoxon,  $p = 0,612$ ), lo que sugiere una evolución tumoral sostenida en ausencia de intervención terapéutica. Estos resultados confirmaron la tendencia ya evidenciada en el segundo piloto.

A pesar de no cumplirse los supuestos requeridos para el uso de modelos paramétricos, se completó un ANOVA factorial mixto con fines exploratorios, considerando el “tratamiento” como factor entre sujetos y el “tiempo” como factor intra sujeto. Este análisis detectó un efecto principal significativo del tiempo sobre el volumen tumoral, indicando una variación sistemática a lo largo del seguimiento, pero no evidenció una interacción significativa entre tratamiento y tiempo, lo que impidió confirmar de forma robusta que la evolución temporal difiriera entre grupos. Esta ausencia de interacción se interpretó con cautela, reconociendo que la escasa potencia estadística, derivada del tamaño muestral reducido, limitaba la capacidad del modelo para detectar efectos combinados.

En conjunto, los resultados del análisis estadístico preliminar permitieron confirmar una tendencia terapéutica coherente con la hipótesis inicial y definir parámetros metodológicos clave que sirvieron de base para la planificación del estudio definitivo, garantizando tanto el rigor experimental como el uso ético de los recursos animales.

### 5.2. REVISIÓN SISTEMÁTICA

#### 5.2.1. CONTEXTUALIZACIÓN

Si bien antes de iniciar el estudio experimental se realizó una búsqueda bibliográfica con el fin de adecuar el diseño al estado de la cuestión, al concluir la fase experimental —desarrollada durante un periodo de tres años— consideramos necesario reevaluar el panorama científico para contrastar nuestros hallazgos con los avances recientes. Esta actualización respondía no solo al interés por contextualizar los resultados obtenidos, sino también a la previsión, desde el inicio del proyecto, de que la PIT se perfilaba como una estrategia con elevado potencial de traslación clínica. Por tanto, parte de la motivación para su realización fue conocer en qué medida la disciplina había evolucionado durante ese intervalo y qué retos persistían en su aplicación a la práctica clínica.

Dado que la evidencia preclínica en un único subtipo tumoral podía ser aún escasa, optamos por ampliar el foco de la revisión más allá del cáncer de mama HER2-positivo, incluyendo el conjunto de neoplasias habitualmente tratadas en el ámbito de la Cirugía General. Consideramos además que un enfoque más transversal permitiría explorar el potencial terapéutico de la PIT en distintos contextos oncológicos, así como detectar patrones comunes, identificar nuevas oportunidades de aplicación y reconocer las principales limitaciones que todavía deben abordarse para facilitar su incorporación al entorno clínico.

La revisión fue registrada previamente en PROSPERO (ID de registro: CRD42024523715, ver **Anexo 11.6**), una base de datos internacional de registros de revisiones sistemáticas que garantiza transparencia y evita duplicidades, se llevó a cabo siguiendo las directrices PRISMA, e incluyó un análisis detallado de la calidad metodológica y del riesgo de sesgo de los estudios seleccionados.<sup>100</sup>

Los resultados de esta revisión sistemática han sido compilados en un manuscrito titulado “Translational applications of photoimmunotherapy in surgical oncology: a systematic review”/“Aplicaciones traslacionales de la fotoimmunoterapia en cirugía oncológica: revisión sistemática”, actualmente pendiente de publicación.

#### 5.2.2. ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA Y CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se realizó una búsqueda bibliográfica en las bases de datos MEDLINE (vía PubMed), Embase, Web of Science, Cochrane Library y Google Scholar, complementada con una búsqueda manual de citas relevantes a partir de las referencias revisadas, así como de posibles ensayos clínicos en clinicaltrials.gov. Las búsquedas se llevaron a cabo el 24 de julio de 2024.

Dado que la PIT en el contexto de la cirugía general oncológica se encuentra actualmente en una fase preclínica, se decidió emplear los componentes de búsqueda (*Search components*, SC) propuestos

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

por Leenaars et al. para identificar todos los estudios relevantes en modelos animales sobre el tema: (SC1) intervención o exposición, (SC2) enfermedad de interés, (SC3) población animal/de estudio y (SC4) variables de resultado.<sup>101</sup> Adicionalmente, se incluyeron seres humanos dentro de la población de estudio (SC3) con el fin de detectar posibles investigaciones clínicas que hubiesen escapado a nuestro conocimiento.

La estrategia de búsqueda se estructuró en torno a los dominios “photoimmunotherapy” y “surgery” (SC1), “cancer” (SC2), y “animal” y “human” (SC3). En la **Tabla 1** se muestra la estrategia de búsqueda completa.

Dado que el objetivo era evaluar el efecto de la terapia, y anticipando que el número de estudios en este campo podría no ser elevado, no se impusieron restricciones respecto a las variables de resultado (SC4). Todos los resultados fueron evaluados manualmente por dos revisores.

Estrategia de búsqueda completa	
Componente de búsqueda	Estrategia de búsqueda
SC1	(Photoimmunotherapy OR Photo immunotherapy OR Near-Infrared Photoimmunotherapy OR Near infrared photoimmunotherapy OR Near-infrared photo immunotherapy OR Near infrared photo immunotherapy OR PIT OR NIR-PIT OR NIR PIT) AND (Surgery OR surgeries OR surgical OR invasive procedure OR invasive procedures OR operative procedure OR operative procedures OR Procedure, operative OR procedures, operative OR procedure, surgical OR procedures, surgical OR procedure, operative surgical OR procedures, operative surgical OR surgical procedure OR surgical procedures OR surgical procedure, operative OR surgical procedures, operative OR operative surgical procedure OR operative surgical procedures OR operation OR operations OR intraoperative procedure OR intraoperative procedures OR general surgery OR Surgery, General)
SC2	AND (cancer OR cancers OR tumor OR tumors OR tumour OR tumours OR neoplasm OR neoplasms OR neoplasia OR neoplasias OR malignant neoplasm OR malignancy OR malignancies OR malignant neoplasms OR neoplasm, malignant OR neoplasms, malignant OR oncology OR oncologic)
SC3	AND (Animal OR animals OR animal model OR animal models OR model, animal OR laboratory animal models OR animal model, laboratory OR animal models, laboratory OR laboratory animal model OR model, laboratory animal OR models, laboratory animal OR experimental animal model OR experimental animal models OR animal model, experimental OR animal models, experimental OR model, experimental animal OR models, experimental animal OR in vivo OR Human OR humans OR people OR person OR clinic OR clinical)

**Tabla 1.** Estrategia de búsqueda completa estructurada según los SC empleados articulada mediante operadores booleanos

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

Se limitaron los estudios a aquellos originales, experimentales, en modelos in vivo (animales o humanos), publicados en inglés o español. No se aplicaron restricciones por fecha de publicación. Todos los criterios de inclusión se resumen en la **Tabla 2**.

Criterios de inclusión según los componentes de búsqueda y el diseño del estudio	
Elemento	Criterios de inclusión
Intervención (SC1)	Uso de NIR-PIT de forma aislada o en combinación con cirugía Estudios en los que se cuantifique el efecto de la NIR-PIT (volumen tumoral, tasa de crecimiento tumoral u otros métodos)
Enfermedad de interés (SC2)	Cáncer experimental en el ámbito de la Cirugía General
Población (SC3)	Estudios experimentales en animales o ensayos clínicos en humanos
Diseño del estudio	Estudios donde la intervención se compare con un grupo control Estudios originales de investigación in vivo, incluyendo ensayos clínicos Estudios redactados en inglés o español

**Tabla 2.** Criterios de inclusión

### 5.2.3. SELECCIÓN DE ESTUDIOS Y EXTRACCIÓN DE DATOS

Dos revisoras (Ana Piqueras, A.P.; Celia Martínez-Álviz, C.M) evaluaron de forma independiente los títulos y *abstracts* de los artículos identificados. Posteriormente, se realizó una evaluación a texto completo. Las discrepancias entre ambas revisoras fueron resueltas por un tercer evaluador (Joan Francesc Julián, J.F.J.).

Para cada uno de los artículos evaluados a texto completo, dos revisoras (A.P. y C.M.) recopilaron de forma independiente la siguiente información: autores, revista, año de publicación, país, idioma, tipo de estudio (tipo de cáncer, célula diana, molécula diana, anticuerpo, PS, PIC), modelo in vivo (especie animal, sexo, número de animales, tipo de tumor, número de células inoculadas, tamaño objetivo), agrupación experimental (grupos experimentales y de control, número de grupos, número de individuos por grupo, asignación), características del PIC (dosis, vía y frecuencia de administración), parámetros de luz (momento de aplicación, longitud de onda, dosis, modo y frecuencia de administración), variables de resultado (efecto, eficacia, punto temporal de mayor respuesta, seguimiento), recurrencia (local, a distancia, metástasis), toxicidad y efectos secundarios, evaluación de fluorescencia, estudios anatomopatológicos y estudios del microambiente tumoral. Las discrepancias fueron resueltas por consenso con la participación de un tercer revisor (J.F.J.).

### 5.2.4. ANÁLISIS DE CALIDAD Y DEL RIESGO DE SESGO

Dos revisoras (A.P. y C.M.) realizaron de manera independiente la evaluación de calidad metodológica de cada estudio utilizando la *CAMARADES Checklist for Quality Assessment* y la herramienta SYRCLE para evaluación del riesgo de sesgo. Las discrepancias fueron resueltas por consenso, con la intervención del tercer revisor (J.F.J.).

### 5.2.5. SÍNTESIS DE DATOS

Dada la heterogeneidad de los artículos seleccionados, tanto en su diseño como en la forma de expresar los resultados, no fue posible realizar un metaanálisis, tal como se había planteado inicialmente en el protocolo a priori registrado en PROSPERO (ver **Anexo 11.6**).

Los estudios fueron organizados en función de la localización anatómica del tumor analizado, especificándose en cada caso el método de evaluación de resultados, con un enfoque principal en el efecto terapéutico sobre la carga tumoral.

No se estableció un único criterio para definir la eficacia del tratamiento, ya que, al tratarse de una terapia en fase preclínica dentro del ámbito de la cirugía general oncológica, se anticipó una elevada heterogeneidad en los diseños y objetivos de los estudios disponibles. Por ello, los resultados de cada artículo fueron evaluados de manera individual por dos revisoras (A.P., C.M.). Se consideró que un tratamiento era eficaz cuando se lograba un resultado favorable y estadísticamente significativo respecto al objetivo planteado por el propio estudio. Para cada resultado se incluyeron las estimaciones puntuales y los valores de  $p$  o intervalos de confianza del 95 %, considerando estadísticamente significativos aquellos resultados con  $p < 0,05$  (bilateral).

Para valorar el efecto tumoral, se tuvieron en cuenta variables numéricas continuas, como el volumen tumoral, el diámetro, la progresión del crecimiento, así como valores de bioluminiscencia.

De forma secundaria, se analizó si los estudios seleccionados incluían información adicional sobre variables como la recurrencia tumoral tras el tratamiento, la toxicidad y los efectos adversos, el análisis histológico de los efectos de la terapia, la evaluación por fluorescencia y el estudio del microambiente tumoral. La presencia de estas variables fue codificada de forma dicotómica (sí/no), cuantificándose el porcentaje de artículos que aportaban cada tipo de información, y presentándose los resultados de manera narrativa.

### 5.3. FUENTES DE FINANCIACIÓN

La investigación desarrollada en esta tesis ha sido posible gracias a la financiación obtenida a través de diferentes convocatorias competitivas, tanto internas como externas, compiladas en la **Tabla 3**. Estas ayudas han permitido cubrir los costes asociados a la adquisición de material fungible, animales de experimentación, servicios técnicos, análisis histopatológicos y equipamiento, así como actividades científicas vinculadas al desarrollo y validación del modelo experimental.

En el ámbito institucional, el proyecto fue financiado mediante una ayuda a la investigación concedida por el Hospital Germans Trias i Pujol en el marco de la convocatoria 2022 del “Llegat JMC”. La dotación concedida fue de 40.702,33 €, destinada inicialmente a la realización de un estudio experimental in vivo en modelo murino. En el transcurso del proyecto, parte del presupuesto fue reorientado hacia nuevas actividades científicas complementarias tras la aprobación de una modificación presupuestaria en 2024.

De forma paralela, se contó con una ayuda semilla de la Fundación Científica de la AECC (ref. IDEAS19135NONE) concedida al Institut Químic de Sarrià, con una dotación de 20.000 €, destinados al estudio in vitro e in vivo de los efectos de la PIT.

Parte del trabajo experimental ha sido desarrollado asimismo en el marco del subproyecto *PhotoSMS* (PID2020-115801RB-C22), financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación dentro de la convocatoria de proyectos I+D+i 2020. El presupuesto total asignado fue de 124.740 €, destinados a la evaluación de sistemas fototeranósticos autoensamblados mediante modelos celulares y animales, con el cáncer de mama HER2+ como una de las principales indicaciones de estudio.

Adicionalmente, se han recibido cuatro ayudas económicas vinculadas a programas de innovación, por un total de 90.000 €, destinadas a apoyar el desarrollo de una tecnología derivada del proyecto. El detalle de estas ayudas y del proyecto asociado se muestra en el apartado **9.1. Proyecto de Innovación: SNIPer**.

En conjunto, el proyecto ha contado con una financiación total de 275.442,33 €.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de financiación	Fuente/Programa	Entidad financiadora	Importe
Investigación	Llegat JMC 2022	HUGTiP	40 702,33 €
Investigación	AECC Ayuda Semilla	AECC	20 000 €
Investigación	Proyectos I+D+i 2020	Ministerio de Ciencia e Innovación	124 740 €
Innovación	Programa HEEP	HUGTiP	15 000 €
Innovación	Programa GrowInn	IGTP	5 000 €
Innovación	Indústria del Coneixement – Modalitat Llabor	Generalitat de Catalunya - AGAUR	20 000 €
Innovación	Caixa Impulse – Fase 1	Fundación “La Caixa”	50 000€
Total			275 442, 3 €

**Tabla 3.** Financiación total recibida para el desarrollo del proyecto.

The background of the page features a marbled paper pattern with organic, swirling shapes in shades of black, grey, and white. A large, irregular teal-colored shape is overlaid on the top half of the page, partially obscuring the marbled pattern. The text '6. RESULTADOS' is centered within the teal area.

## **6. RESULTADOS**



# 6. RESULTADOS

## 6.1. ESTUDIO EXPERIMENTAL

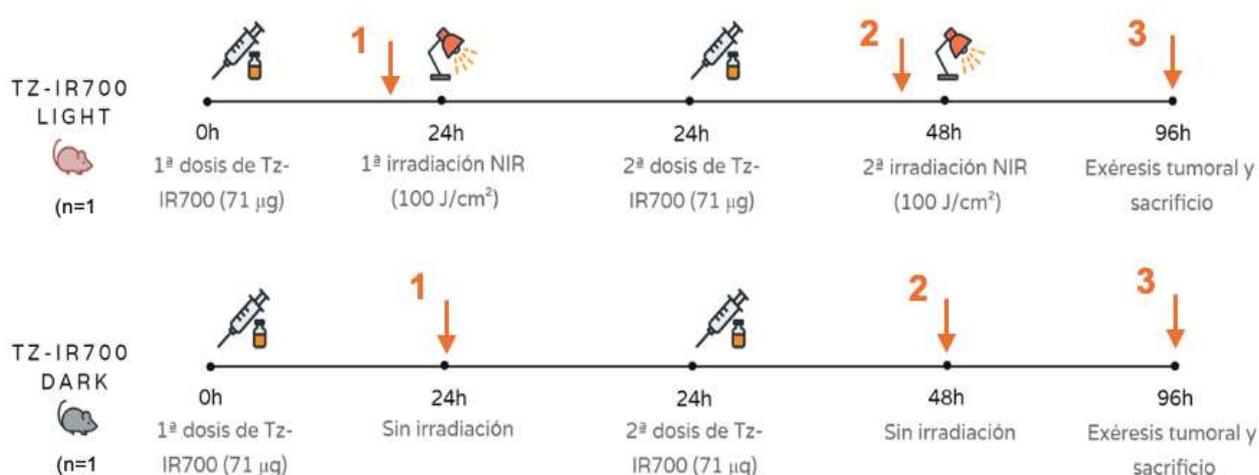
### 6.1.1. EVALUACIÓN DEL EFECTO TERAPÉUTICO DEL TRATAMIENTO CON Tz-IR700 Y LUZ NIR

Durante todo el protocolo de experimentación el crecimiento tumoral se evaluó mediante mediciones seriadas del MTD. En el grupo “Tz-IR700 Light” se observó una reducción progresiva del MTD, con una media inicial de 4,300 mm, que descendió a 3,737 mm tras la primera irradiación y a 3,260 mm tras la segunda. En cambio, el grupo “Tz-IR700 Dark” presentó un crecimiento continuo, con una media inicial de 4,103 mm que aumentó a 4,646 mm y 5,220 mm en las mediciones sucesivas. El análisis descriptivo de las mediciones tumorales se muestra en la **Tabla 4**. La **Figura 8** sitúa las mediciones tomadas dentro de la cronología del protocolo experimental.

Puntos temporales	Grupo	N	Media MTD (mm)	DE	Mínimo MTD (mm)	Máximo MTD (mm)
(1) <b>Antes de la PIT.</b> 24h tras la inyección del PIC en ambos grupos, justo antes de la irradiación NIR al grupo “Light” y de la segunda administración del PIC a ambos grupos	Tz-IR700 Light	16	4,300	1,424	2,40	6,79
	Tz-IR700 Dark	15	4,103	1,808	0	6,28
(2) <b>Tras 1 sesión de PIT.</b> 24h tras la irradiación al grupo “Light” y de la segunda administración del PIC en ambos grupos, justo antes de la segunda irradiación al grupo “Light”	Tz-IR700 Light	16	3,737	1,224	1,80	5,54
	Tz-IR700 Dark	15	4,646	1,717	1,89	7,19
(3) <b>Tras 2 sesiones de PIT.</b> 24h tras la segunda irradiación al grupo “Light”	Tz-IR700 Light	16	3,26	1,515	0	5,89
	Tz-IR700 Dark	15	5,22	1,885	2,33	8,56

**Tabla 4.** Análisis descriptivo de las mediciones en mm del MTD en tres puntos temporales diferentes. Se indican media, desviación estándar (DE), y valor mínimo y máximo del MTD medido.

## 6. RESULTADOS



**Figura 8.** Cronograma experimental que representa los tres puntos temporales en los que se realizaron las mediciones tumorales analizadas en la Tabla 3.

Con el objetivo de analizar el efecto del tratamiento a lo largo del tiempo y entre grupos, se aplicó un modelo de ANOVA factorial mixto. El análisis global mostró un efecto significativo del tratamiento sobre la evolución del MTD ( $F(2,29) = 30.938$ ,  $p < 0.05$ ,  $\eta^2 = 0.516$ ). En el grupo “Tz-IR700 Light”, la reducción media del MTD fue de  $0.56 \pm 0.18$  mm tras la primera irradiación y de  $1.03 \pm 0.23$  mm al finalizar el protocolo. En el grupo “Tz-IR700 Dark”, las diferencias fueron negativas en todos los intervalos ( $-0.54 \pm 0.17$  mm y  $-1.12 \pm 0.22$  mm), indicando un crecimiento sostenido.

A continuación, se realizó una comparación por pares dentro de cada grupo experimental para analizar las diferencias entre momentos concretos del tratamiento.

En el grupo tratado con NIR-PIT se identificaron diferencias significativas en todas las comparaciones: entre el inicio del protocolo y la primera sesión ( $0,563 \pm 0,178$ ), entre la primera y la segunda sesión ( $0,470 \pm 0,175$ ), y entre el inicio y el final del tratamiento ( $1,033 \pm 0,231$ ), lo que indica una disminución progresiva del MTD tras cada irradiación.

En el grupo control (sin irradiación), también se observaron diferencias significativas, aunque en sentido opuesto, con incrementos del MTD en cada comparación:  $-0,543 \pm 0,173$  entre el inicio y la primera medición intermedia,  $-0,574 \pm 0,169$  entre la primera y la segunda, y  $-1,117 \pm 0,224$  entre el inicio y el final del protocolo. Estos datos reflejan un crecimiento tumoral sostenido en ausencia de fototerapia.

La potencia estadística del análisis fue elevada en ambos grupos ( $\geq 0,97$ ). Los resultados se presentan en la **Tabla 5**.

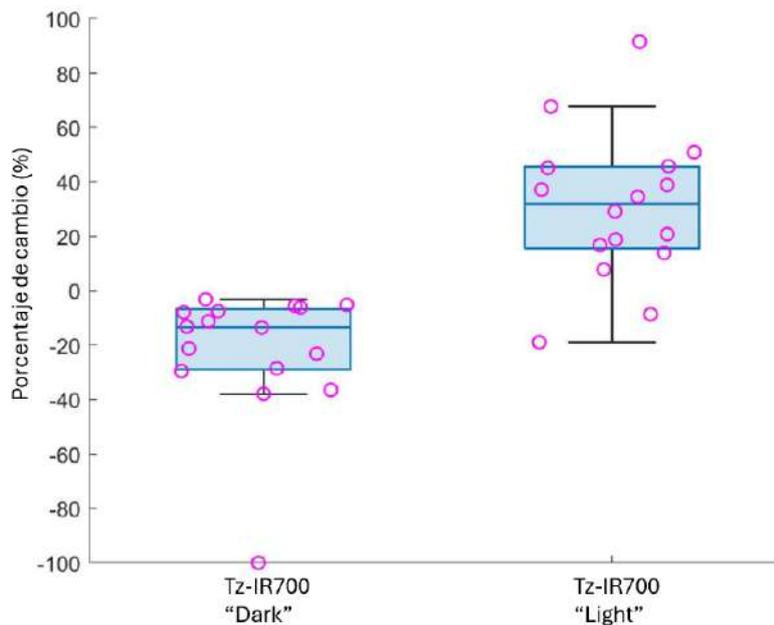
## 6. RESULTADOS

		Antes de la PIT – Tras 1 sesión de PIT	Tras 1 sesión de PIT – Tras 2 sesiones de PIT	Antes de la PIT - Tras 2 sesiones de PIT	Potencia
MTD (mm)	Tz-IR700 Dark	-0,543 (0,173)*	-0,574 (0,169)*	-1,117 (0,224)*	0,991
	Tz-IR700 Light	0,563 (0,178)*	0,470 (0,175)*	1,033 (0,231)*	0,970

**Tabla 5.** Comparación por pares del ANOVA factorial mixto entre grupos en relación con las distintas fases del tratamiento, con resultados expresados como la diferencia de medias del MTD entre puntos temporales, junto con la desviación estándar entre paréntesis. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con un asterisco.

Tras identificar diferencias estadísticamente significativas en el MTD entre grupos, y con el objetivo de representar gráficamente y cuantificar esta variación, se calculó una nueva variable denominada “Porcentaje de cambio”, considerando únicamente las mediciones correspondientes a los puntos “Antes de LA PIT” y “Tras 2 sesiones de PIT”. Se realizó una prueba t de Student para comparar los grupos en función de dicha variable, observándose una diferencia significativa entre el “Porcentaje de cambio” en el grupo tratado con NIR-PIT (Media = 30,69; DE = 27,43) y el grupo control sin irradiación (Media = -21,88; DE = 23,77),  $t(30) = -5,794$ ;  $p < 0,05$ .

El **Gráfico 2** muestra la distribución de estos valores y la dispersión de los datos en ambos grupos.



**Gráfico 2.** Porcentaje de cambio (%) del volumen tumoral entre las mediciones “Antes de la PIT” y “Tras 2 sesiones de PIT” expresado mediante un diagrama de cajas y bigotes. La línea central de cada caja indica la mediana; los límites de la caja, los percentiles 25 y 75 (rango intercuartílico); y las líneas (bigotes), el rango dentro de 1,5 veces el rango intercuartílico. Los puntos individuales (círculos magenta) representan el valor correspondiente a cada animal. Mientras que en el grupo “Tz-IR700 Dark” la mayoría de los animales presentan un incremento tumoral (valores negativos), en el grupo “Tz-IR700 Light” se observa una tendencia clara hacia la regresión tumoral (valores positivos), con menor dispersión hacia cambios negativos.

### 6.1.2. FLUORESCENCIA IN VIVO Y VISUALIZACIÓN TUMORAL

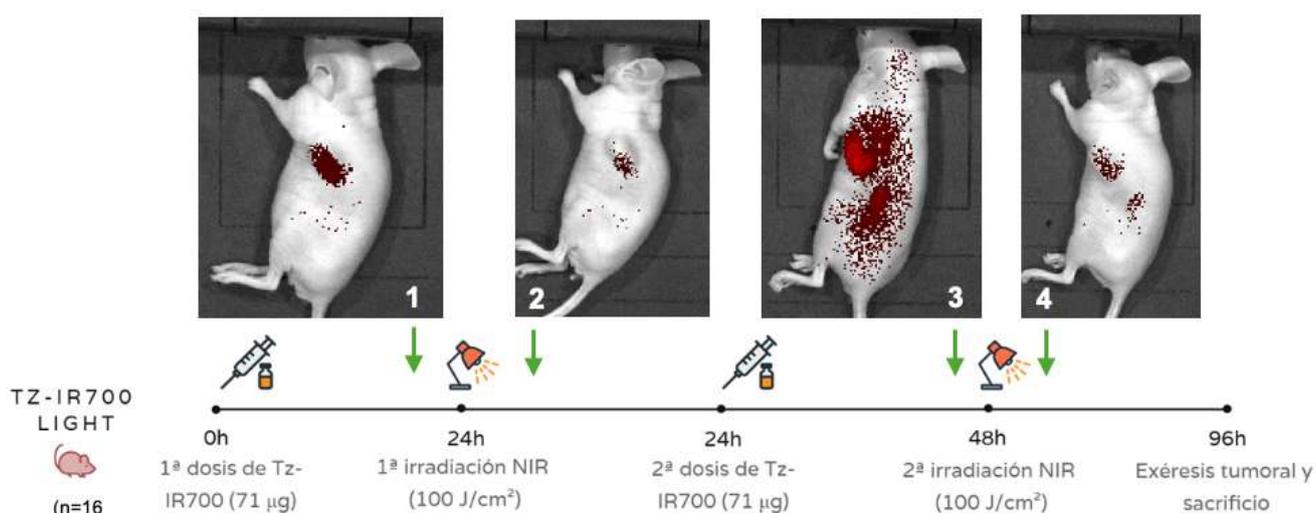
La evolución de la fluorescencia se documentó de forma secuencial en todos los animales mediante adquisición de imagen in vivo con el sistema IVIS®, siguiendo los cuatro puntos de adquisición definidos en la metodología (apartado 5.1.5.3. Estudios de fluorescencia in vivo).

De acuerdo con los resultados obtenidos en los estudios piloto, el punto de adquisición inicial se estableció a las 24 h de la inyección del fármaco (momento de máxima captación). Los parámetros de adquisición fueron los siguientes: filtro de excitación de 675 nm, filtro de emisión Cy5.5, exposición de 4 s, f/2 y campo de visión de 12,5 cm.

Este protocolo permitió correlacionar la intensidad fluorescente con las distintas fases del tratamiento. En todos los animales se observó una captación fluorescente localizada en la región tumoral. No obstante, dada la morfología de los ratones BALB/c nude, fue posible visualizar también el trayecto del fármaco desde la cavidad peritoneal hasta los tumores subcutáneos, siendo el foco principal de captación el propio tumor.

Se evidenció un patrón de disminución progresiva de la fluorescencia tras cada sesión de NIR-PIT, en consonancia con la activación fotoquímica del compuesto y su degradación posterior durante la secuencia terapéutica aplicada.

La **Figura 9** muestra un ejemplo representativo de las imágenes adquiridas en un animal del grupo “Tz-IR700 Light”.

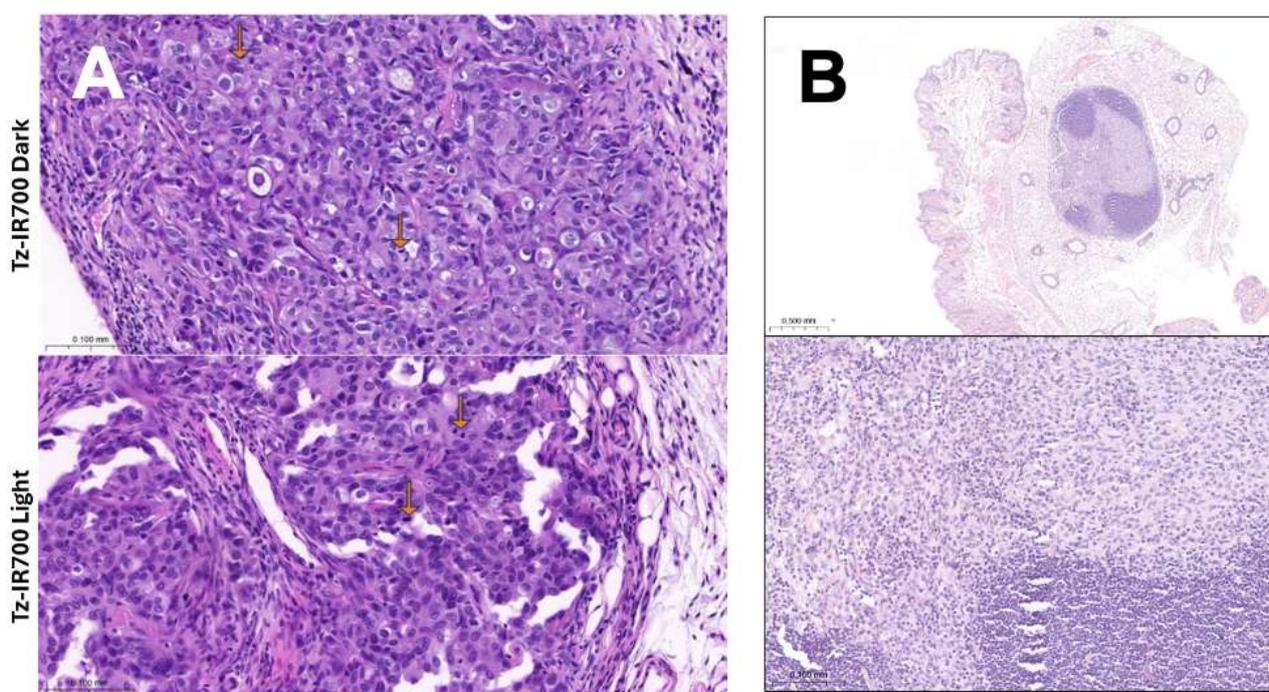


**Figura 9.** Evolución de la fluorescencia tumoral in vivo tras la administración secuencial del tratamiento en un animal del grupo Tz-IR700 Light

### 6.1.3. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

El análisis morfológico de los tumores reveló características compatibles con carcinoma de mama grado 3, según el sistema de gradación de Nottingham modificado. En todos los casos se observó un patrón de crecimiento sólido, pleomorfismo nuclear acusado y una elevada actividad mitótica (**Figura 10A**).

En tres tumores del grupo “Tz-IR700 Light” se identificó una reacción inflamatoria nodular, compuesta principalmente por linfocitos e histiocitos. En dos de estos casos, el examen de múltiples cortes histológicos no permitió identificar tejido tumoral viable (**Figura 10B**). Ninguna de estas alteraciones inflamatorias estuvo presente en los tumores correspondientes al grupo “Tz-IR700 Dark”.



**Figura 10. Estudios histológicos.**

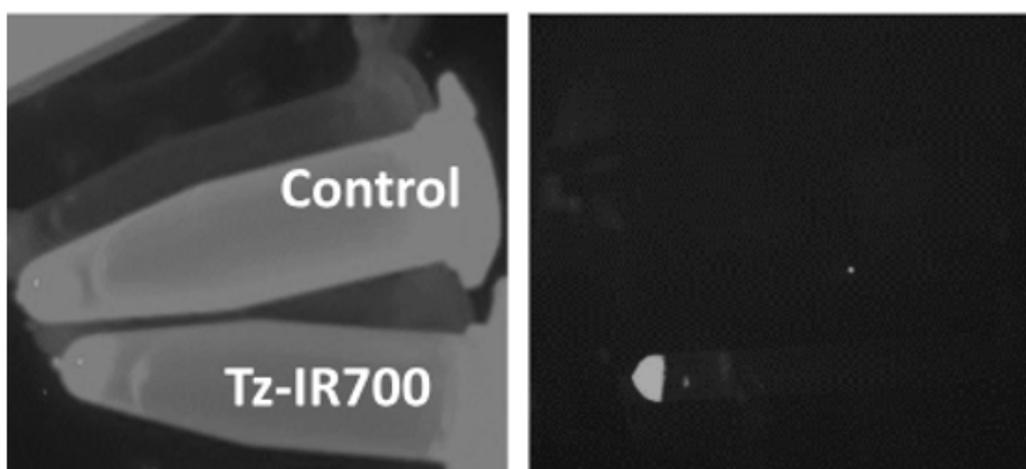
(A) Tumor grado 3 con pleomorfismo nuclear marcado, patrón de crecimiento sólido y elevada tasa mitótica (flecha).  
 (B) Reacción inflamatoria en tumores del grupo Tz-IR700 Light.

El análisis inmunohistoquímico no mostró diferencias significativas entre grupos en la expresión de p53 ( $100 \pm 0,0$  % en Tz-IR700 Dark frente a  $97,9 \pm 1,0$  % en Tz-IR700 Light), BCL-2 ( $0 \pm 0,0$  % en ambos grupos) ni HER2 (expresión 3+ en todos los casos). No obstante, el índice de proliferación celular medido mediante Ki67 fue inferior en el grupo tratado ( $42,4 \pm 4,9$  %) en comparación con el grupo no irradiado ( $51,1 \pm 4,1$  %), lo que sugiere un efecto antiproliferativo asociado al tratamiento.

#### 6.1.4. ESTUDIOS DE FLUORESCENCIA CON CÁMARA DISEÑADA PARA CAPTACIÓN DE ICG

Durante el desarrollo experimental, se realizaron ensayos preliminares dirigidos a explorar la utilidad del conjugado Tz-IR700 como herramienta de visualización tumoral intraoperatoria. Para ello, se empleó el sistema PDE-Neo (*Hamamatsu*), equipado con filtro de fluorescencia compatible para visualización de verde de indocianina (ICG, *Indocyanine Green*) y conectado a un monitor para la visualización de imágenes, utilizado habitualmente en entornos clínicos.

Inicialmente, la Dra Mireia Jordà realizó pruebas sobre pellets celulares de la línea HCC1954, incubados con Tz-IR700 a una concentración de 2  $\mu\text{M}$  (equivalente en IR700) durante 6 horas a 37 °C. Tras el periodo de incubación, los pellets fueron lavados y expuestos a iluminación NIR ( $660 \pm 10 \text{ nm}$ ) mientras se activaba el filtro ICG. Bajo estas condiciones, se observó una señal fluorescente localizada, confirmando la posibilidad de detección del conjugado en un entorno experimental simplificado y sirviendo como base para su aplicación posterior en modelo murino (**Figura 11**).

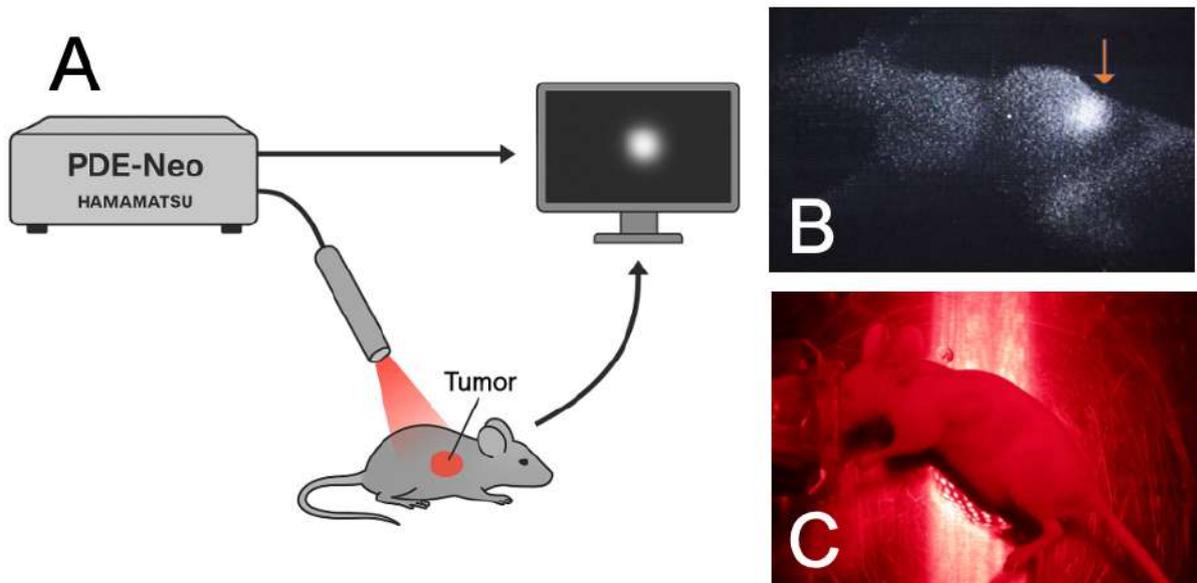


**Figura 11.** Pellets celulares de la línea HCC1954 incubados con Tz-IR700 (2  $\mu\text{M}$ , 6 h, 37 °C) y control sin tratamiento. Imagen adquirida con el sistema PDE-Neo bajo iluminación NIR ( $660 \pm 10 \text{ nm}$ ) con el filtro ICG activado. Se observa fluorescencia localizada únicamente en el pellet tratado, lo que confirma la captación del conjugado y su detección mediante el sistema óptico, sirviendo como prueba de concepto previa a los estudios in vivo.

En el modelo in vivo, se evaluó la captación tumoral en ratones portadores de implantes subcutáneos de células HCC1954, 24 horas tras la administración intraperitoneal del conjugado. La masa tumoral era visible a simple vista en condiciones basales, y se detectó fluorescencia al activar el filtro ICG del PDE-Neo durante la aplicación de la luz NIR. Si bien la señal no presentaba una delimitación nítida o de alto contraste, sí se apreció una captación localizada en la región tumoral, diferenciable del tejido adyacente (**Figura 12**).

## 6. RESULTADOS

Aunque esta aplicación no formaba parte de los objetivos principales del estudio, los resultados se consideran de interés por su posible aplicabilidad clínica. La fluorescencia observada, aun siendo modesta en intensidad y definición, sugiere que el conjugado Tz-IR700 podría ofrecer utilidad como marcador intraoperatorio, especialmente si se optimizan las condiciones de dosificación y los parámetros del sistema óptico. Estos hallazgos preliminares abren la puerta a futuros estudios centrados en evaluar de forma específica su aplicación en cirugía guiada por fluorescencia.



**Figura 12.** Visualización tumoral mediante el sistema PDE-Neo durante la aplicación de NIR-PIT en modelo murino.

**(A)** Esquema del sistema PDE-Neo. El dispositivo consta de una unidad principal conectada a una fuente de luz NIR, que a su vez capta imágenes en tiempo real, y a un monitor. El sistema emite la luz hacia el área tumoral en el ratón, previamente tratado con Tz-IR700. La señal fluorescente emitida por el tumor es captada en tiempo real y visualizada en el monitor mediante el filtro ICG incorporado.

**(B)** Imagen intraoperatoria en visión directa durante la aplicación de luz NIR.

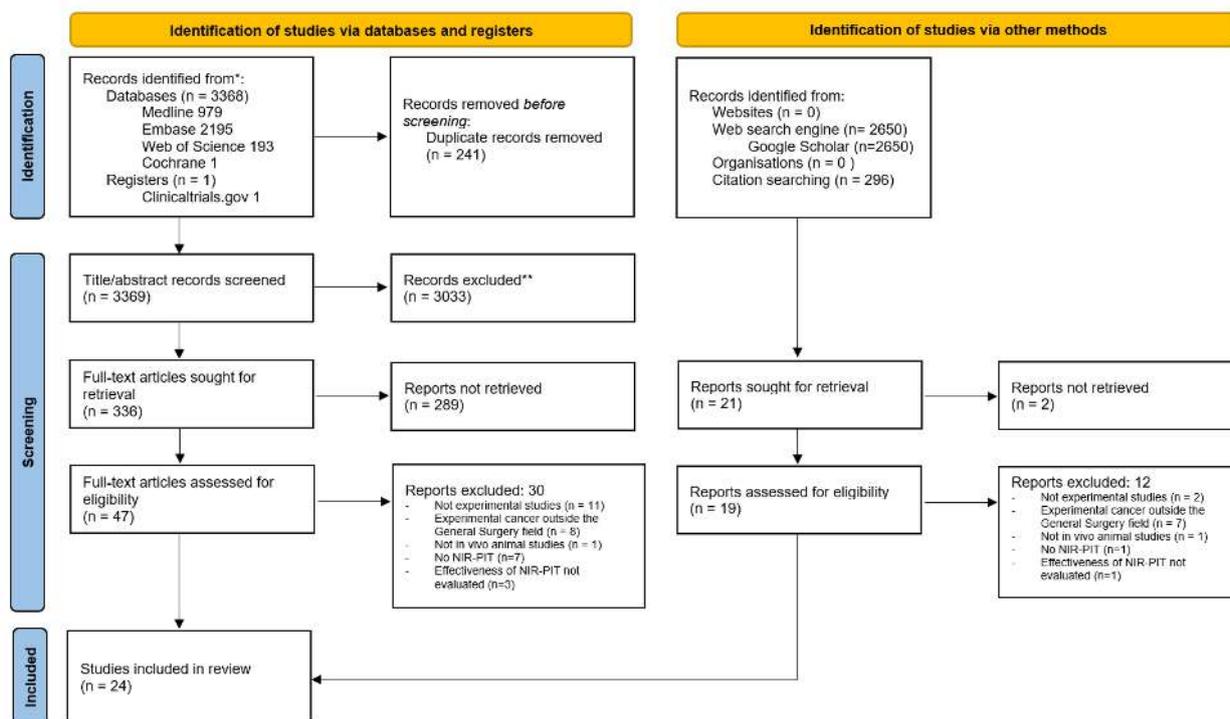
**(C)** Imagen simultánea bajo filtro ICG del PDE-Neo, donde se aprecia captación fluorescente localizada en la región tumoral (señalada con flecha), diferenciable del tejido adyacente.



## 6.2. REVISIÓN SISTEMÁTICA

### 6.2.1. RESULTADOS GENERALES

La búsqueda sistemática identificó un total de 6.315 estudios, de los cuales únicamente 24 cumplieron con todos los criterios de inclusión predefinidos y fueron finalmente seleccionados para el análisis cualitativo. La mayor reducción en el número de estudios elegibles se produjo durante la fase de cribado por título, momento en el que se excluyeron numerosos registros por no estar relacionados con el objeto de estudio. Esta alta tasa de exclusión inicial se atribuye a la utilización de acrónimos amplios como “NIR” o “PIT” dentro de la estrategia de búsqueda (ver **Tabla 1** del apartado **5.2.2. Estrategia de búsqueda y criterios de inclusión**), que, si bien aumentaron la sensibilidad de la misma, también capturaron entradas irrelevantes en las que dichos términos aparecían como fragmentos léxicos. El proceso de selección final se llevó a cabo siguiendo el diagrama de flujo de PRISMA, que se recoge en la **Figura 13**.



**Figura 13.** Diagrama de flujo PRISMA.

Los estudios incluidos fueron publicados entre 2012 y 2024. La mayoría se desarrollaron en Estados Unidos (15/24, 62,5 %) y Japón (7/24, 29,2 %), con un estudio procedente de China y otro de los Países Bajos.<sup>102,103</sup>

## 6. RESULTADOS

Todos los trabajos seleccionados fueron de carácter preclínico y emplearon exclusivamente modelos murinos, de los cuales el 91,7 % (22/24) emplearon ratones inmunodeficientes y solo dos utilizaron modelos inmunocompetentes.<sup>102,104</sup>

La **Tabla 6** recoge de forma resumida las principales características y resultados de los estudios incluidos, detallando la localización tumoral, las dianas moleculares evaluadas, los PIC utilizados y los efectos experimentales observados, incluyendo tanto efecto de la terapia sobre el tumor como datos sobre la recurrencia.

Localización anatómica de la neoplasia	Célula diana	Receptor diana	PIC
<b>Esófago</b>	CAFs FAP+ en carcinoma escamoso esofágico humano (TE4)	FAP	Anti-FAP-IR700
	CAFs FAP+ en carcinoma esofágico humano HER2+ (TE4-HER2)	FAP	Anti-FAP-IR700
	CAFs FAP y células tumorales HER2+ o EGFR+ en carcinoma esofágico humano (TE8-EGFR y TE4-HER2)	FAP y EGFR/HER2	Anti-FAP-IR700 + Anti-EGFR // Anti-FAP-IR700 + Anti-HER2 (Tratamiento dual)
<b>Estómago</b>	Carcinoma gástrico humano (MKN-45-luc)	CEA	Anti-CEA-IR700
	Implantes peritoneales de cáncer gástrico HER2+ (N87-GFP-luc)	HER2	Trastuzumab-IR700
	Implantes peritoneales de cáncer gástrico HER2+ (N87-GFP-luc)	HER2	Trastuzumab-IR700
	Implantes peritoneales de cáncer gástrico HER2+ (N87-GFP-luc)	HER2	Trastuzumab-IR700
	Metástasis óseas de cancer gástrico (N87-GFP)	EGFR-1	Panitumumab-IR700
	Células tumorales GIST-T1	Dominio extracelular de c-kit: 12A8	Anti12A8-IR700
<b>Páncreas</b>	Línea celular de cáncer de páncreas humano BxPC-3 con expresión de GFP	Moléculas de adhesión celular relacionadas con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM)	Anti CEACAM (6G5j)-IR700
	BxPC3-GFP	CEA	Anti-CEA-IR700
	Cáncer pancreático (SDXPC1 y SDXPC2)	CEA	Anti-CEA-IR700
	BxPC3-GFP	CEA	Anti-CEA-IR700
	Adenocarcinoma ductal pancreático (tumores PDAC299) + CAF FAP+	FAP	Anti-FAP(28H1)-IR700

## 6. RESULTADOS

Evaluación del efecto antitumoral	Efecto obtenido	Recurrencia	Ref.
Crecimiento tumoral a lo largo del tiempo (volumen)	Crecimiento enlentecido	100% (enlentecida en el grupo tratado)	107
Crecimiento tumoral a lo largo del tiempo (volumen)	Supresión de crecimiento	-	108
Crecimiento tumoral a lo largo del tiempo (volumen)	Supresión de crecimiento	100% (enlentecida en el grupo tratado)	109
Cambios en la señal BLI	Reducción hasta niveles de señal de fondo	100% (enlentecida en el grupo tratado)	110
Cambios en la señal de BLI	Disminución de la señal de BLI	100% (enlentecida en el grupo tratado)	111
Cambios en la señal de BLI	Disminución de la señal de BLI	-	112
Volumen tumoral y GFP en tiempo real	Disminución del volumen tumoral y de la GFP	60%	113
Cambios en la bioluminiscencia por luciferasa	Disminución de la señal de luciferasa	-	114*
Cambios en volumen y tamaño tumoral	Desaparición tumoral completa	57.14%	115
Crecimiento tumoral a lo largo del tiempo	Crecimiento enlentecido	50%	116
Crecimiento tumoral a lo largo del tiempo (volumen basado en imagen GFP)	Desaparición completa	14,3%	117
Cambios en la señal de fluorescencia	Indetectable tras el tratamiento	28,6%	118
Crecimiento tumoral a lo largo del tiempo (volumen basado en imagen GFP)	Indetectable tras el tratamiento	100% (enlentecida en el grupo tratado)	119
Cambios en la señal fluorescente (fluorescencia del PIC)	Desaparición de la fluorescencia tras la exposición	-	104

## 6. RESULTADOS

Localización anatómica de la neoplasia	Célula diana	Receptor diana	PIC
<b>Colorrectal</b>	Línea celular de cáncer de colon LS174T	CEA	Anti-CEA(M5A)-IR700
	Línea celular A431 (EGFR+)	EGFR-1	Panitumumab-IR700
	Línea celular A431 (EGFR+)	EGFR-1	Panitumumab-IR700
	Adenocarcinoma colónico murino + fibroblastos (MC38+MEF)	FAP	Anti-FAP-IR700
	Línea celular A431 (EGFR+)	EGFR-1	Panitumumab-IR700
<b>Mama</b>	Metástasis óseas de línea celular de cáncer de mama triple negativo humano (MDA-MB-468-GFP/luc)	EGFR-1	Panitumumab-IR700
	Cáncer de mama murino 4T1 y línea celular de macrófagos murinos RAW264.7	CD206	Anti-CD206-IR700
	Células humanas de cáncer de mama MDA-MB-231-FAP	FAP	Anti-FAP-IR700
	Células de cáncer de mama humano BT-474	HER2	Trastuzumab-IR700
	Cáncer de mama triple negativo: MDAMB231 (EGFR moderado) y TNBC (EGFR alto)	EGFR	Cetuximab-IR700
	MDA-MB-468luc	EGFR	Panitumumab-IR700

**Tabla 6.** Características principales y resultados de los estudios incluidos, organizados por localización tumoral. El artículo marcado con (\*) se repite en la tabla porque presenta resultados de dos modelos neoplásicos distintos.

Abreviaturas: PIC = Fotoinmunoconjugado CAF = Fibroblasto asociado al cáncer; FAP = Proteína activadora de fibroblastos; BLI = Imagen de bioluminiscencia; GFP = Proteína fluorescente verde; ICG = Verde de indocianina; CEA = Antígeno carcinoembrionario; EGFR = Receptor del factor de crecimiento epidérmico; HER2 = Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano; CD206 = Receptor de manosa de macrófagos; NIR = Infrarrojo cercano.

## 6. RESULTADOS

Evaluación del efecto antitumoral	Efecto obtenido	Recurrencia	Ref.
Cambios en la señal fluorescente y en el volumen tumoral	Disminución de la señal fluorescente y del volumen tumoral	100% (enlentecida en el grupo tratado)	120
Intensidad de señal ICG	Disminución de la señal ICG	-	121
Tiempo de vida de la fluorescencia	Acortamiento del tiempo de vida de la fluorescencia	-	122
Volumen tumoral	Disminución del volumen tumoral	100% (enlentecida en el grupo tratado)	106
Volumen tumoral	Disminución del volumen tumoral	20%	123
Cambios en la bioluminiscencia por luciferasa	Disminución de la señal de luciferasa	-	114*
Crecimiento tumoral a lo largo del tiempo (volumen tumoral relativo)	Crecimiento enlentecido	100% (retrasada en el grupo tratado)	105
Crecimiento tumoral a lo largo del tiempo (volumen)	Inhibición del crecimiento tumoral	100% (enlentecida en el grupo tratado)	124
Señal de fluorescencia	Disminución de la señal de fluorescencia	-	125
Crecimiento tumoral a lo largo del tiempo (volumen)	Inhibición del crecimiento tumoral	62%	126
Cambios en la señal de BLI	Disminución de la señal de BLI	100% (enlentecida en el grupo tratado, dependiente de la dosis)	127

## 6. RESULTADOS

En relación con los modelos de implantación tumoral, la estrategia más común fue la inyección subcutánea de células tumorales, utilizada en el 75 % de los estudios (18/24). Una proporción menor, correspondiente al 20,8 % (5/24), empleó modelos de implantación ortotópica mediante cirugía, mientras que un único estudio (4,2 %) aplicó un modelo de inyección intraperitoneal con el objetivo de simular una carcinomatosis peritoneal.<sup>110</sup>

Las líneas celulares empleadas en cada estudio se detallan en la **Tabla 6**. En muchos casos, estas líneas fueron modificadas genéticamente para expresar luciferasa o proteínas fluorescentes como GFP (Green Fluorescent Protein), lo que permitió la monitorización dinámica de la carga tumoral mediante técnicas de imagen por bioluminiscencia o fluorescencia.

Todos los estudios incluidos emplearon IR700 como PS conjugado a anticuerpos monoclonales dirigidos frente a diversas proteínas tumorales y estromales, entre las que se encuentran CEA, FAP, EGFR, HER2, CD206 y c-kit. Los PIC se administraron de forma sistémica y, habitualmente, fueron seguidos de una irradiación con luz NIR transcurridas 24 horas. Las dosis de luz aplicadas variaron entre los 10 y los 270 J/cm<sup>2</sup>, en función del protocolo de cada estudio. En diversos estudios se optó por administrar sesiones múltiples de irradiación, lo que permitió alcanzar una dosificación acumulada de luz y potenciar el efecto terapéutico.<sup>103–107,110–113,118,119,121,124</sup>

La totalidad de los estudios incluidos (24/24) evidenciaron eficacia terapéutica de la NIR-PIT, definida como la inhibición o detención del crecimiento tumoral. La evaluación de los resultados fue heterogénea. En 13/24 estudios (54,2 %) se midió el volumen tumoral, ya fuera mediante medición directa con regla milimetrada o a través de análisis volumétrico basado en la señal de GFP. Los 11/24 estudios restantes (45,8 %) valoraron la respuesta al tratamiento a partir de señales de imagen, incluyendo bioluminiscencia de luciferasa, intensidad fluorescente del PIC o técnicas de imagen basadas en el tiempo de vida fluorescente. Estas metodologías permitieron una monitorización tumoral longitudinal no invasiva.

Determinados grupos experimentales presentaron tasas de respuesta tumoral completa, destacando aquellos que recibieron irradiaciones repetidas o estrategias combinadas. La recurrencia tumoral se analizó en 17/24 estudios (70,8 %). En 10/24 de ellos (41,7 %) se observó que todos los animales tratados presentaron recurrencia, si bien esta se produjo de forma sistemáticamente más tardía que en los grupos control. En los estudios restantes, la tasa de recurrencia fue menor o se relacionó con la dosis de luz administrada. La **Tabla 6** muestra un resumen detallado de los patrones de respuesta tumoral y recurrencia identificados.

El análisis histopatológico se realizó en 17/24 estudios (70,8 %), donde se identificaron áreas de necrosis tumoral tras el tratamiento con NIR-PIT. La magnitud de dicha necrosis guardó una relación directa con la dosis de luz empleada: las fluencias altas (100–150 J/cm<sup>2</sup>) provocaron una necrosis extensa con mínima tumoración residual, mientras que las fluencias bajas (alrededor de 10 J/cm<sup>2</sup>) produjeron únicamente efectos parciales.<sup>119</sup>

## 6. RESULTADOS

La toxicidad y los efectos adversos fueron evaluados en el 41,7 % de los estudios incluidos (10/24), sin que se documentaran efectos secundarios graves ni toxicidad sistémica. En un 29,2 % de los trabajos (7/24) se confirmó la fluorescencia intrínseca de los PIC, independientemente del uso de marcadores fluorescentes exógenos como la GFP o la luciferasa, lo que refuerza su potencial aplicabilidad como herramienta para cirugía guiada por fluorescencia.

La calidad metodológica se valoró mediante la *CAMARADES Checklist for Quality Assessment*, cuyo resumen se presenta en la **Tabla 7**. El 96 % de los estudios (23/24) habían sido publicados en revistas revisadas por pares y el 100 % (24/24) describían con claridad los modelos animales utilizados. El 79 % (19/24) realizó evaluación de resultados de forma enmascarada, y el 71 % (17/24) incluyó el cálculo del tamaño muestral, la adhesión a protocolos de bienestar animal y la declaración de conflictos de interés. Sin embargo, solo el 50 % (12/24) informó con detalle las mediciones tumorales, los regímenes de dosificación o la asignación aleatoria, lo que evidencia áreas susceptibles de mejora en futuros diseños experimentales.

Referencia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
107	X		X			X	X		X	X
108	X		X	X		X	X		X	X
109	X		X	X		X	X		X	X
110	X	X	X	X		X	X		X	
111			X	X		X	X		X	X
112	X			X		X	X		X	X
113	X		X	X		X	X		X	X
114	X			X		X	X		X	X
115	X		X	X		X	X		X	X
116	X	X		X		X	X		X	
117	X			X		X	X		X	X
118	X			X		X	X		X	
119	X			X		X	X		X	X
104	X	X		X		X	X		X	X
120	X			X		X	X		X	
121	X		X	X		X	X		X	X
122	X			X		X	X		X	X
106	X		X	X		X	X		X	X
123	X		X	X		X	X		X	X
105	X			X		X	X		X	X
124	X		X	X		X	X		X	X
125	X		X	X		X	X		X	X
126	X		X	X		X	X		X	X
127	X		X	X		X	X		X	X

**Tabla 7.** Evaluación de la calidad metodológica según el CAMARADES Checklist.

Cada fila corresponde a un estudio individual incluido, y cada columna representa un ítem del CAMARADES Checklist. Una marca ("x") indica que el criterio se cumplió; las celdas en blanco indican que el ítem no se cumplió o no fue informado. La lista incluye los siguientes ítems: (1) publicación revisada por pares; (2) medidas tumorales detalladas; (3) agrupación aleatorizada; (4) régimen de dosificación informado; (5) evaluación ciega de los resultados; (6) dosis de luz informada; (7) descripción clara del modelo animal; (8) cálculo del tamaño muestral; (9) cumplimiento de las normativas sobre bienestar animal; y (10) declaración de posibles conflictos de interés.

## 6. RESULTADOS

El riesgo de sesgo fue evaluado mediante la herramienta SYRCLE. El resumen detallado de la valoración correspondiente a cada estudio incluido se presenta en la **Tabla 8**. La mayoría de los estudios (87,5 %, 21/24) informó de manera adecuada la agrupación de los individuos y su ocultamiento. En el 62,5 % de los casos (15/24) se confirmaron características basales equilibradas entre los grupos experimentales. No fue posible valorar con precisión los sesgos de rendimiento y detección debido a la falta de información específica en los estudios. Solo el 8,3 % (2/24) abordó de forma explícita la gestión de datos incompletos. Por el contrario, la notificación selectiva de resultados fue adecuadamente controlada en el 91,7 % de los estudios (22/24).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	Reference
Sí	Sí	Sí	?	?	?	?	No	Sí	107
Sí	Sí	Sí	?	?	?	?	No	Sí	108
Sí	Sí	Sí	?	?	?	?	No	Sí	109
Sí	Sí	Sí	?	?	?	?	No	Sí	110
Sí	?	Sí	?	?	?	?	No	Sí	111
Sí	No	Sí	?	?	?	?	No	Sí	112
Sí	Sí	Sí	?	?	?	?	No	Sí	113
No	No	No	?	?	?	?	No	No	114
Sí	Sí	Sí	?	?	?	?	No	Sí	115
Sí	?	Sí	?	?	?	?	No	Sí	116
No	No	No	?	?	?	?	No	Sí	117
Sí	?	Sí	?	?	?	?	No	Sí	118
No	No	No	?	?	?	?	No	Sí	119
No	No	No	?	?	?	?	Sí	Sí	104
Sí	No	Sí	?	?	?	?	No	Sí	120
Sí	Sí	Sí	?	?	?	?	Sí	Sí	121
No	No	No	?	?	?	?	No	Sí	122
Sí	Sí	Sí	?	?	?	?	No	Sí	106
Sí	Sí	Sí	?	?	?	?	No	Sí	123
Sí	No	No	?	?	?	?	No	Sí	105
Sí	Sí	Sí	?	?	?	?	No	Sí	124
Sí	Sí	Sí	?	?	?	?	No	Sí	125
Sí	Sí	Sí	?	?	?	?	No	Sí	126
Sí	Sí	Sí	?	?	?	?	No	Sí	127

**Tabla 8. Valoración del riesgo de sesgo mediante la herramienta SYRCLE.**

Cada fila corresponde a un estudio individual incluido. Cada columna representa un dominio de la herramienta SYRCLE para la evaluación del sesgo de riesgo, numerados de la siguiente manera: (1) generación de la secuencia de agrupación (sesgo de selección); (2) características basales (sesgo de selección); (3) ocultación de la asignación (sesgo de selección); (4) alojamiento aleatorio (sesgo de desempeño); (5) evaluación ciega de los resultados (sesgo de desempeño); (6) evaluación aleatoria de los resultados (sesgo de detección); (7) evaluación ciega de los resultados (sesgo de detección); (8) gestión de datos incompletos (sesgo de desgaste); (9) notificación selectiva de resultados (sesgo de notificación). “Sí” indica bajo riesgo de sesgo, “No” indica alto riesgo de sesgo, y “?” indica riesgo incierto debido a información insuficiente.

### 6.2.2. RESULTADOS POR LOCALIZACIÓN ANATÓMICA

Con fines de interpretación traslacional, los estudios fueron clasificados en cinco grupos según la localización anatómica de la neoplasia a estudio: esófago (3/24), estómago (6/24), páncreas (5/24), colon-recto (5/24) y mama (6/24). Un estudio fue clasificado en dos categorías, al incluir modelos tanto de tumor gástrico como mamario.<sup>112</sup>

En cáncer de esófago, los tres estudios incluidos se centraron en carcinomas escamosos, dirigiendo la terapia hacia el estroma tumoral, en concreto a los fibroblastos asociados al cáncer (CAF, *Cancer Associated Fibroblasts*) que expresan la proteína de activación de fibroblastos (FAP, *Fibroblast Activation Protein*).<sup>105–107</sup> En todos se objetivó inhibición del crecimiento tumoral y retraso en la recurrencia en los grupos tratados con NIR-PIT. En dos de ellos se empleó una estrategia de doble diana, combinando el tratamiento dirigido a CAF con la terapia específica frente a células tumorales.

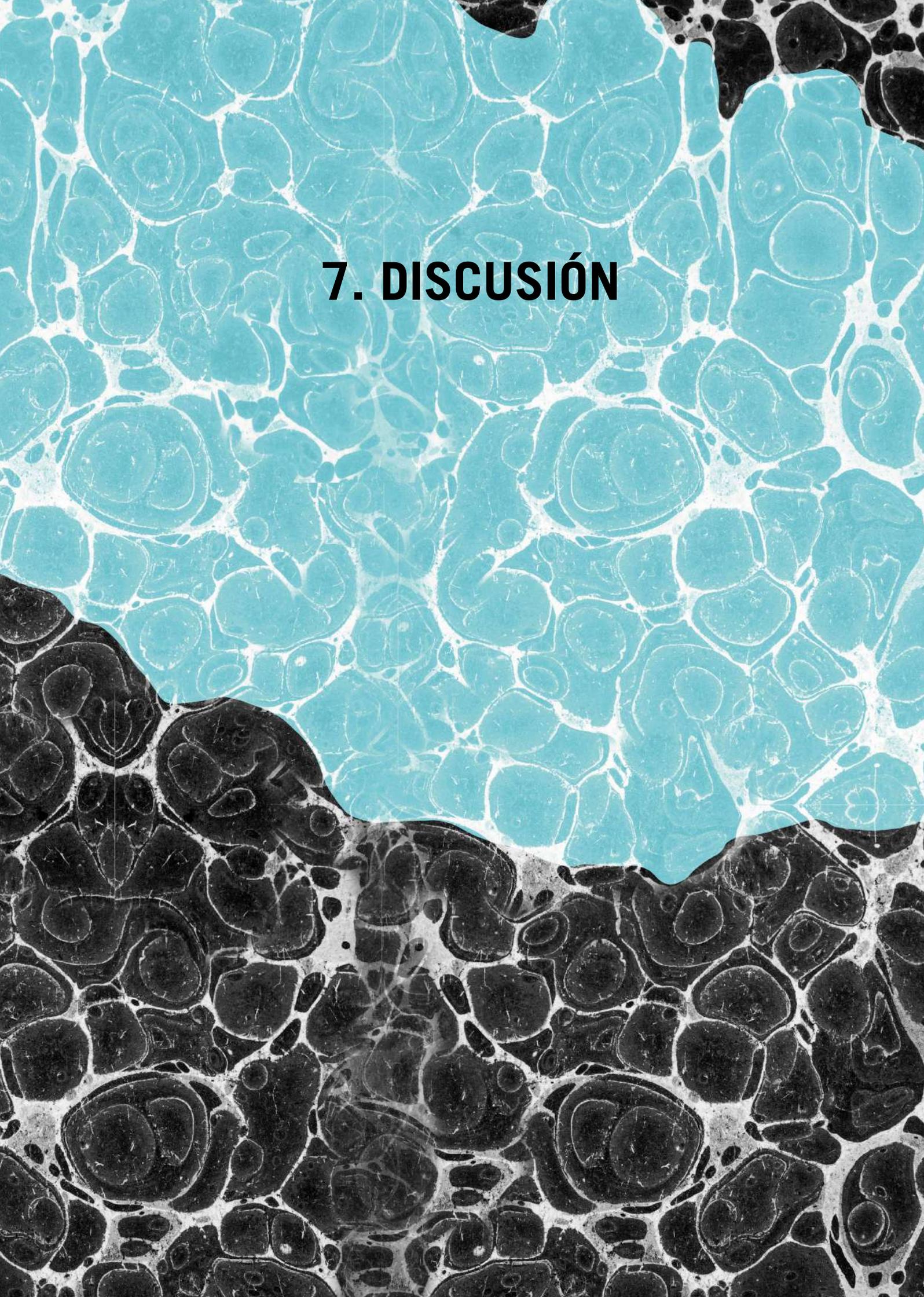
En cáncer gástrico, se incluyeron seis estudios. Tres abordaron la carcinomatosis peritoneal mediante NIR-PIT dirigida al receptor HER2, observándose en todos ellos una reducción de la progresión tumoral.<sup>110–112</sup> Uno de estos estudios alcanzó una tasa de respuesta completa del 40 % en modelos subcutáneos con terapia repetida.<sup>111</sup> Otro estudio demostró eficacia en el tratamiento de metástasis óseas de origen gástrico.<sup>112</sup> Un trabajo adicional evaluó tumores gástricos con expresión de CEA, confirmando enlentecimiento del crecimiento tumoral tras la NIR-PIT.<sup>108</sup> Finalmente, un estudio centrado en tumores del estroma gastrointestinal (GIST), incluido en este grupo por su localización frecuentemente gástrica, reportó respuestas completas en el 42,9 % de los animales tratados mediante NIR-PIT dirigido contra c-kit.<sup>113</sup>

Cinco estudios evaluaron el cáncer de páncreas.<sup>102,114–117</sup> Cuatro utilizaron CEA como diana terapéutica y uno empleó FAP. En todos se objetivó eficacia terapéutica. En tres de ellos se combinó NIR-PIT con resección quirúrgica, alcanzándose tasas de respuesta completa del 50 %, 71,4 % y 85,7 %, respectivamente.<sup>114–116</sup>

El cáncer colorrectal fue objeto de análisis en cinco estudios. Tres de ellos emplearon PIC basados en panitumumab dirigidos contra EGFR, uno se dirigió a CEA y otro a FAP. Todos evidenciaron una inhibición del crecimiento tumoral. Uno de los estudios con diana EGFR objetivó respuestas completas en el 80 % de los animales tratados tras exposiciones repetidas a la luz.<sup>121</sup>

Finalmente, seis estudios abordaron el cáncer de mama. Uno de ellos utilizó NIR-PIT basado en trastuzumab para tratar tumores HER2 positivos, observándose supresión del crecimiento tumoral.<sup>123</sup> Dos estudios dirigieron la terapia hacia componentes del microambiente tumoral—macrófagos CD206+ y CAF FAP+—mostrando también inhibición tumoral.<sup>103,122</sup> Los tres estudios restantes se centraron en cáncer de mama triple negativo, empleando PIC dirigidos a EGFR. Uno de ellos alcanzó una tasa de respuesta completa del 38 % en los grupos tratados con múltiples sesiones terapéuticas.<sup>124</sup>



The background of the page is a marbled paper pattern. The top half features a teal or light blue marbled pattern with organic, cell-like shapes. The bottom half features a black marbled pattern with similar organic shapes. The two patterns meet at a wavy, irregular horizontal line.

## **7. DISCUSIÓN**



# 7.DISCUSIÓN

## 7.1. APLICACIÓN PRECLÍNICA DE LA NIR-PIT EN UN MODELO DE CÁNCER DE MAMA HER2+ RESISTENTE AL TRASTUZUMAB

El presente trabajo de tesis, realizado en el marco de un proyecto colaborativo entre el Servicio de Cirugía General del Hospital Germans Trias i Pujol y el Institut Químic de Sarrià, ha consistido en explorar el potencial terapéutico de la NIR-PIT en el tratamiento del cáncer de mama HER2+, identificando como brecha clave su aplicabilidad en contextos de resistencia al trastuzumab, un escenario clínico donde las terapias convencionales resultan limitadas. Se ha abordado el tema desde una doble perspectiva metodológica, con un enfoque inicial centrado en un estudio experimental en modelo murino con cáncer de mama HER2+ resistente al trastuzumab y una posterior expansión hacia su aplicabilidad en otros escenarios de la Cirugía General, buscando contextualizar la NIR-PIT dentro de un marco clínico más amplio, pero manteniendo como núcleo del trabajo el abordaje terapéutico de cáncer de mama HER2+.

El estudio experimental constituye el eje central de la tesis y la principal contribución original del proyecto. Los resultados obtenidos en dicho estudio corroboran su hipótesis inicial: el conjugado Tz-IR700 es eficaz en el tratamiento in vivo de tumores de mama HER2+ resistentes al trastuzumab.

En este caso, se utilizó un modelo murino basado en la línea celular HCC1954, caracterizada por su resistencia intrínseca al trastuzumab y seleccionada por su perfil clínicamente representativo, frente a otras líneas celulares más sensibles como BT-474. Esta elección refuerza su validez como herramienta preclínica para la evaluación de nuevas estrategias terapéuticas en situaciones de resistencia farmacológica. La respuesta terapéutica positiva observada en este contexto resalta la utilidad de la NIR-PIT incluso cuando las terapias convencionales no resultan eficaces, al depender de la presencia del receptor como diana de unión y no de su bloqueo funcional. Estos hallazgos no solo refuerzan el valor de la NIR-PIT en el tratamiento del cáncer de mama HER2+ resistente al trastuzumab, sino que abren la puerta a futuras líneas de investigación centradas en su aplicación frente a otros contextos de resistencia farmacológica, especialmente en neoplasias donde las opciones terapéuticas actuales son limitadas.

El estudio incluye, además, la visualización de la acumulación selectiva del conjugado en el tumor mediante fluorescencia in vivo, lo que no solo permite confirmar la captación específica, sino que respalda el uso potencial del conjugado como marcador intraoperatorio para la detección de márgenes tumorales y de enfermedad microscópica residual. Junto a esta especificidad se objetivó una adecuada tolerancia al tratamiento, sin evidencias de toxicidad clínica. De forma complementaria,

## 7. DISCUSIÓN

otros experimentos in vitro llevados a cabo en el marco del mismo proyecto confirman que la actividad citotóxica del PIC depende de la generación de oxígeno singlete tras la activación lumínica del PS, lo que contribuye a entender su mecanismo de acción.<sup>126</sup> En conjunto, estos resultados refuerzan el perfil de seguridad, especificidad y aplicabilidad terapéutica de la NIR-PIT en un escenario clínicamente relevante.

### 7.2. PROYECCIÓN QUIRÚRGICA Y MADUREZ TRASLACIONAL

Como ya se ha mencionado, para situar los hallazgos experimentales en un contexto más amplio, se ha llevado a cabo una revisión sistemática centrada en la evidencia preclínica in vivo de la NIR-PIT en el campo de la Cirugía General, con el objetivo de identificar su grado de madurez traslacional, las principales barreras para su implementación clínica y su posible integración como herramienta adyuvante en contextos quirúrgicos oncológicos. Esta revisión ha permitido identificar una tendencia aún incipiente pero creciente hacia el desarrollo de estudios sobre NIR-PIT en neoplasias quirúrgicas del aparato digestivo y endocrino, aunque sin perder de vista que, en todos los casos, el tratamiento se encuentra en fase preclínica.

Se han identificado patrones comunes en los estudios publicados hasta la fecha que permiten validar de forma indirecta los resultados del presente trabajo, ya que si bien todos los estudios muestran una ralentización del crecimiento tumoral tras la NIR-PIT, la erradicación completa es poco frecuente y, cuando se consigue, suele estar asociada a protocolos con múltiples sesiones de luz o combinaciones terapéuticas. Este hecho sugiere que es necesario optimizar los regímenes de administración farmacológica y aplicación de luz en NIR-PIT, y refuerza su papel complementario dentro de un enfoque multimodal. Pese a la heterogeneidad de los estudios incluidos y las dianas terapéuticas seleccionadas, el análisis narrativo evidencia el potencial de la terapia para resolver retos comunes en cirugía oncológica, como la delimitación de márgenes o la reducción de recurrencias.

### 7.3. APLICABILIDAD DE LA NIR-PIT SEGÚN LOCALIZACIÓN TUMORAL

Asimismo, cabe destacar que la aplicabilidad de la NIR-PIT varía según las características biológicas y anatómicas de cada tipo de tumor, habiéndose identificado escenarios clínicos particularmente propicios para su integración como terapia adyuvante o herramienta diagnóstica intraoperatoria. En el caso del cáncer de mama, la utilidad de la NIR-PIT se ha demostrado en distintos subtipos. En modelos HER2+, como el abordado en este trabajo, el tratamiento con conjugados tipo trastuzumab-IR700 ha evidenciado una regresión tumoral significativa, lo que respalda su posible aplicación intraoperatoria para el tratamiento de márgenes tras cirugía conservadora de mama.<sup>123</sup> Por otro lado, en el subtipo triple negativo, caracterizado por la falta de opciones terapéuticas efectivas, la PIT dirigida contra EGFR ha logrado tasas de curación del 38 % con dosificaciones repetidas.<sup>124</sup> Además, dianas estromales como CD206 y FAP abren nuevas posibilidades para remodelar el microambiente tumoral, potenciando una sinergia inmunoterapéutica emergente.<sup>103,122</sup>

En el carcinoma escamoso de esófago, donde las resecciones quirúrgicas se asocian a elevada morbilidad y el margen completo es difícil de alcanzar, la NIR-PIT se perfila como una estrategia complementaria con valor añadido. Los estudios preclínicos disponibles sugieren que el doble direccionamiento frente a componentes tumorales y estromales podría mejorar la respuesta terapéutica en este contexto, y su aplicación mediante plataformas endoscópicas o intraoperatorias permitiría su uso tanto en situaciones irreseccables como en régimen neoadyuvante, con el objetivo de modular el microambiente antes o durante la cirugía.<sup>105-107</sup>

En el cáncer gástrico con carcinomatosis peritoneal, donde las opciones terapéuticas actuales son principalmente paliativas, la NIR-PIT ha mostrado actividad terapéutica relevante cuando se dirige a HER2 o CEA, alcanzando incluso respuestas completas con tratamientos repetidos.<sup>108,109,111,112</sup> En este escenario, su capacidad teranóstica podría desempeñar un doble papel: mejorar la detección intraoperatoria de enfermedad microscópica mediante fluorescencia, y permitir el tratamiento localizado de implantes no visibles, contribuyendo así al control locorregional.<sup>127</sup> Su aplicación durante la gastrectomía podría también actuar como estrategia profiláctica frente a recidivas peritoneales.

Respecto al adenocarcinoma de páncreas, uno de los tumores más agresivos y con altas tasas de recurrencia incluso tras resecciones aparentemente completas, la NIR-PIT ha demostrado una notable actividad antitumoral en modelos ortotópicos, especialmente cuando se integra con la cirugía.<sup>114-116</sup> Los porcentajes de respuesta completa de hasta el 85,7 % apuntan a su potencial como coadyuvante intraoperatorio para optimizar los márgenes quirúrgicos, particularmente en zonas anatómicamente comprometidas. A su vez, la fluorescencia derivada de los conjugados puede facilitar la delimitación de márgenes en tiempo real, mejorando la precisión de la resección. En tumores borderline reseccables, su combinación con tratamientos neoadyuvantes podría incrementar la tasa de resecciones.

En cáncer colorrectal, tanto las lesiones primarias como las metastásicas constituyen escenarios clínicamente relevantes para la aplicación de la NIR-PIT. Diversos estudios han confirmado su eficacia

## 7. DISCUSIÓN

preclínica frente a dianas como EGFR, CEA y FAP, destacando un trabajo con tasas de curación del 80 % tras exposiciones repetidas a luz en modelos EGFR-positivos.<sup>121</sup> En el entorno de neoplasias primarias, su uso tras resección rectal podría facilitar la eliminación de restos microscópicos en la pelvis, mientras que en enfermedad metastásica, especialmente con afectación peritoneal o hepática, podría integrarse con cirugía citorreductora, HIPEC o terapias sistémicas para reforzar el control locorregional.

### 7.4. INTEGRACIÓN QUIRÚRGICA Y RETOS DE IMPLEMENTACIÓN

Tanto el estudio experimental como el análisis bibliográfico ponen de manifiesto la sinergia entre la cirugía oncológica y la NIR-PIT, que lejos de concebirse como un tratamiento alternativo, podría convertirse en una herramienta capaz de integrarse en el acto quirúrgico como tratamiento adyuvante inmediato para eliminar células tumorales residuales no visibles al ojo humano. Este enfoque podría tener un impacto directo en la reducción de márgenes quirúrgicos positivos, una de las principales causas de recidiva local y reintervención.<sup>128-130</sup> Además de su uso adyuvante, la capacidad de los PIC para emitir fluorescencia en tiempo real permite plantear su aplicación intraoperatoria como tecnología de apoyo a la resección, especialmente en zonas anatómicamente complejas, en línea con los principios de cirugía oncológica de precisión.

Asimismo, esta integración permitiría solventar una de las limitaciones físicas de la NIR-PIT – la escasa penetración de la luz NIR en tejidos profundos – mediante el acceso quirúrgico directo al campo de irradiación, optimizando así la eficacia del tratamiento sin incrementar su invasividad.

La revisión pone de manifiesto una limitación metodológica común a la mayoría de los estudios, incluido el nuestro: el uso de modelos animales inmunodeficientes. Si bien estos modelos son indispensables para evaluar la acción específica de los conjugados terapéuticos y para la implantación de tumores humanos en modelos animales, no permiten valorar el impacto inmunológico global ni los efectos adversos potenciales derivados de la interacción con un sistema inmune funcional. Esto representa un obstáculo relevante para la traslación clínica y subraya la necesidad de estudios en modelos inmunocompetentes para, eventualmente, realizar ensayos clínicos en humanos.

En este contexto, resulta imprescindible señalar que la implementación clínica de la NIR-PIT no depende únicamente de su eficacia demostrada en modelos preclínicos, sino que enfrenta una serie de barreras técnicas y regulatorias. Entre los retos identificados se encuentra la necesidad de desarrollar nuevos anticuerpos o vectores que amplíen el abanico de dianas terapéuticas, así como de establecer protocolos homologados en cuanto a la dosificación del fármaco y la administración de luz, especialmente cuando se plantea su integración con la cirugía. Además, el hecho de que algunos de los estudios preclínicos analizados dirijan la terapia no solo contra células tumorales, sino también contra componentes del estroma tumoral (como fibroblastos asociados al cáncer o macrófagos tumorales) abre nuevas vías para su combinación con inmunoterapias emergentes, al actuar también sobre el microambiente tumoral. Asimismo, es indispensable avanzar hacia ensayos clínicos controlados en tumores de mal pronóstico, como el adenocarcinoma pancreático, la carcinomatosis peritoneal o el cáncer de mama triple negativo, donde la necesidad de nuevas estrategias terapéuticas es especialmente acuciante.

A lo largo de este proyecto, la colaboración interdisciplinar entre los equipos clínicos del Servicio de Cirugía General y el grupo de investigación Fotoquímica del Institut Químic de Sarrià ha sido fundamental para complementar conocimientos, recursos y enfoques metodológicos.

## 7. DISCUSIÓN

En conjunto, los resultados obtenidos apoyan la consideración de la NIR-PIT como una herramienta potencialmente útil en el tratamiento del cáncer de mama HER2+ resistente al trastuzumab, con potencial de aplicación más amplia en el campo de la cirugía oncológica. Esta tesis subraya que el verdadero reto ya no reside únicamente en demostrar la eficacia del tratamiento, sino en adaptar su desarrollo tecnológico y clínico a las condiciones reales de la cirugía moderna. En este sentido, la NIR-PIT puede considerarse una modalidad con potencial transformador en la práctica quirúrgica oncológica, capaz de integrarse de forma complementaria en protocolos clínicos futuros orientados a reducir recurrencias, mejorar la precisión y personalizar la atención oncológica. El camino hacia su implementación pasa por diseñar estudios que combinen precisión científica, realismo clínico y viabilidad regulatoria, incluyendo tanto la mejora de modelos experimentales como la adecuación tecnológica a las exigencias de la cirugía oncológica contemporánea, aspectos que han sido identificados en esta investigación como próximos pasos imprescindibles para su consolidación.

### 7.5. FORTALEZAS Y LIMITACIONES

El trabajo desarrollado en esta tesis presenta varios puntos fuertes. En primer lugar, la combinación de un estudio experimental original con una revisión sistemática reglada, ha permitido no solo generar conocimiento propio, sino también contextualizarlo críticamente dentro del estado actual de la investigación en NIR-PIT. Esta doble aproximación ha facilitado la identificación de vacíos en la literatura y ha marcado futuras líneas de investigación.

Una segunda fortaleza es el enfoque aplicado del estudio, centrado desde el inicio en un modelo biológico clínicamente relevante: el cáncer de mama HER2+ resistente al tratamiento con trastuzumab. La elección de un sistema tumoral complejo permite valorar la NIR-PIT en un escenario de necesidad clínica no cubierta, lo que refuerza la aplicabilidad de los resultados obtenidos.

Además, destaca especialmente el carácter multidisciplinar y multicéntrico del equipo de trabajo, que ha abarcado desde la síntesis del PIC hasta la experimentación in vivo y la elaboración de la revisión sistemática. Esta estructura colaborativa ha permitido integrar conocimientos de cirugía, anatomía patológica, bioquímica y fotoquímica, garantizando un abordaje holístico.

No obstante, deben reconocerse también ciertas limitaciones. El estudio se ha desarrollado en un único modelo preclínico, y no se han incluido tratamientos comparativos frente a otras estrategias terapéuticas, ya que no formaba parte de los objetivos definidos. No obstante, este tipo de análisis será imprescindible en fases posteriores de validación, especialmente en estudios orientados a la traslación clínica. Además, aunque se ha demostrado la eficacia de la NIR-PIT en condiciones experimentales controladas, no se ha abordado la evaluación de efectos a largo plazo, aspectos fundamentales para avanzar en su caracterización.

Por último, aunque el modelo in vivo utilizado resulta adecuado para una primera aproximación terapéutica, el uso de modelos inmunocompetentes más representativos del microambiente tumoral real permitirá, en futuras fases, obtener una visión más completa de la interacción entre tratamiento y entorno biológico.

### 7.6. PERSPECTIVA TRASLACIONAL, IMPACTO SOCIAL Y DE GÉNERO

Desde un punto de vista socioeconómico, el presente trabajo se alinea con los objetivos de la “EU Mission: Cancer”, una iniciativa de la Comisión Europea enmarcada en el programa Horizon Europe.<sup>94</sup> Esta misión tiene como objetivo mejorar la vida de más de tres millones de personas para el año 2030, a través de acciones integradas que aborden la prevención, la detección temprana, el tratamiento y la calidad de vida de pacientes oncológicos y sus familias.<sup>94</sup> Nuestra investigación contribuye especialmente al desarrollo de los pilares de mejora del diagnóstico y tratamiento, así como de la calidad de vida, dado que se trata de una modalidad terapéutica con propiedades teranósticas y mínimamente invasiva que responde a una necesidad clínica vigente.

Desde una perspectiva de género, esta tesis aborda una patología que afecta mayoritariamente a mujeres, lo que refuerza su alineación con las políticas de equidad de género en salud promovidas tanto por la Unión Europea como por la Organización Mundial de la Salud. El “Plan Europeo de Lucha contra el Cáncer” reconoce explícitamente las desigualdades de género en el acceso a la prevención, el diagnóstico y el tratamiento del cáncer. En esta línea, la European Cancer Organisation —una red que agrupa a sociedades científicas, profesionales sanitarios y organizaciones de pacientes a nivel europeo— ha propuesto medidas específicas para reducir estas desigualdades, varias de las cuales se relacionan con el ámbito de esta investigación.<sup>131</sup> Entre ellas destacan la necesidad de promover el acceso equitativo a tratamientos innovadores y personalizados, impulsar el uso de nuevas tecnologías para mejorar la precisión y los resultados clínicos, y garantizar la disponibilidad de terapias eficaces en casos de cáncer avanzado o metastásico. En este contexto, el uso de la PIT en cáncer de mama HER2+ resistente al trastuzumab representa una línea de investigación especialmente relevante, al ofrecer un enfoque de alta especificidad que puede mejorar el control local de la enfermedad, minimizar secuelas funcionales y contribuir a una atención más adaptada a las necesidades clínicas de las pacientes.

Asimismo, la ya mencionada “Iniciativa Mundial contra el Cáncer de Mama” de la OMS tiene como objetivo reducir la mortalidad por cáncer de mama en un 2,5% anual hasta 2040, enfocándose en la promoción de la salud, el diagnóstico oportuno y el manejo integral de la enfermedad.<sup>38</sup> En el ámbito nacional, la “Estrategia en Cáncer del Sistema Nacional de Salud”, actualizada en 2021, también destaca la importancia de la equidad en el acceso a servicios oncológicos y la necesidad de abordar las desigualdades de género en salud.<sup>132</sup> En este contexto, el desarrollo de terapias innovadoras como la fotoinmunoterapia no solo representa un avance científico, sino también una contribución significativa a la reducción de las desigualdades de género en salud, al ofrecer tratamientos más precisos y menos invasivos para una enfermedad que impacta de manera directa en la vida de las mujeres.



The background of the page features a marbled paper pattern with organic, swirling shapes in shades of black, grey, and white. A large, irregular teal-colored overlay covers the upper portion of the page, creating a layered effect. The text is centered within the teal area.

## **8. CONCLUSIONES**



## 8. CONCLUSIONES

### **1. Respecto al objetivo de evaluar la eficacia terapéutica de la NIR-PIT mediante el uso de un PIC compuesto por trastuzumab y un PS en el tratamiento del cáncer de mama HER2+ resistente al trastuzumab, evaluando su capacidad para inducir respuesta antitumoral específica en un modelo murino clínicamente relevante:**

La NIR-PIT, basada en un PIC de trastuzumab e IR700, demostró eficacia terapéutica en un modelo murino de cáncer de mama HER2+ resistente al trastuzumab, utilizando la línea celular HCC1954. Este modelo permitió validar la aplicabilidad de la terapia en un contexto clínicamente relevante de resistencia farmacológica, actuando mediante un mecanismo independiente del bloqueo funcional del receptor. Los resultados obtenidos respaldan el potencial de la NIR-PIT como estrategia dirigida con posible aplicación en escenarios clínicos complejos.

### **2. Respecto al objetivo de caracterizar el patrón de respuesta locorregional al tratamiento con NIR-PIT en términos de evolución del tamaño tumoral y dinámica de crecimiento, en un modelo murino de cáncer de mama HER2+ resistente al trastuzumab:**

El tratamiento con NIR-PIT produjo una reducción progresiva y estadísticamente significativa del diámetro tumoral medio (MTD) en los animales del grupo tratado ("Tz-IR700 Light"), con diferencias observadas entre el inicio y la primera sesión ( $0,563 \pm 0,178$  mm), entre la primera y la segunda sesión ( $0,470 \pm 0,175$  mm), y entre el inicio y el final del protocolo ( $1,033 \pm 0,231$  mm), todas con  $p < 0,05$ . Este patrón sugiere una desaceleración constante del crecimiento tumoral inducida por la terapia tras cada irradiación. En contraste, el grupo control ("Tz-IR700 Dark") mostró incrementos significativos del MTD en todos los intervalos analizados, reflejando un crecimiento tumoral sostenido en ausencia de fototerapia. Estos resultados confirman el efecto antitumoral específico de la NIR-PIT en el modelo empleado.

### **3. Respecto al objetivo de explorar las propiedades fluorescentes de la NIR-PIT in vivo y su aplicabilidad como herramienta teranóstica en cirugía oncológica:**

La evaluación mediante imagen de fluorescencia in vivo (IVIS) permitió confirmar la acumulación selectiva del fotoconjugado en el tejido tumoral, con una intensidad de señal superior a la de los tejidos adyacentes. Esta captación diferencial valida el potencial teranóstico de la NIR-PIT y su aplicabilidad como herramienta de guiado intraoperatorio para la localización de márgenes tumorales y enfermedad microscópica residual.

### **4. Respecto al objetivo de evaluar el perfil de toxicidad de la NIR-PIT en un modelo murino de cáncer de mama HER2+ resistente al trastuzumab:**

El tratamiento fue bien tolerado por todos los animales incluidos en el estudio. No se observaron pérdidas de peso, alteraciones conductuales ni signos clínicos de toxicidad. Además, ningún animal alcanzó durante el experimento los criterios predefinidos de eutanasia por carga tumoral o deterioro clínico, lo que apoya el perfil de seguridad de la NIR-PIT en condiciones experimentales con administración sistémica del PIC y exposición lumínica localizada.

### **5. Respecto al objetivo de identificar, mediante una revisión sistemática de la literatura, las principales barreras para la implementación clínica de la NIR-PIT en el ámbito de la Cirugía General, así como sus posibles aplicaciones futuras:**

La revisión sistemática identificó 24 estudios preclínicos in vivo en tumores abordables desde la Cirugía General. A partir del análisis narrativo, se identificaron como barreras principales para la implementación clínica de la NIR-PIT el uso generalizado de modelos inmunodeficientes, la falta de estandarización de protocolos de administración del conjugado y de los parámetros de luz, así como las limitaciones tecnológicas para garantizar una irradiación eficaz en tejidos profundos o en cavidades corporales. Al mismo tiempo, se detectaron líneas de aplicación con alta proyección clínica, entre las que destacan el tratamiento intraoperatorio de carcinomatosis peritoneal para eliminar implantes no visibles; el tratamiento de márgenes tras resecciones oncológicas en regiones anatómicamente complejas como páncreas, recto o esófago; y su combinación con inmunoterapia dirigida al estroma en neoplasias con microambientes inmunosupresores. En el caso del cáncer de mama, además, se ha documentado su posible utilidad en subtipos con mal pronóstico como el triple negativo, así como su aplicación intraoperatoria para optimizar el control locorregional tras cirugía conservadora.

The background of the page is a marbled paper pattern. The top half is a vibrant teal color, while the bottom half is a dark charcoal or black color. Both sections feature a pattern of irregular, rounded shapes with concentric, swirling lines, creating a cellular or organic texture. The teal and black sections are separated by a wavy, irregular border.

## **9. LÍNEAS DE FUTURO**



# 9. LÍNEAS DE FUTURO

## 9.1. PROYECTO DE INNOVACIÓN: SNIPer

### 9.1.1. DEFINICIÓN

La experiencia adquirida durante el desarrollo de esta tesis ha permitido identificar una de las principales barreras para la implementación clínica de la NIR-PIT en cirugía: la ausencia de una solución logística que permita aplicar la terapia de forma compatible con el entorno quirúrgico real. Aunque el tratamiento ha demostrado ser eficaz, seguro y mínimamente invasivo en modelos preclínicos, su aplicación práctica en quirófano presenta limitaciones técnicas que, hasta la fecha, no han sido resueltas.

Ante esta necesidad no cubierta, surge el proyecto **SNIPer** (Surgical Near-Infrared Photoimmunotherapy enhancer), una propuesta tecnológica diseñada para facilitar la aplicación intraoperatoria de la NIR-PIT. El proyecto ha sido concebido como una innovación orientada a la práctica quirúrgica, y su desarrollo parte directamente de las observaciones realizadas durante el trabajo experimental de esta tesis.

SNIPer tiene como objetivo optimizar la integración de la NIR-PIT en protocolos quirúrgicos existentes, favoreciendo su uso como herramienta adyuvante inmediata tras la resección tumoral. Entre los beneficios que se prevé alcanzar se incluyen: la mejora en la precisión del tratamiento locoregional, la reducción del riesgo de recurrencia asociado a márgenes positivos, y la ampliación del acceso a terapias dirigidas en pacientes con tumores de alto riesgo o difícil resección.

Dado que el proyecto se encuentra actualmente en fase de protección mediante patente, no es posible divulgar detalles específicos sobre la tecnología. Sin embargo, se han definido claramente sus beneficios clínicos y su potencial aplicabilidad en cirugía oncológica de mama, así como en otras localizaciones anatómicas tratadas habitualmente en el ámbito de la Cirugía General.

### 9.1.2. RECONOCIMIENTOS Y APOYO INSTITUCIONAL

El proyecto SNIPer ha sido impulsado con el apoyo continuado de nuestra institución y ha recibido también soporte externo a través de su participación en distintas iniciativas de innovación clínica. Estas han proporcionado recursos clave para su desarrollo, incluyendo formación, financiación y validación tecnológica. Actualmente, el proyecto continúa contando con respaldo institucional para avanzar hacia nuevas etapas y captar financiación adicional. A continuación, se presentan los principales programas en los que ha participado: el Healthcare Entrepreneur Exchange Programme (HEEP), el programa GrowInn, la iniciativa “De la Ciència al Mercat” y la financiación obtenida en el marco de la convocatoria “Indústria del Coneixement – Llabor”. El proyecto ha sido además seleccionado para la participación en la próxima edición del programa Caixa Impulse – Fase 1 (2025-2026) financiado por la Fundación “La Caixa”.

#### 9.1.2.1. “HEALTHCARE ENTREPRENEUR EXCHANGE PROGRAMME (HEEP)”

El proyecto SNIPer ha sido reconocido en el marco de diversas iniciativas impulsadas por el Hospital Universitari Germans Trias i Pujol para fomentar la innovación clínica entre profesionales asistenciales. En este contexto, la participación en el programa HEEP durante el curso 2022–2023 supuso un impulso relevante para el desarrollo del proyecto y para la adquisición de competencias clave en emprendimiento e innovación aplicada a la cirugía.

HEEP es un programa internacional organizado conjuntamente por el Institut Català de la Salut (ICS) y el National Health Service (NHS) del Reino Unido. Está dirigido a profesionales con actividad asistencial que lideran proyectos de innovación en fases iniciales, y combina formación especializada, mentoría individual y una estancia formativa en hospitales británicos. El proyecto presentado fue seleccionado como uno de los tres ganadores del centro, lo que permitió participar en la fase internacional con una estancia en el *Leeds Teaching Hospitals NHS Trust* y el *Sheffield Teaching Hospitals NHS Foundation Trust*.

Durante el programa se abordaron aspectos como la planificación estratégica de proyectos, el desarrollo del modelo de negocio y la comunicación no científica. Esta experiencia ha facilitado además el establecimiento de contactos estratégicos y la exploración de futuras colaboraciones internacionales en el ámbito de la innovación sanitaria.

Como parte del reconocimiento obtenido, el proyecto SNIPer recibió una primera dotación económica de 15.000 €, destinada a impulsar su desarrollo en fases tempranas. Esta ayuda ha permitido avanzar en aspectos clave de viabilidad técnica y estratégica, así como consolidar el diseño preliminar del proyecto.

### 9.1.2.2. PROGRAMA “GROWINN”

Tras la participación en el HEEP, el proyecto *SNIPer* fue seleccionado para su desarrollo dentro del programa GrowInn, una incubadora de proyectos de innovación clínica impulsada por el Instituto de Investigación Germans Trias i Pujol (IGTP). Este programa, orientado también a profesionales del ámbito asistencial, permitió adquirir conocimientos clave sobre fundamentos de protección de la propiedad intelectual, regulatoria aplicada a tecnologías sanitarias y fuentes de financiación para proyectos de base clínica.

Además de la formación estructurada, el programa facilitó la creación de sinergias entre instituciones participantes: HUGTIP, IrsiCaixa, el Institut de Recerca contra la Leucèmia Josep Carreras (IJC), el Consorci Sanitari del Maresme y el Institut Guttmann.

*SNIPer* fue reconocido como mejor proyecto en el *Demo day* final, obteniendo una dotación económica de 5.000 €, destinada a una evaluación tecnológica externa a cargo de Inveniam Group, consultora especializada en valorización y transferencia de activos biomédicos.

### 9.1.2.3. PROGRAMA “DE LA CIÈNCIA AL MERCAT”

El proyecto *SNIPer* fue también seleccionado para participar en el programa “De la Ciència al Mercat”, una iniciativa formativa promovida por StartUB! (Universitat de Barcelona), en colaboración con la Universitat Autònoma de Barcelona, la Universitat Politècnica de Catalunya, la Universitat Pompeu Fabra y la Universitat de Girona. Se trata de un programa subvencionado por el Departament d’Empresa i Treball de la Generalitat de Catalunya y cofinanciado por el Fons Social Europeu Plus, dirigido a investigadores con proyectos científicos con potencial de aplicación más allá del entorno académico. Su objetivo es proporcionar formación práctica y estratégica para facilitar la comprensión del proceso de valorización del conocimiento, desde la generación de resultados hasta su posible implementación en el entorno social o económico.

El curso se desarrolló entre octubre y diciembre de 2024, con una duración total de 100 horas, y combinó sesiones teóricas y tutorías personalizadas. Los contenidos se estructuraron en torno a cuatro bloques temáticos: introducción a la emprendeduría científica, estrategias de protección y valorización de resultados, fundamentos de gestión empresarial aplicada a proyectos de base tecnológica, y desarrollo de habilidades personales para la gestión de proyectos y liderazgo en entornos complejos.

La participación en este programa permitió profundizar en el análisis estratégico del trabajo desarrollado durante la tesis, así como adquirir herramientas para identificar con mayor claridad su posible aplicabilidad futura desde una perspectiva de desarrollo estructurada y realista.

### 9.1.3. FINANCIACIÓN EXTERNA PARA EL PROYECTO SNIPER

El proyecto *SNIPer* ha sido financiado en el marco de la convocatoria 2024 del programa “Indústria del Coneixement – Modalidad Llabor”, gestionado por la Agència de Gestió d’Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR), impulsado por el Departamento de Empresa y Trabajo de la Generalitat de Cataluña y cofinanciado por el Fondo Social Europeo Plus. Esta ayuda, dotada con **20.000 €**, está orientada a apoyar proyectos de investigación con potencial de transferencia en fases iniciales de desarrollo tecnológico. Los fondos obtenidos se han destinado al diseño y construcción del primer MVP (producto mínimo viable) asociado a la tecnología. Esta financiación ha permitido iniciar una nueva fase centrada en la validación funcional del concepto y en la preparación de su futura aplicación en un entorno preclínico, la cual se continuará durante el próximo año gracias a la participación en el programa Caixa Impulse financiado por la Fundación “La Caixa”, que ha dotado al proyecto de **50.000 €** más para su desarrollo.

### 9.1.4. NIVEL DE DESARROLLO ADQUIRIDO DEL PROYECTO SNIPER Y SIGUIENTES PASOS

Desde el inicio del proyecto, el desarrollo de *SNIPer* se ha abordado con una estrategia integral que combina la validación científica con una orientación hacia la transferencia tecnológica. Uno de los pasos iniciales fue asegurar la protección de los resultados mediante la colaboración con la agencia ZBM Patents & Trademarks, con quien se llevó a cabo un estudio de patentabilidad y se elaboró un borrador de patente europea, actualmente en proceso de presentación. Esta acción se ha consolidado con la firma de un acuerdo de distribución de la propiedad intelectual entre el IGTP y el IQS.

De forma paralela, se ha trabajado intensamente en el diseño funcional e industrial de la tecnología con el apoyo de la empresa especializada Stimulo. Este proceso ha permitido generar los renders conceptuales y las especificaciones técnicas para un primer producto mínimo viable (MVP), actualmente en construcción, que servirá como base para las validaciones preclínicas en entornos quirúrgicos.

En el plano regulador, se ha realizado un análisis preliminar que deberá ser contrastado mediante asesoramiento especializado, con el objetivo de establecer una hoja de ruta regulatoria adecuada tanto para su certificación en Europa como para una eventual homologación en Estados Unidos.

A corto plazo, los siguientes pasos se centrarán en la ejecución de la investigación preclínica necesaria, estructurada dentro del marco regulador, para la validación de la tecnología. De forma paralela, se continuará trabajando en la captación de financiación externa que permita la continuidad del proyecto. Este proceso forma parte de una estrategia orientada a la futura implementación de la NIR-PIT en el entorno quirúrgico, con el consiguiente impacto sanitario y económico que ello podría suponer. Si bien se trata de un proceso largo y exigente, el trabajo realizado hasta la fecha ha permitido establecer una base técnica y estratégica.

## 9.2. DIFUSIÓN NO ACADÉMICA E IMPACTO SOCIAL

Parte de los resultados de esta tesis han tenido una repercusión significativa en medios de comunicación generalistas, lo que permite documentar el interés que ha despertado el proyecto más allá del ámbito estrictamente científico. En febrero de 2025 se llevó a cabo una primera difusión mediática centrada en la aplicación de la NIR-PIT como posible herramienta terapéutica en cáncer de mama HER2+ resistente al trastuzumab, lo que permitió trasladar el valor del estudio a la sociedad.

La cobertura incluyó medios de alcance nacional y regional como *La Vanguardia*, *Gaceta Médica*, *Betevé*, *3Cat*, *Catalunya Press* o *Infosalus*, entre otros. Si bien el enfoque periodístico simplificó determinados aspectos metodológicos, los titulares y contenidos difundidos respetaron con fidelidad la línea principal del proyecto y sus implicaciones en investigación traslacional.

En un contexto en el que la ciencia mantiene una relación cada vez más directa con la ciudadanía, este tipo de difusión no solo amplía el impacto del trabajo investigador, sino que también contribuye a su legitimidad social, y a la transparencia institucional.

La compilación de las principales publicaciones pueden consultarse en el **Anexo 11.7**, junto con los enlaces correspondientes.



The background of the page is a marbled paper pattern. The top half is a light teal color with a pattern of irregular, rounded shapes in a slightly darker shade of teal. The bottom half is a dark charcoal or black color with a similar pattern of irregular, rounded shapes in a slightly lighter shade of black. The two colors meet at a wavy, organic boundary line.

# **10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



# 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wang X, Luo D, Basilion JP. Photodynamic Therapy: Targeting Cancer Biomarkers for the Treatment of Cancers. *Cancers (Basel)*. 2021;13:2992.
2. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, et al. Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2011;61:250–81.
3. Juzeniene A, Peng Q, Moan J. Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. *Photochem Photobiol Sci*. 2007;6:1234–45.
4. Kobayashi H, Choyke PL. Near-Infrared Photoimmunotherapy of Cancer. *Acc Chem Res*. 2019;52:2332–9.
5. Reginato E, Wolf P, Hamblin MR. Immune response after photodynamic therapy increases anti-cancer and anti-bacterial effects. *World J Immunol*. 2014;4:1–11.
6. Li X, Kim Cyoon, Lee S, Lee D, Chung HM, Kim G, et al. Nanostructured Phthalocyanine Assemblies with Protein-Driven Switchable Photoactivities for Biophotonic Imaging and Therapy. *J Am Chem Soc*. 2017;139:10880–6.
7. Turkoglu G, Koygun GK, Yurt MNZ, Demirok N, Erbas-Cakmak S. Self-reporting heavy atom-free photodynamic therapy agents. *Org Biomol Chem*. 2020;18:9433–7.
8. Fan W, Lu N, Xu C, Liu Y, Lin J, Wang S, et al. Enhanced Afterglow Performance of Persistent Luminescence Implants for Efficient Repeatable Photodynamic Therapy. *ACS Nano*. 2017;11:5864–72.
9. Luo OD, Bose R, Bawazir MA, Thuraisingam T, Ghazawi FM. A Review of the Dermatologic Clinical Applications of Topical Photodynamic Therapy. *J Cutan Med Surg*. 2024;28:NP1–18.
10. Gunaydin G, Gedik ME, Ayan S. Photodynamic Therapy—Current Limitations and Novel Approaches. *Front Chem*. 2021;9.
11. Vrouenraets MB, Visser GWM, Snow GB, van Dongen GAMS. Basic principles, applications in oncology and improved selectivity of photodynamic therapy. *Anticancer Res*. 2003;23:505–22.
12. Stolik S, Delgado JA, Pérez A, Anasagasti L. Measurement of the penetration depths of red and near infrared light in human “ex vivo” tissues. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2000;57:90–3.
13. Mourant JR, Canpolat M, Brocker C, Esponda-Ramos O, Johnson TM, Matanock A, et al. Light scattering from cells: the contribution of the nucleus and the effects of proliferative status. *JBO*. 2000;5:131–7.
14. Frangioni JV. *In vivo* near-infrared fluorescence imaging. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2003;7:626–34.
15. Van Straten D, Mashayekhi V, De Bruijn HS, Oliveira S, Robinson DJ. Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. *Cancers*. 2017;9:19.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

16. Carroll L, Humphreys TR. LASER-tissue interactions. *Clinics in Dermatology*. 2006;24:2–7.
17. Vaupel P, Thews O, Hoeckel M. Treatment Resistance of Solid Tumors. *MO*. 2001;18:243–60.
18. Rousseau J, Nakamura M, Rio-Maior H, Álvares F, Choquet R, Madeira de Carvalho L, et al. Non-Invasive Molecular Survey of Sarcoptic Mange in Wildlife: Diagnostic Performance in Wolf Faecal Samples Evaluated by Multi-Event Capture–Recapture Models. *Pathogens*. 2021;10:243.
19. Wouters A, Pauwels B, Lardon F, Vermorken JB. Review: Implications of In Vitro Research on the Effect of Radiotherapy and Chemotherapy Under Hypoxic Conditions. *The Oncologist*. 2007;12:690–712.
20. Peng Z, Lv X, Huang S. Photoimmunotherapy: A New Paradigm in Solid Tumor Immunotherapy. *Cancer Control*. 2022;29:10732748221088825.
21. Kishimoto S, Bernardo M, Saito K, Koyasu S, Mitchell JB, Choyke PL, et al. Evaluation of oxygen dependence on *in vitro* and *in vivo* cytotoxicity of photoimmunotherapy using IR-700–antibody conjugates. *Free Radical Biology and Medicine*. 2015;85:24–32.
22. Paraboschi I, Turnock S, Kramer-Marek G, Musleh L, Barisa M, Anderson J, et al. Near-InfraRed PhotoimmunoTherapy (NIR-PIT) for the local control of solid cancers: Challenges and potentials for human applications. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2021;161:103325.
23. Mitsunaga M, Ogawa M, Kosaka N, Rosenblum LT, Choyke PL, Kobayashi H. Cancer Cell-Selective In Vivo Near Infrared Photoimmunotherapy Targeting Specific Membrane Molecules. *Nat Med*. 2011;17:1685–91.
24. Okada R, Furusawa A, Vermeer DW, Inagaki F, Wakiyama H, Kato T, et al. Near-infrared photoimmunotherapy targeting human-EGFR in a mouse tumor model simulating current and future clinical trials. *EBioMedicine*. 2021;67:103345.
25. Sato K, Sato N, Xu B, Nakamura Y, Nagaya T, Choyke PL, et al. Spatially selective depletion of tumor-associated regulatory T cells with near-infrared photoimmunotherapy. *Sci Transl Med*. 2016;8:352ra110.
26. Nishimura T, Mitsunaga M, Sawada R, Saruta M, Kobayashi H, Matsumoto N, et al. Photoimmunotherapy targeting biliary-pancreatic cancer with humanized anti-TROP2 antibody. *Cancer Med*. 2019;8:7781–92.
27. Maruoka Y, Furusawa A, Okada R, Inagaki F, Fujimura D, Wakiyama H, et al. Combined CD44- and CD25-targeted Near-Infrared Photoimmunotherapy Selectively Kills Cancer and Regulatory T cells in Syngeneic Mouse Cancer Models. *Cancer Immunol Res*. 2020;8:345–55.
28. Okada R, Kato T, Furusawa A, Inagaki F, Wakiyama H, Fujimura D, et al. Selection of antibody and light exposure regimens alters therapeutic effects of EGFR-targeted near-infrared photoimmunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2022;71:1877–87.
29. Rakuten Medical, Inc. A Phase 1&#x2F;2a Multicenter, Open-Label, Dose-Escalation, Combination Study of RM-1929 and Photoimmunotherapy in Patients With Recurrent Head and Neck Cancer, Who in the Opinion of Their Physician, Cannot Be Satisfactorily Treated With Surgery, Radiation or Platinum Chemotherapy [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2020 Feb [cited 2025 Apr 14]. Report No.: NCT02422979. Available from: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02422979>

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

30. Rakuten Medical, Inc. A Phase 3, Randomized, Double-Arm, Open-Label, Controlled Trial of ASP-1929 Photoimmunotherapy Versus Physician's Choice Standard of Care for the Treatment of Locoregional, Recurrent Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in Patients Who Have Failed or Progressed On or After at Least Two Lines of Therapy, of Which at Least One Line Must Be Systemic Therapy [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2025 Jan [cited 2025 Apr 14]. Report No.: NCT03769506. Available from: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03769506>
31. Inc RM. Rakuten Medical Japan Announces Marketing Approval of Akalux® IV Infusion 250mg and BioBlade® Laser System from the Ministry of Health, Labour and Welfare in Japan for Locoregional Cancer Treatment [Internet]. [cited 2025 Apr 14]. Available from: <https://www.prnewswire.com/news-releases/rakuten-medical-japan-announces-marketing-approval-of-akalux-iv-infusion-250mg-and-bioblade-laser-system-from-the-ministry-of-labour-health-and-welfare-in-japan-for-locoregional-cancer-treatment-301138121.html>
32. Inc RM. Rakuten Medical Announces Initiation of Global Phase 3 Trial of ASP-1929 Photoimmunotherapy in Combination with Pembrolizumab for First-Line Recurrent Head and Neck Cancer [Internet]. [cited 2025 Apr 13]. Available from: <https://www.prnewswire.com/news-releases/rakuten-medical-announces-initiation-of-global-phase-3-trial-of-asp-1929-photoimmunotherapy-in-combination-with-pembrolizumab-for-first-line-recurrent-head-and-neck-cancer-302358731.html>
33. Rakuten Medical, Inc. An Open-label Study Using ASP-1929 Photoimmunotherapy in Combination with Anti-PD1 Therapy in EGFR Expressing Advanced Solid Tumors [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2025 Feb [cited 2025 Apr 14]. Report No.: NCT04305795. Available from: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04305795>
34. Cancer Today [Internet]. [cited 2025 Mar 20]. Available from: <https://gco.iarc.who.int/today/>
35. Wilkinson L, Gathani T. Understanding breast cancer as a global health concern. *Br J Radiol*. 2022;95:20211033.
36. Cancer Over Time [Internet]. [cited 2025 Mar 24]. Available from: <https://gco.iarc.fr/overtime>
37. Vidal Lancis C, Martínez-Sánchez JM, Mateos Mazón M, Peris Tuser M. Mortalidad por cáncer de mama: evolución en España y sus comunidades autónomas durante el período 1980-2005. *Rev Esp Salud Publica*. 2010;84:53–9.
38. The Global Breast Cancer Initiative [Internet]. [cited 2025 Apr 3]. Available from: <https://www.who.int/initiatives/global-breast-cancer-initiative>
39. Haoling Zhu BED. American Joint Committee on Cancer's Staging System for Breast Cancer, Eighth Edition: Summary for Clinicians [Internet]. *European Journal of Breast Health*; 2021 [cited 2025 Mar 24]. Available from: <https://eurjbreasthealth.com/articles/doi/ejbh.galenos.2021.2021-4-3>
40. Yip CH, and Rhodes A. Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Future Oncology*. 2014;10:2293–301.
41. Honma N, Horii R, Iwase T, Saji S, Younes M, Ito Y, et al. Proportion of estrogen or progesterone receptor expressing cells in breast cancers and response to endocrine therapy. *The Breast*. 2014;23:754–62.
42. Burstein HJ. The Distinctive Nature of HER2-Positive Breast Cancers. *New England Journal of Medicine*. 2005;353:1652–4.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

43. Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Molecular Biology International*. 2014;2014:852748.
44. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer*. 2007;96:1504–13.
45. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast*. 2008;17:323–34.
46. Nielsen TO, Leung SCY, Rimm DL, Dodson A, Acs B, Badve S, et al. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Updated Recommendations From the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *J Natl Cancer Inst*. 2021;113:808–19.
47. Fan C, Oh DS, Wessels L, Weigelt B, Nuyten DSA, Nobel AB, et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med*. 2006;355:560–9.
48. Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish BF, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*. 2006;7:96.
49. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:10869–74.
50. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:8418–23.
51. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:10393–8.
52. Loi S, Haibe-Kains B, Desmedt C, Lallemand F, Tutt AM, Gillet C, et al. Definition of clinically distinct molecular subtypes in estrogen receptor-positive breast carcinomas through genomic grade. *J Clin Oncol*. 2007;25:1239–46.
53. Voduc KD, Cheang MCU, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol*. 2010;28:1684–91.
54. Boyle P. Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations. *Ann Oncol*. 2012;23 Suppl 6:vi7-12.
55. Kesson EM, Allardice GM, George WD, Burns HJG, Morrison DS. Effects of multidisciplinary team working on breast cancer survival: retrospective, comparative, interventional cohort study of 13 722 women. *BMJ*. 2012;344:e2718.
56. Caswell-Jin JL, Sun LP, Munoz D, Lu Y, Li Y, Huang H, et al. Analysis of Breast Cancer Mortality in the US-1975 to 2019. *JAMA*. 2024;331:233–41.
57. Taskindoust M, Thomas SM, Sammons SL, Fayanju OM, DiLalla G, Hwang ES, et al. Survival Outcomes Among Patients with Metastatic Breast Cancer: Review of 47,000 Patients. *Ann Surg Oncol*. 2021;28:7441–9.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

58. Ruiterkamp J, Voogd AC, Tjan-Heijnen VCG, Bosscha K, van der Linden YM, Rutgers EJT, et al. SUBMIT: Systemic therapy with or without up front surgery of the primary tumor in breast cancer patients with distant metastases at initial presentation. *BMC Surg.* 2012;12:5.
59. Khan SA. De novo Stage IV breast cancer: breast conserving resection of the primary tumor? *J Surg Oncol.* 2014;110:51–7.
60. Crocetti E, Roche L, Buzzoni C, di Costanzo F, Molinié F, Caldarella A. Trends in net survival from breast cancer in six European Latin countries: results from the SUDCAN population-based study. *European Journal of Cancer Prevention.* 2017;26:S85.
61. Courtney D, Davey MG, Moloney BM, Barry MK, Sweeney K, McLaughlin RP, et al. Breast cancer recurrence: factors impacting occurrence and survival. *Ir J Med Sci.* 2022;191:2501–10.
62. Billena C, Wilgucki M, Flynn J, Modlin L, Tadros A, Razavi P, et al. 10-Year Breast Cancer Outcomes in Women  $\leq 35$  Years of Age. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2021;109:1007–18.
63. Silber JH, Rosenbaum PR, Clark AS, Giantonio BJ, Ross RN, Teng Y, et al. Characteristics associated with differences in survival among black and white women with breast cancer. *JAMA.* 2013;310:389–97.
64. Taylor C, McGale P, Probert J, Broggio J, Charman J, Darby SC, et al. Breast cancer mortality in 500 000 women with early invasive breast cancer diagnosed in England, 1993-2015: population based observational cohort study. *BMJ.* 2023;381:e074684.
65. Colleoni M, Sun Z, Price KN, Karlsson P, Forbes JF, Thürlimann B, et al. Annual Hazard Rates of Recurrence for Breast Cancer During 24 Years of Follow-Up: Results From the International Breast Cancer Study Group Trials I to V. *J Clin Oncol.* 2016;34:927–35.
66. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA.* 2019;321:288–300.
67. Jassem J. Post-mastectomy radiation therapy after breast reconstruction: Indications, timing and results. *The Breast.* 2017;34:S95–8.
68. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW, et al. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2011;305:569–75.
69. Martin M, Zielinski C, Ruiz-Borrego M, Carrasco E, Turner N, Ciruelos EM, et al. Palbociclib in combination with endocrine therapy versus capecitabine in hormonal receptor-positive, human epidermal growth factor 2-negative, aromatase inhibitor-resistant metastatic breast cancer: a phase III randomised controlled trial-PEARL. *Ann Oncol.* 2021;32:488–99.
70. Kahan Z, Gil-Gil M, Ruiz-Borrego M, Carrasco E, Ciruelos E, Muñoz M, et al. Health-related quality of life with palbociclib plus endocrine therapy versus capecitabine in postmenopausal patients with hormone receptor-positive metastatic breast cancer: Patient-reported outcomes in the PEARL study. *Eur J Cancer.* 2021;156:70–82.
71. Balduzzi S, Mantarro S, Guarneri V, Tagliabue L, Pistotti V, Moja L, et al. Trastuzumab-containing regimens for metastatic breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;2014:CD006242.
72. Li X, Wetherilt CS, Krishnamurti U, Yang J, Ma Y, Styblo TM, et al. Stromal PD-L1 Expression Is Associated With Better Disease-Free Survival in Triple-Negative Breast Cancer. *American Journal of Clinical Pathology.* 2016;146:496–502.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

73. Halsted CP, Benson JR, Jatoi I. A Historical Account of Breast Cancer Surgery: Beware of Local Recurrence but be not Radical. *Future Oncol.* 2014;10:1649–57.
74. Jatoi I, Proschan MA. Randomized Trials of Breast-Conserving Therapy Versus Mastectomy for Primary Breast Cancer: A Pooled Analysis of Updated Results. *American Journal of Clinical Oncology.* 2005;28:289.
75. Litière S, Werutsky G, Fentiman IS, Rutgers E, Christiaens MR, Limbergen EV, et al. Breast conserving therapy versus mastectomy for stage I–II breast cancer: 20 year follow-up of the EORTC 10801 phase 3 randomised trial. *The Lancet Oncology.* 2012;13:412–9.
76. Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, et al. Twenty-Year Follow-up of a Randomized Trial Comparing Total Mastectomy, Lumpectomy, and Lumpectomy plus Irradiation for the Treatment of Invasive Breast Cancer. *New England Journal of Medicine.* 2002;347:1233–41.
77. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *The Lancet.* 2005;366:2087–106.
78. Kouzminova NB, Aggarwal S, Aggarwal A, Allo MD, Lin AY. Impact of initial surgical margins and residual cancer upon re-excision on outcome of patients with localized breast cancer. *Am J Surg.* 2009;198:771–80.
79. Zavagno G, Goldin E, Mencarelli R, Capitanio G, Bianco PD, Marconato R, et al. Role of resection margins in patients treated with breast conservation surgery. *Cancer.* 2008;112:1923–31.
80. Pleijhuis RG, Graafland M, de Vries J, Bart J, de Jong JS, van Dam GM. Obtaining Adequate Surgical Margins in Breast-Conserving Therapy for Patients with Early-Stage Breast Cancer: Current Modalities and Future Directions. *Ann Surg Oncol.* 2009;16:2717–30.
81. Browne BC, O'Brien N, Duffy MJ, Crown J, O'Donovan N. HER-2 Signaling and Inhibition in Breast Cancer. *Current Cancer Drug Targets.* 9:419–38.
82. Claret FX, Vu TT. Trastuzumab: Updated Mechanisms of Action and Resistance in Breast Cancer. *Front Oncol.* 2012;2.
83. Dawood S, Broglio K, Buzdar AU, Hortobagyi GN, Giordano SH. Prognosis of women with metastatic breast cancer by HER2 status and trastuzumab treatment: an institutional-based review. *J Clin Oncol.* 2010;28:92–8.
84. Marczyk VR, Rosa DD, Maia AL, Goemann IM. Overall Survival for HER2-Positive Breast Cancer Patients in the HER2-Targeted Era: Evidence From a Population-Based Study. *Clinical Breast Cancer.* 2022;22:418–23.
85. Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *JCO.* 2006;25:118–45.
86. Narayan M, Wilken JA, Harris LN, Baron AT, Kimbler KD, Maihle NJ. Trastuzumab-Induced HER Reprogramming in “Resistant” Breast Carcinoma Cells. *Cancer Research.* 2009;69:2191–4.
87. Gajria D, and Chandarlapaty S. HER2-amplified breast cancer: mechanisms of trastuzumab resistance and novel targeted therapies. *Expert Review of Anticancer Therapy.* 2011;11:263–75.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

88. Scaltriti M, Rojo F, Ocaña A, Anido J, Guzman M, Cortes J, et al. Expression of p95HER2, a Truncated Form of the HER2 Receptor, and Response to Anti-HER2 Therapies in Breast Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2007;99:628–38.
89. Wehrman TS, Raab WJ, Casipit CL, Doyonnas R, Pomerantz JH, Blau HM. A system for quantifying dynamic protein interactions defines a role for Herceptin in modulating ErbB2 interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103:19063–8.
90. Lu Y, Zi X, Zhao Y, Mascarenhas D, Pollak M. Insulin-Like Growth Factor-I Receptor Signaling and Resistance to Trastuzumab (Herceptin). *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2001;93:1852–7.
91. Agarwal S, Zerillo C, Kolmakova J, Christensen JG, Harris LN, Rimm DL, et al. Association of constitutively activated hepatocyte growth factor receptor (Met) with resistance to a dual EGFR/Her2 inhibitor in non-small-cell lung cancer cells. *Br J Cancer*. 2009;100:941–9.
92. Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell*. 2004;6:117–27.
93. Ministerio de Sanidad y Consumo. Orden SCO/1260/2007, de 13 de abril, por la que se aprueba y publica el programa formativo de la especialidad de Cirugía General y del Aparato Digestivo [Internet]. Sect. 3, Orden SCO/1260/2007 May 8, 2007 p. 19864–73. Available from: <https://www.boe.es/eli/es/o/2007/04/13/sco1260>
94. EU Mission: Cancer - European Commission [Internet]. [cited 2025 May 9]. Available from: [https://research-and-innovation.ec.europa.eu/funding/funding-opportunities/funding-programmes-and-open-calls/horizon-europe/eu-missions-horizon-europe/eu-mission-cancer\\_en](https://research-and-innovation.ec.europa.eu/funding/funding-opportunities/funding-programmes-and-open-calls/horizon-europe/eu-missions-horizon-europe/eu-mission-cancer_en)
95. European Journal of Medicinal Chemistry [Internet]. [cited 2025 May 11]. Available from: <https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=17464&tip=sid&clean=0>
96. Kishimoto S, Bernardo M, Saito K, Koyasu S, Mitchell JB, Choyke PL, et al. Evaluation of oxygen dependence on in vitro and in vivo cytotoxicity of photoimmunotherapy using IR-700-antibody conjugates. *Free Radic Biol Med*. 2015;85:24–32.
97. van Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In: Cree IA, editor. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2011 [cited 2025 May 24]. p. 237–45. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20)
98. Nakajima T, Sato K, Hanaoka H, Watanabe R, Harada T, Choyke PL, et al. The effects of conjugate and light dose on photo-immunotherapy induced cytotoxicity. *BMC Cancer*. 2014;14:389.
99. Amini A, Mesbah G, Tash Shamsabadi F, Zeyghami MA, Safdari Y. Tumour induction in BALB/c mice for imaging studies: An improved protocol. *J Cell Mol Med*. 2023;27:1880–6.
100. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med*. 2009;6:e1000097.
101. Leenaars M, Hooijmans CR, van Veggel N, ter Riet G, Leeflang M, Hooft L, et al. A step-by-step guide to systematically identify all relevant animal studies. *Lab Anim*. 2012;46:24–31.
102. Dorst DN, Smeets EMM, Klein C, Frielink C, Geijs D, Trajkovic-Arsic M, et al. Fibroblast Activation Protein-Targeted Photodynamic Therapy of Cancer-Associated Fibroblasts in Murine Models for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Mol Pharmaceutics*. 2023;20:4319–30.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

103. Zhang C, Gao L, Cai Y, Liu H, Gao D, Lai J, et al. Inhibition of tumor growth and metastasis by photoimmunotherapy targeting tumor-associated macrophage in a sorafenib-resistant tumor model. *Biomaterials*. 2016;84:1–12.
104. Akai M, Noma K, Kato T, Nishimura S, Matsumoto H, Kawasaki K, et al. Fibroblast activation protein-targeted near-infrared photoimmunotherapy depletes immunosuppressive cancer-associated fibroblasts and remodels local tumor immunity. *British Journal of Cancer*. 2024;130:1647.
105. Watanabe S, Noma K, Ohara T, Kashima H, Sato H, Kato T, et al. Photoimmunotherapy for cancer-associated fibroblasts targeting fibroblast activation protein in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Biol Ther*. 2019;20:1234–48.
106. Katsube R, Noma K, Ohara T, Nishiwaki N, Kobayashi T, Komoto S, et al. Fibroblast activation protein targeted near infrared photoimmunotherapy (NIR PIT) overcomes therapeutic resistance in human esophageal cancer. *Sci Rep*. 2021;11:1693.
107. Sato H, Noma K, Ohara T, Kawasaki K, Akai M, Kobayashi T, et al. Dual-targeted near-infrared photoimmunotherapy for esophageal cancer and cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment. *Sci Rep*. 2022;12:20152.
108. Shirasu N, Yamada H, Shibaguchi H, Kuroki M, Kuroki M. Potent and specific antitumor effect of CEA-targeted photoimmunotherapy. *International Journal of Cancer*. 2014;135:2697–710.
109. Nagaya T, Okuyama S, Ogata F, Maruoka Y, Choyke PL, Kobayashi H. Near infrared photoimmunotherapy using a fiber optic diffuser for treating peritoneal gastric cancer dissemination. *Gastric Cancer*. 2019;22:463–72.
110. Nagaya T, Okuyama S, Ogata F, Maruoka Y, Choyke PL, Kobayashi H. Endoscopic near infrared photoimmunotherapy using a fiber optic diffuser for peritoneal dissemination of gastric cancer. *Cancer Sci*. 2018;109:1902–8.
111. Sato K, Choyke PL, Kobayashi H. Photoimmunotherapy of gastric cancer peritoneal carcinoma in a mouse model. *PLoS One*. 2014;9:e113276.
112. Inagaki FF, Wakiyama H, Furusawa A, Okada R, Kato T, Fujimura D, et al. Near-infrared photoimmunotherapy (NIR-PIT) of bone metastases. *Biomed Pharmacother*. 2023;160:114390.
113. Fujimoto S, Muguruma N, Okamoto K, Kurihara T, Sato Y, Miyamoto Y, et al. A Novel Theranostic Combination of Near-infrared Fluorescence Imaging and Laser Irradiation Targeting c-KIT for Gastrointestinal Stromal Tumors. *Theranostics*. 2018;8:2313–28.
114. Nishino H, Turner MA, Amirfakhri S, Lwin TM, Hosseini M, Singer BB, et al. Proof of Principle of Combining Fluorescence-Guided Surgery with Photoimmunotherapy to Improve the Outcome of Pancreatic Cancer Therapy in an Orthotopic Mouse Model. *Ann Surg Oncol*. 2023;30:618–25.
115. Maawy AA, Hiroshima Y, Zhang Y, Garcia-Guzman M, Luiken GA, Kobayashi H, et al. Photoimmunotherapy lowers recurrence after pancreatic cancer surgery in orthotopic nude mouse models. *J Surg Res*. 2015;197:5–11.
116. Hiroshima Y, Maawy A, Zhang Y, Guzman MG, Heim R, Makings L, et al. Photoimmunotherapy Inhibits Tumor Recurrence After Surgical Resection on a Pancreatic Cancer Patient-Derived Orthotopic Xenograft (PDOX) Nude Mouse Model. *Ann Surg Oncol*. 2015;22 Suppl 3:S1469-1474.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

117. Maawy AA, Hiroshima Y, Zhang Y, Heim R, Makings L, Garcia-Guzman M, et al. Near infra-red photoimmunotherapy with anti-CEA-IR700 results in extensive tumor lysis and a significant decrease in tumor burden in orthotopic mouse models of pancreatic cancer. *PLoS One*. 2015;10:e0121989.
118. Hollandsworth HM, Amirfakhri S, Filemoni F, Molnar J, Hoffman RM, Yazaki P, et al. Near-infrared photoimmunotherapy is effective treatment for colorectal cancer in orthotopic nude-mouse models. *PLoS One*. 2020;15:e0234643.
119. Ali T, Nakajima T, Sano K, Sato K, Choyke PL, Kobayashi H. Dynamic fluorescent imaging with indocyanine green for monitoring the therapeutic effects of photoimmunotherapy. *Contrast Media & Molecular*. 2014;9:276–82.
120. Nakajima T, Sano K, Mitsunaga M, Choyke PL, Kobayashi H. Real-time monitoring of in vivo acute necrotic cancer cell death induced by near infrared photoimmunotherapy using fluorescence lifetime imaging. *Cancer Res*. 2012;72:4622–8.
121. Mitsunaga M, Nakajima T, Sano K, Choyke PL, Kobayashi H. Near-infrared Theranostic Photoimmunotherapy (PIT): Repeated Exposure of Light Enhances the Effect of Immunoconjugate. *Bioconjugate Chem*. 2012;23:604–9.
122. Jin J, Barnett JD, Krishnamachary B, Mironchik Y, Luo CK, Kobayashi H, et al. Evaluating near-infrared photoimmunotherapy for targeting fibroblast activation protein- $\alpha$  expressing cells in vitro and in vivo. *Cancer Sci*. 2023;114:236–46.
123. Yamashita S, Kojima M, Onda N, Yoshida T, Shibutani M. Trastuzumab-based near-infrared photoimmunotherapy in xenograft mouse of breast cancer. *Cancer Med*. 2023;12:4579–89.
124. Nagaya T, Sato K, Harada T, Nakamura Y, Choyke PL, Kobayashi H. Near Infrared Photoimmunotherapy Targeting EGFR Positive Triple Negative Breast Cancer: Optimizing the Conjugate-Light Regimen. *PLoS One*. 2015;10:e0136829.
125. Mitsunaga M, Nakajima T, Sano K, Kramer-Marek G, Choyke PL, Kobayashi H. Immediate in vivo target-specific cancer cell death after near infrared photoimmunotherapy. *BMC Cancer*. 2012;12:345.
126. Jordà-Redondo M, Piqueras A, Castillo A, Fernández PL, Bresolí-Obach R, Blay L, et al. An antibody-photosensitizer bioconjugate overcomes trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2025;290:117511.
127. Burke EC, Karpeh MS, Conlon KC, Brennan MF. Laparoscopy in the management of gastric adenocarcinoma. *Ann Surg*. 1997;225:262–7.
128. Orosco RK, Tapia VJ, Califano JA, Clary B, Cohen EEW, Kane C, et al. Positive Surgical Margins in the 10 Most Common Solid Cancers. *Sci Rep*. 2018;8:5686.
129. Goffredo P, Zhou P, Ginader T, Hrabe J, Gribovskaja-Rupp I, Kapadia M, et al. Positive circumferential resection margins following locally advanced colon cancer surgery: Risk factors and survival impact. *J Surg Oncol*. 2020;121:538–46.
130. Bundred JR, Michael S, Stuart B, Cutress RI, Beckmann K, Holleczeck B, et al. Margin status and survival outcomes after breast cancer conservation surgery: prospectively registered systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2022;e070346.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

131. Colceriu O. Women and Cancer: More than 12 million reasons for action! [Internet]. European Cancer Organisation. 2024 [cited 2025 May 10]. Available from: <https://www.europeancancer.org/resources/publications/reports/women-and-cancer-more-than-12-million-reasons-for-action.html>
132. Ministerio de Sanidad - Áreas - Estrategia en cáncer [Internet]. [cited 2025 May 10]. Available from: <https://www.sanidad.gob.es/areas/calidadAsistencial/estrategias/cancer/home.htm>

The image shows a microscopic view of biological tissue, likely muscle fibers, characterized by a repeating pattern of concentric rings. A large, irregular cyan-colored overlay covers the upper portion of the image, while the lower portion remains in grayscale. The text '11. ANEXOS' is centered in the cyan area.

# 11. ANEXOS



## 11.1. APROBACIÓN DEL COMITÉ ÉTICO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL (CEEA) DEL INSTITUT GERMANS TRIAS I PUJOL (IGTP)



### Informe del Comitè Ètic d'Experimentació Animal de l'Institut de Recerca Germans Trias i Pujol

Patricia Fachal Hernández, Secretària del Comitè Ètic d'Experimentació Animal de l'Institut Recerca Germans Trias i Pujol (CEEA - IGTP),

CERTIFICO:

Que en data 23 de Març de 2022 aquest Comitè va avaluar el projecte núm. CEEA-IGTP **22-003-JJI** titulat: "**Fotoimmunoteràpia en el tractament del càncer de mama HER2 positiu**" presentat per **Ana Maria Piqueras Hinojo** que:

El projecte i els procediments que en formen part són idonis en relació als objectius de l'estudi.

No existeixen altres mètodes alternatius per obviar la utilització d'animals

Les espècies seleccionades son les idònies pel tipus d'estudi a realitzar.

S'utilitza el menor nombre d'animals possibles en aquest estudi per arribar a conclusions vàlides.

El projecte té en compte els aspectes relacionats amb la utilització d'analgèsics i/o altres mètodes per eliminar al màxim el dolor, el patiment o l'angoixa dels animals en experimentació a fi i efecte d'evitar qualsevol patiment innecessari de l'animal.

I que aquest Comitè dóna el vistiplau a aquest projecte.

Badalona, 30 de Març de 2022

Patricia Fachal Hernández  
Secretària del CEEA - IGTP

## **11.2. RESOLUCIÓN DE LA AUTORIZACIÓN DE PROYECTO DE EXPERIMENTACIÓN DE LA GENERALITAT DE CATALUNYA**

La autorización definitiva del proyecto por parte de la Generalitat de Catalunya quedó condicionada a la modificación del método de confirmación de la muerte empleado en los procedimientos. En respuesta a esta indicación, se aportó una nueva versión de la memoria del proyecto en la que se incorporó la luxación cervical como método alternativo de confirmación, en sustitución del rigor mortis, por no ser este último adecuado en los casos en que se requiere obtención de muestras post mortem. Esta modificación fue aceptada, permitiendo así la aprobación final del proyecto.


 Generalitat de Catalunya  
 Departament d'Acció Climàtica,  
 Alimentació i Agenda Rural  
**Direcció General de Polítiques Ambientals  
 i Medi Natural**
**RESOLUCIÓ**Assumpte: autorització de projecte d'experimentació núm. **11756****Identificació de l'expedient**

Expedient núm. FUE-2022-02520103 i ID 2NL4NP99B relatiu a la sol·licitud d'un projecte d'experimentació amb animals.

**Antecedents**

1. El centre usuari Institut Germans Trias i Pujol va presentar sol·licitud d'autorització per a l'execució del projecte d'experimentació:
  - a. Títol: Fotoinmunoterapia en el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo
  - b. Responsable del projecte: Anna Piqueras Hinojo
2. La Comissió d'Experimentació Animal, com a òrgan habilitat, en data 18/05/2022 va avaluar el projecte d'acord amb l'article 34 del Reial Decret 53/2013, d'1 de febrer, amb un informe Favorable condicionat a l'aportació de nova documentació.

Així mateix, en la pestanya de danys del resum no tècnic, s'ha de corregir l'espècie, indicant ratolí, i cal emplenar amb 0 les caselles buides de la primera fila.

La Comissió recomana aquesta publicació:

- Sachs N, et al. *A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity*. Cell. 2018 Jan 11;172(1-2):373-386.e10

**Fonaments de dret**

1. Llei 5/1995, de 21 de juny, de protecció dels animals utilitzats per a experimentació i per a altres finalitats científiques.
2. El Decret 214/1997, de 30 de juliol, pel qual es regula la utilització d'animals per a experimentació i per altres finalitats científiques.
3. Directiva 2010/63/UE del Parlament Europeu i del Consell de 22 de setembre de 2010 relativa a la protecció dels animals utilitzats per a finalitats científiques.
4. Reial Decret 53/2013, d'1 de febrer, pel qual s'estableixen les normes bàsiques aplicables per a la protecció dels animals utilitzats en experimentació i altres fins científics, incloent-hi la docència.
5. Llei 6/2013, d'11 de juny, de modificació de la Llei 32/2007, de 7 de novembre, per a la cura dels animals, en la seva explotació, transport, experimentació i sacrifici.
6. Reial decret 1386/2018, de 19 de novembre, pel qual es modifica el Reial decret 53/2013, d'1 de febrer, pel qual s'estableixen les normes bàsiques aplicables per a la protecció dels animals utilitzats en experimentació i altres finalitats científiques, incloent la docència.

 Provença, 204-208  
 08036 Barcelona  
 Tel. 93 495 80 00

	Doc original signat per: Marc Vilahur Chiaraviglio 03/06/2022	Document electrònic garantit amb signatura electrònica. Podeu verificar la seva integritat al web <a href="http://csv.gencat.cat">csv.gencat.cat</a> fins al 10/06/2027	Data creació còpia: 10/06/2022 12:37:48
	Original electrònic / Còpia electrònica autèntica CODI SEGUR DE VERIFICACIÓ 		Pàgina 1 de 2
		0BJ49OQEZOW5GRIT600N7IPXP3SNWNYC	

**Resolució**

Per tant, resol:

1. Informar Favorablement la sol·licitud d'autorització del projecte d'experimentació que es relaciona a continuació:

Títol: Fotoimmunoterapia en el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo

Responsable del projecte: Anna Piqueras Hinojo

Usuari: Institut Germans Trias i Pujol

Instal·lació on es realitzarà el projecte: CMCiB (B9900005)

1.1 Condicionant:

Aportació d'una nova memòria de procediment on s'indiqui un mètode alternatiu de confirmació de la mort, atès que el rigor mortis no és adequat si es volen agafar mostres.

2. Assignar al projecte el núm. d'ordre: 11756
3. Autoritzar la realització d'aquest projecte d'experimentació durant cinc anys a partir de la data de signatura d'aquesta resolució. En el moment que es disposi d'un mètode validat alternatiu a l'ús d'animals per a qualsevol dels procediments que integren el projecte, aquesta autorització quedarà suspesa i sense efecte.

Aquesta autorització no eximeix del compliment i disposició d'altres autoritzacions, d'acord amb la normativa sectorial vigent.

Contra aquesta resolució que no exhaurix la via administrativa, es pot interposar recurs d'alçada davant la secretària de Medi Ambient i Sostenibilitat en el termini d'un mes, a comptar de l'endemà de la notificació d'aquesta resolució, segons el que estableix l'article 112, 121 i 122 de la Llei 39/2015, d'1 d'octubre, del procediment administratiu comú de les administracions públiques.

Marc Vilahur i Chiaraviglio  
El director general de Polítiques Ambientals i Medi Natural

Signat electrònicament

	Doc original signat per: Marc Vilahur Chiaraviglio 03/06/2022	Document electrònic garantit amb signatura electrònica. Podeu verificar la seva integritat al web csv.gencat.cat fins al 10/06/2027	Data creació còpia: 10/06/2022 12:37:48
	Original electrònic / Còpia electrònica autèntica CODI SEGUR DE VERIFICACIÓ  0BJ49OQEZOW5GRIT600N7IPXP3SNWNYC		Pàgina 2 de 2

## 11.3. INFORME DE EVALUACIÓN DEL PROYECTO POR LA COMISIÓN DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL COMO ÓRGANO HABILITADO POR LA GENERALITAT DE CATALUNYA



GENERALITAT DE CATALUNYA


 Generalitat de Catalunya  
 Departament d'Acció Climàtica,  
 Alimentació i Agenda Rural  
 Direcció General de Polítiques Ambientals  
 i Medi Natural  
**Comissió d'Experimentació Animal**  
**Òrgan Habilitat**

Ref. núm. informe: CEA-OH/11756/1

<b>INFORME D'AVALUACIÓ D'UN PROJECTE PER LA COMISSIÓ D'EXPERIMENTACIÓ ANIMAL COM A ÒRGAN HABILITAT PER LA GENERALITAT DE CATALUNYA (Reial Decret 53/2013, d'1 de febrer)</b>
Ref. núm. de projecte: 11756
Títol del projecte: <b>Fotoimmunoterapia en el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo</b>
Projecte tipus: <input type="checkbox"/> I <input checked="" type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III
Persona responsable del projecte: Anna Piqueras Hinojo
Data d'admissió de la documentació: 30.03.2022
Data d'avaluació per la CEA com a OH: 18.05.2022

Revisada la documentació presentada, s'informen, d'acord amb la normativa vigent, els punts següents:

1. Avaluada la informació relativa a la procedència dels animals (art.19 del RD 53/2013 d'1 de febrer i només per a les espècies incloses a l'annex I del RD 53/2013 d'1 de febrer o a l'annex de la Llei 5/1995, de 21 de juny), s'informa, (\*) la utilització de gossos i gats rodadors, i els provinents de centres de recollida d'animals abandonats està prohibida a Catalunya (art. 4.1.a de la Llei 5/1995)

No procedeix, atès que l'espècie animal no està inclosa a l'annex I del RD 53/2013, d'1 de febrer.

Favorablement

Desfavorablement, atès que

Observacions/Justificació:

2. Avaluada la informació presentada relativa a la utilització de primats no humans en el projecte, d'acord amb l'art. 21 del RD 53/2013 d'1 de febrer, s'informa,

No procedeix, atès que no s'utilitzen primats no humans.

Favorablement.

Desfavorablement, atès que

Observacions/Justificació:

3. Avaluada la informació relativa a l'ús d'anestèsia durant el projecte (art. 26 del RD 53/2013 d'1 de febrer), s'informa,

No procedeix, atès que el projecte no ho requereix.

Favorablement el protocol d'anestèsia a aplicar.

Favorablement la justificació presentada pel responsable del projecte en relació amb la no utilització de l'anestèsia per ser incompatible amb el projecte o per estar contraindicada.

Desfavorablement, atès que

Observacions/Justificació:

Provença, 204-208  
08036 Barcelona  
Telèfon: 93 495 80 00

1

	Doc. original signat per: Silvia Lleonart Roura 02/06/2022	Document electrònic garantit amb signatura electrònica. Podeu verificar la seva integritat al web csv.gencat.cat fins al 10/06/2027	Data creació còpia: 10/06/2022 12:37:57
	Original electrònic / Còpia electrònica autèntica CODI SEGUR DE VERIFICACIÓ 		Pàgina 1 de 5

0MRCZCW3K13Z78Q00PY8REHA4RF3LZ7T

 Generalitat de Catalunya  
 Departament d'Acció Climàtica,  
 Alimentació i Agenda Rural  
 Direcció General de Polítiques Ambientals  
 i Medi Natural  
**Comissió d'Experimentació Animal**  
**Òrgan Habilitat**

Ref. núm. informe: CEA-OH/11756/1

4. Avaluada la informació relativa a l'ús d'analgèsia o altres mètodes destinats a eliminar al màxim el dolor, el sofriment durant el projecte (art. 26 del RD 53/2013 d'1 de febrer), s'informa,

- No procedeix, atès que el projecte no ho requereix.
- Favorablement el protocol d'analgèsia o altres mètodes a aplicar destinats a eliminar al màxim el dolor.
- Favorablement la justificació presentada pel responsable del projecte en relació amb la no utilització de l'analgèsia per ser incompatible amb el projecte o per estar contraindicada.
- Desfavorablement, atès que

Observacions/Justificació:

5. Avaluada la informació relativa a les condicions d'allotjament, zootècniques i de cura dels animals en el projecte (art. 6 del RD53/2013 d'1 de febrer), s'informa,

- No procedeix, atès que el projecte no ho requereix.
- Favorablement.
- Desfavorablement, atès que

Observacions/Justificació:

6. Mètode d'eutanàsia:

6.1. Avaluada la informació relativa al mètode d'eutanàsia (art. 7 i annex III del RD 53/2013 d'1 de febrer) en finalitzar el projecte, s'informa,

- No procedeix, atès que els animals no són eutanasiats
- Favorablement
- Desfavorablement, atès que

Observacions/Justificació:

6.2. I en relació amb el mètode d'eutanàsia en aplicació a criteris de punt final, s'informa,

- No procedeix, atès que el projecte no ho requereix.
- Favorablement.
- Desfavorablement, atès que

Observacions/Justificació:

7. Avaluades les condicions generals previstes en l'execució del projecte (art. 25.3 del RD 53/2013 d'1 de febrer) s'informa,

- Favorablement, atès que el projecte es realitzaria tenint en compte evitar als animals qualsevol dolor, sofriment, angouxa o dany durador innecessari.
- Desfavorablement, atès que

Observacions/Justificació:

	Doc. original signat per: Silvia Lleonart Roura 02/06/2022	Document electrònic garantit amb signatura electrònica. Podeu verificar la seva integritat al web <a href="http://csv.gencat.cat">csv.gencat.cat</a> fins al 10/06/2027	Data creació còpia: 10/06/2022 12:37:57
	Original electrònic / Còpia electrònica autèntica CODI SEGUR DE VERIFICACIÓ  0MRCZCW3K13Z78Q00PY8REHA4RF3LZ7T		Pàgina 2 de 5

 Generalitat de Catalunya  
 Departament d'Acció Climàtica,  
 Alimentació i Agenda Rural  
 Direcció General de Polítiques Ambientals  
 i Medi Natural  
**Comissió d'Experimentació Animal**  
**Òrgan Habilitat**

Ref. núm. informe: CEA-OH/11756/1

8. Avaluada la informació presentada en relació amb l'acreditació/capacitació del personal que participa en el projecte (art. 25.5 del RD 53/2013 d'1 de febrer), s'informa,  
 Favorablement.

Desfavorablement, atès que  
 Observacions/Justificació:

9. Avaluada la informació relacionada amb el transport dels animals (art. 9.1 del RD 53/2013 d'1 de febrer), s'informa,

No procedeix, atès que els animals no són transportats durant el projecte.

Favorablement.  
 Desfavorablement, atès que  
 Observacions/Justificació:

10. Avaluada la informació relativa a la utilització d'animals d'espècies amenaçades (art. 20 del RD 53/2013 d'1 de febrer), s'informa,

No procedeix  
 Favorablement.

Desfavorablement, atès que  
 Observacions/Justificació:

11. Avaluada la informació relativa a la utilització d'animals capturats en la natura (art. 22 del RD 53/2013 d'1 de febrer), s'informa,

No procedeix.  
 Favorablement.

Desfavorablement, atès que  
 Observacions/Justificació:

12. Avaluada la informació relativa a la reutilització d'animals (utilització d'animals que han esta sotmesos prèviament a un altre projecte) (art. 29 del RD 53/2013 d'1 de febrer), s'informa,

No procedeix.  
 Favorablement.

Desfavorablement, atès que  
 Observacions/Justificació:

13. Avaluada la finalitat, els beneficis científics i, si s'escau, el valor docent del projecte (art. 34.2a del RD 53/2013 d'1 de febrer) s'informa,

Favorablement.  
 Desfavorablement, atès que  
 Observacions/Justificació:

	Doc. original signat per: Silvia Lleonart Roura 02/06/2022	Document electrònic garantit amb signatura electrònica. Podeu verificar la seva integritat al web <a href="http://csv.gencat.cat">csv.gencat.cat</a> fins al 10/06/2027	Data creació còpia: 10/06/2022 12:37:57
	Original electrònic / Còpia electrònica autèntica CODI SEGUR DE VERIFICACIÓ  0MRCZCW3K13Z78Q00PY8REHA4RF3LZ7T		Pàgina 3 de 5

 Generalitat de Catalunya  
 Departament d'Acció Climàtica,  
 Alimentació i Agenda Rural  
 Direcció General de Polítiques Ambientals  
 i Medi Natural  
**Comissió d'Experimentació Animal**  
**Òrgan Habilitat**

Ref. núm. informe: CEA-OH/11756/1

14. Avaluada la conformitat amb les 3Rs (art.34.2b del RD 53/2013 d'1 de febrer), s'informa,  
 Favorablement.  
 Desfavorablement.  
 Observacions/Justificació:

15. Avaluat el grau de severitat indicat a la memòria del projecte (art.34.2c del RD 53/2013 d'1 de febrer) s'informa,  
 Favorablement.  
 Desfavorablement, atès  
 Observacions/Justificació:

Amb la classificació de:  
 Sense recuperació  Lleu  Moderat  Sever

16. Balanç ètic: analitzats els danys i beneficis del projecte (art.34.2d del RD 53/2013 d'1 de febrer), s'informa,  
 Favorablement.  
 Desfavorablement.  
 Observacions/Justificació:

17. El projecte requereix un resum no tècnic (art. 33.1 del RD 53/2013 d'1 de febrer).  
 Sí  
 No  
 Atès que és de Tipus II

18. Avaluació retrospectiva del projecte (art. 35.1 del RD 53/2013 d'1 de febrer).  
 Atès que el projecte,  
 Utilitza primats.  
 S'utilitzen primats per a finalitats diferents a les previstes a l'art. 21.2.a del RD 53/2013 d'1 de febrer.  
 Ha estat classificat com a sever.  
 El projecte implica un dolor greu i perllongat que no pot ser alleujat.  
 Altres: Article 33.6 f) del RD 53/2013  
 Justificació:

S'informa que el projecte,  
 No requereix avaluació retrospectiva.  
 Sí requereix avaluació retrospectiva, la qual s'ha de realitzar

19. Altres comentaris:

- Cal l'aportació d'una nova memòria de procediment on s'indiqui un mètode alternatiu de confirmació de la mort, atès que el *riqor mortis* no és adequat si es volen agafar mostres.

4

Provença, 204-208  
 08036 Barcelona  
 Telefon: 93 495 80 00

	Doc. original signat per: Silvia Leonart Roura 02/06/2022	Document electrònic garantit amb signatura electrònica. Podeu verificar la seva integritat al web <a href="http://csv.gencat.cat">csv.gencat.cat</a> fins al 10/06/2027	Data creació còpia: 10/06/2022 12:37:57
	Original electrònic / Còpia electrònica autèntica CODI SEGUR DE VERIFICACIÓ		Pàgina 4 de 5
			
		0MRCZCW3K13Z78Q00PY8REHA4RF3LZ7T	


 Generalitat de Catalunya  
 Departament d'Acció Climàtica,  
 Alimentació i Agenda Rural  
 Direcció General de Polítiques Ambientals  
 i Medi Natural  
**Comissió d'Experimentació Animal**  
**Òrgan Habilitat**

Ref. núm. informe: CEA-OH/11756/1

Així mateix, en la pestanya de danys del resum no tècnic, s'ha de corregir l'espècie, indicant ratolí, i cal emplenar amb 0 les caselles buides de la primera fila.

La Comissió recomana aquesta publicació:

- Sachs N, et al. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. Cell. 2018 Jan 11;172(1-2):373-386.e10

**RESULTAT FINAL DE L'INFORME.**

Per tant, tenint en compte l'informe de cadascun dels punts anteriors,

- S'informa FAVORABLEMENT  
 S'informa DESFAVORABLEMENT

Justificació:

Sílvia Leonart Roura  
 La secretària de la Comissió d'Experimentació Animal

Signat electrònicament

5

Provença, 204-208  
 08036 Barcelona  
 Telèfon: 93 495 80 00

	Doc. original signat per: Sílvia Leonart Roura 02/06/2022	Document electrònic garantit amb signatura electrònica. Podeu verificar la seva integritat al web <a href="http://csv.gencat.cat">csv.gencat.cat</a> fins al 10/06/2027	Data creació còpia: 10/06/2022 12:37:57
		Original electrònic / Còpia electrònica autèntica CODI SEGUR DE VERIFICACIÓ  0MRCZCW3K13Z78Q00PY8REHA4RF3LZ7T	Pàgina 5 de 5

## **11.4. CAPACITACIÓN DEL EQUIPO EN EL DISEÑO DE PROYECTOS Y PROCEDIMIENTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL, REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS Y EUTANASIA**

Todos los procedimientos experimentales descritos en esta tesis fueron realizados por personal debidamente acreditado para el manejo de animales de experimentación. La Dra Lúdia Blay Aulina dispone de acreditación oficial para el diseño de proyectos y procedimientos, así como para la manipulación de animales de laboratorio. Por mi parte, Ana Piqueras Hinojo, cuento con la acreditación correspondiente para la realización de procedimientos y eutanasia. Ambas certificaciones han sido emitidas por la Direcció General de Polítiques Ambientals i Medi Natural de la Generalitat de Catalunya y se encontraban vigentes durante el desarrollo del proyecto.



Generalitat de Catalunya  
**Departament d'Acció Climàtica,  
Alimentació i Agenda Rural**

Antoni Ferran i Mèlich

Director General de Polítiques Ambientals i Medi Natural

CERTIFICADO

Que en/na: Que el/la Sr./Sra.:

**LIDIA BLAY AULINA**

amb/con NIF/NIE:

**45786321Z**

<p>ha obtingut el reconeixement de la capacitat d'acord amb l'Ordre ECC/566/2015, de 20 de març, per la que s'estableixen els requisits de capacitat que ha de complir el personal que manipuli animals utilitzats, criats o subministrats amb finalitats d'experimentació i altres finalitats científiques incloent la docència, en les funcions següents:</p> <p><b>Disseny dels projectes i procediments</b></p> <p>per a les espècies animals següents:</p> <p><b>Ratolí, Rata, Conill</b></p> <p>El manteniment d'aquesta capacitat, s'ha de demostrar almenys cada vuit anys, d'acord amb l'establert en l'article 20 de l'Ordre ECC/566/2015, de 20 de març, a partir de la data de signatura del present certificat.</p>	<p>ha obtenido el reconocimiento de la capacitación de acuerdo con la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, en las siguientes funciones:</p> <p><b>Diseño de los proyectos y procedimientos</b></p> <p>para las siguientes especies animales:</p> <p><b>Ratón, Rata, Conejo</b></p> <p>El mantenimiento de esta capacitación, se debe demostrar al menos cada ocho años, de acuerdo a lo establecido en el artículo 20 de la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, a partir de la fecha del presente certificado.</p>
--	--

I perquè així consti, signo el present certificat / Y para que así conste, firmo el presente certificado

Signat electrònicament / Firmado electrónicamente

	Doc. original signat per: Antoni Ferran Melich 20/09/2021	Document electrònic garantit amb signatura electrònica. Podeu verificar la integritat d'aquest document a l'adreça web csv.gencat.cat  Original electrònic / Còpia electrònica autèntica  CODI SEGUR DE VERIFICACIÓ  	Data creació còpia: 01/10/2021 13:13:54  Data caducitat còpia: 01/10/2026 00:00:00  Pàgina 1 de 1
	0NTC5F0OSF5VPD62M687ZV32JZQ71GA!		

11. ANEXOS



GENERALITAT DE CATALUNYA



Generalitat de Catalunya  
**Departament d'Acció Climàtica,  
 Alimentació i Agenda Rural**

Antoni Ferran i Mèlich  
 Director General de Polítiques Ambientals i Medi Natural

CERTIFICO

Que en/na: Que el/la Sr./Sra.:

**ANA MARIA PIQUERAS HINOJO**

amb/con NIF/NIE:

**20459349K**

<p>ha obtingut el reconeixement de la capacitació d'acord amb l'Ordre ECC/566/2015, de 20 de març, per la que s'estableixen els requisits de capacitació que ha de complir el personal que manipuli animals utilitzats, criats o subministrats amb finalitats d'experimentació i altres finalitats científiques incloent la docència, en les següents funcions:</p> <p><b>Eutanàsia dels animals                  Realització dels procediments</b></p> <p>I per a les següents espècies animals:</p> <p><b>Rata</b></p> <p>El manteniment d'aquesta capacitació, s'ha de demostrar almenys cada vuit anys, d'acord amb l'establert en l'article 20 de l'Ordre ECC/566/2015, de 20 de març, a partir de la data de signatura del present certificat.</p>	<p>ha obtenido el reconocimiento de la capacitación de acuerdo con la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, en las siguientes funciones:</p> <p><b>Eutanasia de los animales                  Realización de los procedimientos</b></p> <p>Y para las siguientes especies animales:</p> <p><b>Rata</b></p> <p>El mantenimiento de esta capacitación, se debe demostrar al menos cada ocho años, de acuerdo a lo establecido en el artículo 20 de la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, a partir de la fecha del presente certificado.</p>
--	---

I perquè així consti, signo el present certificat / Y para que así conste, firmo el presente certificado

Signat electrònicament / Firmado electrónicamente

	Doc. original signat per: Antoni Ferran Melich 18/10/2021	Document electrònic garantit amb signatura electrònica. Podeu verificar la integritat d'aquest document a l'adreça web csv.gencat.cat Original electrònic / Còpia electrònica autèntica CODI SEGUR DE VERIFICACIÓ	Data creació còpia: 18/10/2021 15:36:53  Data caducitat còpia: 18/10/2026 00:00:00  Pàgina 1 de 1
			

0BDCVZ45S86OWVY5AAAY5IWAK0E6R1BMD

## **11.5. ARTÍCULO PUBLICADO DERIVADO DE LA INVESTIGACIÓN DE LA TESIS**

Referencia: Jordà-Redondo M, Piqueras A, Castillo A, Fernández PL, Bresolí-Obach R, Blay L, et al. An antibody-photosensitiser bioconjugate overcomes trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2025;290:117511.



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ejmech](http://www.elsevier.com/locate/ejmech)

Research paper

## An antibody-photosensitizer bioconjugate overcomes trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer

Mireia Jordà-Redondo <sup>a,1</sup>, Ana Piqueras <sup>b,1,\*</sup>, Ana Castillo <sup>c</sup>, Pedro Luis Fernández <sup>c</sup>, Roger Bresolí-Obach <sup>a</sup>, Lidia Blay <sup>b</sup>, Joan Francesc Julián Ibáñez <sup>b,\*,\*\*</sup>, Santi Nonell <sup>a,\*\*\*</sup>

<sup>a</sup> Institut Químic de Sarrià, Universitat Ramon Llull, 08017, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Departments of General and Gastrointestinal Surgery, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Department of Surgery, 08916, Badalona, Spain

<sup>c</sup> Department of Pathology, IGTP (Health Research Institute Germans Trias i Pujol), Hospital Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, 08916, Badalona, Spain

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Breast cancer  
Photodynamic therapy  
Antibody-drug conjugates  
Trastuzumab  
Singlet oxygen

## ABSTRACT

HER2-positive breast cancer, characterized by the overexpression of HER2 receptors, often develops resistance to trastuzumab, limiting its therapeutic efficacy. In this study, we explore the use of photodynamic therapy (PDT) with a trastuzumab-IRDye700DX photoimmunoconjugate (Tz-IR700) as a strategy to overcome trastuzumab resistance. Tz-IR700 combines the antibody's selectivity for the tumoral cells with the cytotoxic effect of IR700, induced by red light. Our results demonstrate that Tz-IR700 selectively accumulates in trastuzumab-resistant HER2-positive tumours (HCC1954) thereby enabling precise tumour localization by fluorescence imaging. Upon irradiation with red light, Tz-IR700 induces significant HCC1954 cell viability reduction both *in vitro* and *in vivo*, notably overcoming trastuzumab resistance in this HER2-positive breast cancer cell line. Mechanistic studies unequivocally demonstrate that the primary cytotoxic species is singlet oxygen. These findings suggest that Tz-IR700 could serve as a valuable treatment option for trastuzumab-resistant HER2-positive breast cancer and may also be used as an adjuvant to fluorescence-guided surgery, improving surgical outcomes and reducing the likelihood of tumour recurrence and metastasis.

## 1. Introduction

Cancer is a common and serious disease that affects people over the world. It is known for its diversity, involving various biological components with different prognoses and oncogenic drivers. Although there are several treatment options available, such as surgery, chemotherapy, and radiation therapy, there is still a need for new approaches to improve treatment outcomes and reduce side effects [1].

The recent advances to develop targeted biomarkers for tumour detection, along with improved devices for their specific detection, have revolutionized oncological surgery [2]. However, most current diagnostic imaging techniques (e.g., magnetic resonance or positron emission tomography) are not applicable during surgery. As a result, surgeons rely on subjective assessments (subtle tactile and visual

differences) to distinguish cancerous areas from adjacent healthy tissues [3]. This can lead to incomplete tumoral resection, resulting in poorer oncological outcomes and decreased life expectancy. In fact, a recent study found that 20–40 % of breast cancers patients had positive microscopic margins, requiring re-excision or even subsequent mastectomy [4].

Fluorescence-guided surgery (FGS) have been recently developed to address this issue. FGS allows the visualization of the neoplasms in-real time during the surgery procedure. To obtain FGS images, a selective fluorescent cancer biomarker must be administered to provide optimal contrast between the tumour and surrounding healthy tissue [5]. Even if FGS could identify tumour margins with 100 % accuracy, some cancer cells might remain undetectable or impossible to resect, potentially leading to tumour regrowth or metastasis. Since light is required to

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author.

\*\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [ampiqueras.germanstrias@gencat.cat](mailto:ampiqueras.germanstrias@gencat.cat) (A. Piqueras), [jfjulian.germanstrias@gencat.cat](mailto:jfjulian.germanstrias@gencat.cat) (J.F. Julián Ibáñez), [santi.nonell@iqs.url.edu](mailto:santi.nonell@iqs.url.edu) (S. Nonell).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2025.117511>

Received 2 December 2024; Received in revised form 12 March 2025; Accepted 13 March 2025

Available online 14 March 2025

0223-5234/© 2025 Elsevier Masson SAS. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

prompt the biomarker's fluorescence, the same biomarker could be also used to induce cancer cell death if it is endowed with phototherapeutic activity, e.g., photodynamic therapy, evolving from a diagnostic to a theragnostic agent [6].

In HER2-positive breast cancer (about 15 % of all breast cancers), the amplification of the ERBB2 gene leads to an overexpression of HER2. This genetic mutation makes the cancer more aggressive and results in a worse prognosis if left untreated. Cancer cells categorized as HER2-positive can go up to 2–10 million receptors per cell membrane [7,8]. In contrast, in breast epithelial cells the level of HER-2 receptors expressed may be up to 20 000 [7]. This difference provides a unique targeted therapy using antibody-conjugates, offering selectivity to the tumoral population. This is evidenced by the success of trastuzumab-based immunotherapy. However, only a proportion of HER2+ patients are sensitive to trastuzumab treatment (inherent resistance, primary resistance). Moreover, almost all treated cancers become resistant to trastuzumab within 1 year of treatment (acquired resistance, secondary resistance) [9].

Photodynamic therapy (PDT) is a well-established local treatment that uses harmless light combined with a photosensitising agent to generate cytotoxic reactive oxygen species (ROS). The generated ROS kill the malignant cells where the photosensitizer is localized [10]. Additionally, PDT triggers an immune response that contributes to prevent cancer recurrence [11]. Photoimmunotherapy (PIT) has recently emerged as an advanced form of PDT, where the photosensitizer is selectively delivered to cancer cells through an antibody-drug conjugate [10]. A first in-human phase-1/2 clinical trial of PIT for recurrent head and neck cancer patients led to "fast tracking" by the FDA of a photoimmunconjugate involving the near-infrared-active photosensitizer IRDye® 700DX (IR700) and the antibody Cetuximab [12]. The Alluminox™ PIT treatment has been approved for clinical use in Japan [13], and a global phase-3 trial is currently underway in the US (8 institutions), India (6 institutions) and Taiwan (3 institutions) [14,15]. Thus, the question arises whether trastuzumab-PIT is effective against trastuzumab-resistant cancers. If the answer to this question would be positive, trastuzumab-PIT could become a suitable treatment for those cancers that are resistant to trastuzumab, both enabling fluorescence-guided tumour resection and eliminating residual cancer cells left behind after surgery. Recent in-vitro studies suggest that this might be the case [16], however in-vivo demonstration remains unknown.

On the other hand, there is a controversy regarding the cell death mechanism triggered by Tz-IR700 in PIT. While some studies suggest that the phototoxic effects are primarily driven by the release of axial ligands from IR700, leading to antibody aggregation and subsequent cell membrane damage [17,18], other findings emphasize the pivotal role of singlet oxygen in mediating cytotoxicity [19]. The discrepancies in these mechanisms highlight the complexity of the photochemical reactions involved.

In this study, we demonstrate that Tz-IR700 conjugates selectively accumulate in trastuzumab-resistant HER2-positive cancers, enabling in-vivo fluorescence imaging, and effectively arresting the tumour growth upon exposure to red light. We further demonstrate that the main process responsible for overcoming trastuzumab resistance and effectively kill the cancers cells is the photoinduced production of singlet oxygen.

## 2. Materials and methods

**Materials.** Trastuzumab (Tz) was purchased from Biosynth (Bratislava, Slovakia) and provided as 20 mg/mL stock solution in PBS. IRDye®700DX (IR700) NHS ester was purchased from LI-COR (Lincoln, NE, USA) and received as a powder. Disodium hydrogen phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) and paraffin were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) was prepared by dissolving a commercial mixture of salts (Millipore, Darmstadt, Germany)

into 1 L Milli-Q water (purified on a Millipore Bredford system, resistivity of 18 M $\Omega$  cm. Darmstadt, Germany). Amicon ultra 2 ml 50 kDa centrifugal units, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) medium, RPMI-1640 (RPMI) medium, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, Dulbecco's phosphate-buffered saline, trypsin-EDTA solution 0.05 %, dimethyl sulfoxide (DMSO), *L*-glutamine, glucose, sodium dodecyl sulfate (SDS) and Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium were purchased from Millipore (Darmstadt, Germany). Pierce™ BCA Protein Assay Kit and cell culture plates were purchased from Thermo Fisher Scientific™ (Waltham, MA, USA). 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid (HEPES) was purchased from Scharlab (Barcelona, Spain). Sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ) was purchased from TCI (Tokyo, Japan). Deuterated water ( $\text{D}_2\text{O}$ ) was purchased from Eurisotop (Saint-Aubin, France). Antibodies for p53, ki67, BCL-2, and HER2 were purchased from Roche Diagnostics (Rotkreuz, Switzerland). Hematoxylin-eosin (H&E) was purchased from Bio-Optica (Milano, Italy). Cell culture flasks and cover glass slides were purchased from Avantor (Barcelona, Spain). Quartz cuvettes QS of 1 cm pathlength were purchased from Hellma (Müllheim, Germany). The Red 670 Device® LED-based lamp was purchased from RedLightMan (Greater Manchester, United Kingdom).

**Preparation and purification of the trastuzumab-IR700 photo-immunoconjugate.** 1 mL of phosphate buffer ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.1 M) at pH 8.5 was added to 1.0 mg Tz under gently stirring for 5 min at room temperature. The solutions were then transferred to a microtube containing 0.066 mg IR700 (molar ratio 1:5 Tz:IR700) and further stirred for 2 h at room temperature to allow conjugation. The Tz-IR700 conjugate was purified using an Amicon ultra 2 ml 50 kDa centrifugal unit and washed twice with PBS. The degree of labelling was quantified by measuring the absorbance at 280 and 689 nm in aqueous solution using a Cary 6000i spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The absorption coefficients employed were 225 000 M $^{-1}$  cm $^{-1}$  at 280 nm for Tz [20], 15 700 M $^{-1}$  cm $^{-1}$  at 280 nm for IR700, and 165 000 M $^{-1}$  cm $^{-1}$  at 689 nm for IR700 [21]. The average degree of labelling was 2 molecules of IR700 per antibody. The free- and labelled antibodies were analysed also by HPLC coupled to TOF mass spectrometry using an HPLC Agilent 1260 Infinity II system coupled to the mass-spectrometer Agilent 6230 LC/TOF (Model G6230B). To this end, the free- and labelled antibodies were deglycosylated by treating 2  $\mu\text{g}$  of the antibodies in 10  $\mu\text{L}$  of PBS (0.2 mg/mL) overnight with 0.2  $\mu\text{L}$  of PNGase (NEB, P0704S) at 37 °C. Deglycosylated samples were then injected into a bioZen 2.6  $\mu\text{m}$  Wide Pore C4 100  $\times$  2.1 mm LC column (Phenomenex, 00D-4786-AN), applying a 25–50 % gradient of acetonitrile (0.1 % formic acid) in water (0.1 % formic acid) in 10 min at a flow rate of 0.3 mL/min at 80 °C. The TOF MS was operated in positive ion mode over a  $m/z$  range of 300–3200 Da (or 7000 Da), with a cone voltage of 4000 V and a sheath gas temperature of 325 °C. Data acquisition was done with the Agilent MassHunter Workstation Data Acquisition software, while data evaluation was performed using Bioconfirm 10.0, in order to deconvolute the complex protein mass spectra that were obtained. Spectra were deconvoluted to a mass range of 10–200 kDa.

**Photophysical characterisation.** Absorption spectra were recorded on a double-beam Varian Cary 6000i UV-Vis-NIR spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Fluorescence emission spectra were recorded using a Fluoromax-4 spectrofluorometer (Horiba Jobin-Yvon, Edison, NJ, USA).

**Fluorescence quantum yield ( $\Phi_F$ ).** Fluorescence spectra were recorded with a Fluoromax-4 spectrofluorometer (Horiba Jobin-Yvon, Edison, NJ, USA). The fluorescence quantum yield of the Tz-IR700 conjugate in water was determined by comparing its total fluorescence intensity against that of an optically-matched solution of IR700 ( $\Phi_F = 0.44$ ) [22] by means of Equation (1).

$$\Phi_{F\ Tz-IR700} = \Phi_{F\ IR700} \cdot \frac{\text{Fluorescence intensity}_{Tz-IR700}}{\text{Fluorescence intensity}_{IR700}} \quad (1)$$

**Time-resolved fluorescence decays.** Fluorescence decays were measured and analysed using a FluoTime 200 time-correlated single photon counting system (PicoQuant GmbH, Berlin, Germany). The system was controlled by the PicoQuant software TimeHarp 260 version 3.2.0.0, used a 654-nm picosecond laser diode working at 10 MHz repetition rate for excitation and a PMA-M red-sensitive photomultiplier for detection. Fluorescence decay kinetics were analysed using the Picoquant EasyTau 2 version 2.2 software.

**Singlet oxygen quantum yield ( $\Phi_{\Delta}$ ).** The amount of singlet oxygen produced upon pulsed-laser excitation of **Tz-IR700** was determined by recording the time-resolved near-IR phosphorescence of singlet oxygen at 1275 nm in a modified FluoTime 200 fluorescence lifetime system from Picoquant. A 660-nm pulsed laser working at 2 kHz repetition rate (PULSELAS-A-660-50 from ALPHALAS GmbH, Göttingen, Germany) was used for excitation, and a near-IR sensitive photomultiplier (H10330C-45-C3 from Hamamatsu Photonics, Japan) was used for detection in photon counting mode. Analysis of the singlet oxygen signals according to Equation (2) yielded the triplet and singlet oxygen lifetimes,  $\tau_T$  and  $\tau_{\Delta}$ , respectively, and the  $S_{(0)}$  parameter, which is proportional to  $\Phi_{\Delta}$ .

$$S_{(t)} = S_{(0)} \frac{\tau_{\Delta}}{\tau_{\Delta} - \tau_T} (e^{-t/\tau_{\Delta}} - e^{-t/\tau_T}) \quad (2)$$

The  $\Phi_{\Delta}$  values were calculated by means of Equation (3), comparing the integrated phosphorescence intensity of optically-matched solutions of **Tz-IR700** and **IR700** in air-saturated water, for which  $\Phi_{\Delta} = 0.3$  [19, 23].

$$\Phi_{\Delta\ Tz-IR700} = \Phi_{\Delta\ IR700} \times \frac{\text{Integrated intensity}_{Tz-IR700}}{\text{Integrated intensity}_{IR700}} \quad (3)$$

**Cell lines and culture conditions.** A total of three cancer cell lines were used in this study. The HER2-expressing breast-cancer cells were BT-474 (Cell Lines Services, CLS; 300131) and HCC1954 (American Type Culture Collection, ATCC; CRL-2338), which is an inherent trastuzumab-resistant cell line [24]. As HER2-negative cell line we used HeLa cells (EUCCELLBANK; 0037-HBCK). HeLa and BT-474 were cultured in DMEM (high glucose) supplemented with 1 % (v/v) of *L*-glutamine, 10 % (v/v) of bovine foetal serum and 1 % (v/v) of penicillin/streptomycin. HCC1954 cells were cultured in RPMI, supplemented with 10 % (v/v) of bovine foetal serum and 1 % (v/v) of penicillin/streptomycin. Cells were grown in cell culture flasks in a humidified incubator at 37 °C in an atmosphere of 95 % air and 5 % carbon dioxide.

**In vitro photodynamic treatments.** Cells were seeded in a 96-well plate and incubated for 24 h at 37 °C. The culture medium was then replaced with either DMEM (for HeLa and BT-474 cells) or RPMI (for HCC1954 cells) containing **IR700** or **Tz-IR700** (0.1  $\mu$ M equivalent of **IR700**) and incubated for 6 h at 37 °C, unless otherwise stated. After two washes with PBS to remove the excess photosensitizer, fresh medium was added, and the cells were incubated for an additional hour. Then, the cells were exposed to different fluences of red light (Red 670 Device®, RedLightMan; Greater Manchester, United Kingdom;  $660 \pm 10$  nm,  $53 \text{ mW cm}^{-2}$ ) and kept in the incubator for another 24 h. Subsequently, the media was replaced with fresh media containing 0.2 mg/ml MTT and incubated for 2.5 h. Then, the media was replaced with 100  $\mu$ l of DMSO and the suspension was stirred for 10 min, placed into a microplate reader (Infinite 200 Pro, Tecan, Barcelona, Spain), and the absorbance was read at 562 nm. Cell viability was calculated as the ratio between the absorbance of treated cells and that of non-treated cells (dark cell control). The data is expressed as means  $\pm$  standard deviation. Significance analysis was performed by Student's *t*-test using the GraphPad Prism 10 software to compare treatment effects with that of controls once the normality distribution of the data was confirmed by a

Q-Q plot.

**In vitro mechanistic studies.** To ascertain the role of singlet oxygen in the phototoxicity of **Tz-IR700**, irradiation experiments were carried out in three different media: (i) RPMI supplemented with 10 mM NaN<sub>3</sub>, (ii) an H<sub>2</sub>O-based medium (H-medium) containing 140 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM glucose, and 10 mM HEPES, and (iii) a medium containing the same components dissolved in D<sub>2</sub>O (D-medium). HCC1954 cells were seeded in a 96-well plate and incubated for 24 h at 37 °C with RPMI medium. The culture medium was then replaced with RPMI medium containing **Tz-IR700** (0.1  $\mu$ M equivalent of **IR700**) and incubated for 6 h at 37 °C. After two washes with PBS, the cells were incubated with each of the media described above for one additional hour and irradiated with the Red 670 device® ( $660 \pm 10$  nm,  $53 \text{ mW cm}^{-2}$ ,  $10 \text{ J cm}^{-2}$ ). After irradiation, the medium was replaced with RPMI, the plates were incubated for 24 additional hours, and cell viability was determined by the MTT assay.

**In vitro singlet oxygen generation.** HCC1954 cells were incubated with **Tz-IR700** (2  $\mu$ M **IR700**) for 6 h at 37 °C. Cells were washed twice with PBS and trypsinized. Fresh RPMI medium was added, and the cells were centrifuged. The supernatant was discarded, and the cell pellet was resuspended in H-medium or D-medium. Singlet oxygen generation and decay were then monitored via time-resolved near-IR emission spectroscopy after excitation at 660 nm. Phosphorescence signals were recorded at 1275 nm for singlet oxygen and at 1110 nm for **IR700**. Finally, samples containing **Tz-IR700** were incubated for 15 min with sodium azide, and phosphorescence signals were again recorded at 1275 nm.

**Fluorescence microscopy.** All cells were seeded on cover glass, placed in advance in a 24-well plate, and incubated for 24 h at 37 °C. The media was replaced with fresh media containing **Tz-IR700** and let incubated for 3 h at 37 °C. After two washes of PBS, the cells were fixed with 4 % paraformaldehyde (pH = 7.4) for 30 min and washed twice with PBS. The coverslips were then transferred onto glass slides adding 20  $\mu$ l of Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium, and allowed to dry for 30 min. The fluorescence of the compound was observed with a Leica TCS SP8 laser-scanning confocal spectral microscope (Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Germany) with Argon and HeNe lasers attached to a Leica DMI8 S Platform inverted microscope. The excitation laser was at 638 nm and the emission was observed in the 690–750 nm range. Fluorescence images were analysed with the ImageJ software v1.52n.

**Animal tumour model.** Female BALB/c nude mice (4 weeks old) purchased from Charles River Laboratory (Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain) were used in the animal studies. All animal experiments were conducted in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and approved by the Generalitat de Catalunya (project number 11756). During invasive procedures, mice were anaesthetized with an inhaled 3 % isoflurane. Subcutaneous HCC1954 tumours were implanted on the mice left dorsal flank ( $4 \times 10^5$  cells in 100  $\mu$ L PBS). Tumour growth was monitored five times per week through both visual inspection and size measurement with a calliper. Small tumours were taken as models of incomplete resection. Thus, when tumours reached the maximum tumoral diameter (MTD) above 1 mm and no wider than 10 mm, mice were sorted into groups with similar MTD. Once homogeneous groups were created, they were randomised in “**Tz-IR700** Dark” and “**Tz-IR700** Light”. A total of 31 mice were used, 16 in the “**Tz-IR700** Light” group and 15 in the “**Tz-IR700** Dark” group.

The determination of our sample size for this experimental study was conducted using G\*Power software, considering key parameters such as effect size (0.5), significance level alpha (0.05), statistical power (0.80) and number of groups (2). G\*Power determined a sample size of 31 mice, ensuring that our research is robust and capable of drawing meaningful conclusions.

Not only statistical significance was taken into consideration. To comply with animal welfare regulations and embody the 3Rs principles, we aimed to use the minimum number of animals required to achieve

statistical significance.

**In vivo fluorescence studies.** All mice were dosed with 71 µg of Tz-IR700 by intraperitoneal injection. Fluorescence images were then acquired at different times using an IVIS® Lumina small animal imaging system (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, US;  $\lambda_{exc}$ : 675 nm,  $\lambda_{em}$ : 690–770 nm, luminescent exposure time: 4 s, fluorescent level string: low).

**In vivo photodynamic treatments.** All mice were dosed with 71 µg of Tz-IR700 by intraperitoneal injection. At 24 h post-injection, the “Tz-IR700 Light” group was irradiated with a light dose of 100 J cm<sup>-2</sup> using the Red 670® lamp ( $\lambda = 660 \pm 10$  nm; 53 mW cm<sup>-2</sup>) and fluorescence images were acquired again. Immediately after the irradiation, the mice were re-dosed with 71 µg of Tz-IR700 and the “Tz-IR700 Light” group was irradiated 24 h later (48 h after the initial injection). Animals were sacrificed at 72 h from the second injection (96 h from the initial injection).

Statistical analysis was conducted using the SPSS software version 28 (IBM Inc., Chicago, IL, USA). Classical statistical methods were employed to calculate the mean as a measure of central tendency and the standard deviation (SD) as a measure of dispersion. Before conducting the inferential analysis, the normality, presence of outliers and homogeneity criteria of the sample was verified. Regarding the inferential analysis, a mixed factorial ANOVA was employed, with the intra-subject dependent variable being the MTD at three measuring points (“Before PDT”, “After 1 session of PDT”, “After 2 sessions of PDT”) and the between-subject factor being “Treatment” (“PDT”, “Control”). The Type I error was set at 5% ( $p > 0.05$ ), and the statistical power at 0.8.

**Histological and immunohistochemical analysis.** Paraformaldehyde fixed tumours were embedded in paraffin, sectioned into 3–4 µm-thick slices, and mounted on microscope slides. Sections were stained with H&E to detect and grade the tumour. In breast cancer grading is based on the Nottingham modified Score (grade 1, 3–5 points; grade 2, 6–7 points; and grade 3, 8–9 points) which includes tubule formation (>75%, 1 point; 10–75%, 2 points; <10%, 3 points), nuclear pleomorphism (1–3 points) and mitotic count (1–3 points depending on microscopic field area).

Afterwards, the samples were immunostained by incubating them with antibodies specific to p53, ki67, BCL-2, and HER2 with a detection kit (Roche Diagnostics; Rotkreuz, Switzerland) according to the manufacturer's recommendations. Representative sections and pertinent controls were examined. For the evaluation of p53 expression, the tumour area was identified and the percentage of cells with nuclear positivity was estimated (high-power field of 400 × ). The same procedure, but with nuclear and cytoplasmic expression, was followed for BCL-2 interpretation. Expression of HER2 was semiquantitatively assessed by classifying expression as follows: 0, absence of staining; 1+, incomplete faint membrane staining in >10% of tumour cells; 2+, weak to moderate complete membrane staining in >10% of tumour cells; and 3+, intense and complete membrane staining in >10% of tumour cells. Ki67 nuclear expression was interpreted by evaluating the tumour samples with the program QuPath (setup parameters: detection image; “Optical density sum”, requested pixel size: 0.0001 µm and intensity threshold parameters: score compartment, “Nucleus: DAB OD mean”). All samples were simultaneously evaluated, and the pathologist was blind to sample identity.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Preparation and characterisation of the Tz-IR700 photoimmunoconjugate

IR700 was covalently attached to the lysine residues of the Tz antibody by NHS ester coupling and purified using Amicon ultra 2 mL 50 kDa-cutoff technology. The labelling ratio was two IR700 molecules per Tz, as determined by absorption spectroscopy. Analysis by HPLC coupled to a TOF mass spectrometry confirmed the conjugation of 1 and

2 molecules of IR700 per antibody (Fig. S1). The relative abundance could not be reliably determined from the mass spectrum owing to the different ionization capacity of each species resulting from the four negative charges on each IR700 molecule.

The structure and spectra of the conjugate are compared to those of the free IR700 in Fig. 1A–C. The main difference is a new absorption band at 280 nm, which is attributed to the antibody. Likewise, the fluorescence spectra are identical in shape although that of the conjugate is of slightly lower intensity, indicating that the protein quenches the singlet excited state of IR700 to some extent. Indeed, the fluorescence quantum yield ( $\Phi_F$ ) is  $\approx 11\%$  lower for Tz-IR700 than for IR700 (Table 1).

Likewise, the Tz-IR700 singlet oxygen production quantum yield ( $\Phi_{\Delta}$ ) shows a  $\approx 20\%$  reduction compared to that of IR700 ( $\Phi_{\Delta} = 0.24$  and 0.30, respectively; Fig. 1D), which is consistent with the decrease of fluorescence. This indicates that the antibody also quenches the triplet state of IR700 and/or singlet oxygen. The singlet oxygen lifetimes ( $\tau_S$ ) of IR700 and Tz-IR700 are similar (Table 1), indicating that <sup>1</sup>O<sub>2</sub> molecules decay mostly in the aqueous environment. On the other hand, the triplet lifetime ( $\tau_T$ ) is longer for Tz-IR700 than for IR700, indicating that oxygen diffusion to the chromophore is hampered by the antibody. Of note, the triplet lifetimes were confirmed by directly detecting the IR700 phosphorescence at 1100 nm (Fig. S2).

All the above data indicate that (1) IR700 is attached to the Tz antibody, and (2) the conjugate produces singlet oxygen almost as efficiently as free IR700, which in turn suggests that any other photochemical reaction, e.g., the proposed ligand release [18], is quantitatively less important than singlet oxygen production.

#### 3.2. In vitro photodynamic treatments

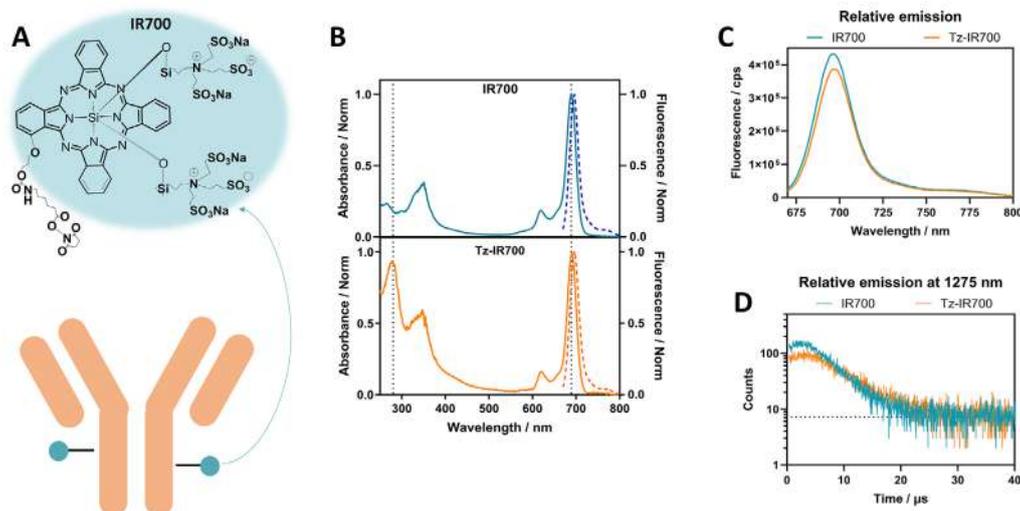
Photodynamic treatments of BT-454 HER2-positive cells with 0.1 µM Tz-IR700 showed a light-dose dependent cytotoxic effect (Fig. 2A), whereas no toxicity was observed in the non-irradiated controls. On the other hand, Tz-IR700 was not photoactive against HER2-negative HeLa cells. Once the selectivity for HER2-positive cells was confirmed, we aimed at assessing whether Tz-IR700 was active also against HER2-positive trastuzumab-resistant cancer cells. To our best delight, Tz-IR700 was active against trastuzumab-resistant HCC1954 cells (Fig. 2A), demonstrating the feasibility of using this photoimmunoconjugate to eradicate trastuzumab-resistant cancer cells. Photocytotoxicity was concentration dependent up to 0.1 µM (Fig. S3). Above this concentration, no further decrease in cell survival could be observed. A similar behaviour has been reported before for panitumumab-IR700 conjugate [25]. Additional control experiments confirmed that free IR700 is not photoactive against either of the three cell lines tested.

To confirm the specific uptake of the Tz-IR700 conjugate, confocal microscopy imaging was performed (Fig. 2B). Fluorescence from the photosensitizer was only detected in cells overexpressing the HER2 receptors (BT-474 and HCC1954). As controls, HER2-negative HeLa cells were non-fluorescent under the same imaging conditions.

Given the significance of the positive results for the HCC1954 HER2-positive trastuzumab-resistant cells, additional tests were conducted. Fig. 2C illustrates the cellular uptake kinetics for Tz-IR700, showing that the highest concentration is attained after 6 h and remains constant for at least 24 h. This finding is consistent with cell viability assay experiments, which demonstrated that extending the incubation time to 24 h did not alter the phototoxicity of Tz-IR700 (Fig. 2D).

#### 3.3. Mechanistic studies

In view of the ongoing discussion about the photochemical mechanism of cell death induced by IR700 photoimmunoconjugates [17–19] and the results above that Tz-IR700 is an excellent <sup>1</sup>O<sub>2</sub> generator in aqueous solutions, we set out to clarify the role of <sup>1</sup>O<sub>2</sub> in the



**Fig. 1.** Comparison of the optical and photophysical properties of **IR700** and **Tz-IR700**. A) Structure of **IR700** and the **Tz-IR700** conjugate. B) Absorbance (solid line) and fluorescence emission (dashed line) spectra of **IR700** (top) and **Tz-IR700** (bottom) in water. C) Relative fluorescence emission intensity of **IR700** and **Tz-IR700** in aqueous media.  $\lambda_{exc.} = 660$  nm,  $\lambda_{em.} = 670$ – $800$  nm. Optically matched samples ( $Ab_{660\text{ nm}} = 0.023$ ). D) Singlet oxygen phosphorescence decay at 1275 nm for optically matched samples of **IR700** and **Tz-IR700** in air-saturated water ( $Ab_{660\text{ nm}} = 0.023$ ).  $\lambda_{exc.} = 660$  nm.

**Table 1**  
Photophysical properties of **IR700** and **Tz-IR700** in water.

	Fluorescence		Triplet state		Singlet oxygen	
	$\tau_F/\text{ns}^a$	$\Phi_F^b$	$\tau_T/\mu\text{s}^c$	$\tau_{\Delta}/\mu\text{s}^c$	$\Phi_{\Delta}^c$	
<b>IR700</b>	4.0	0.44 [22]	2.5	3.4	0.30 [19,23]	
<b>Tz-IR700</b>	3.6	0.39	4.3	3.6	0.24	

a)  $\lambda_{exc.} = 654$  nm,  $\lambda_{em.} = 690$  nm.

b)  $\lambda_{exc.} = 660$  nm,  $\lambda_{em.} = 670$ – $800$  nm.

c)  $\lambda_{exc.} = 660$  nm,  $\lambda_{em.} = 1275$  nm, air-saturated.

photocytotoxicity of **Tz-IR700** against HCC1954 cells. Three independent experiments were carried out: on one hand, the effect of the specific  $^1\text{O}_2$  quencher sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ) [26] on the photocytotoxicity was assessed; on the other, the effect on photocytotoxicity of increasing the  $^1\text{O}_2$  lifetime by replacing  $\text{H}_2\text{O}$  with  $\text{D}_2\text{O}$  was also examined [27]. Finally, the production of singlet oxygen in the cells was unequivocally assessed by observing its specific near-IR phosphorescence [28,29].

Addition of 10 mM azide to the HCC1954 culture media before photoirradiation completely suppressed the phototoxicity of **Tz-IR700** (Fig. 3A). Of note, the cell viability level did not return to 100 % although this was due to the intrinsic toxicity of azide, as demonstrated in control experiments (Fig. 3A).

On the other hand, replacing the RPMI medium with a  $\text{D}_2\text{O}$ -based medium enhanced the **Tz-IR700** photocytotoxicity. As this could be also the result of eliminating any cell protective ingredient in the RPMI medium, a control experiment was carried out using an  $\text{H}_2\text{O}$ -based medium (H-medium) of the same composition as the  $\text{D}_2\text{O}$ -based medium (D-medium). As shown in Fig. 3A, the photocytotoxicity was higher in the H-medium (56 %) than in RPMI (45 %), but significantly lower than in the D-medium (68 %), confirming the enhancing effect of  $\text{D}_2\text{O}$  and hence firmly establishing the role of singlet oxygen in the phototoxicity of **Tz-IR700** against HCC1954 cells.

Finally, the production of singlet oxygen in **Tz-IR700**-treated

HCC1954 cells was studied by time-resolved NIR phosphorescence spectroscopy. As shown in Fig. 3B–C, the cell suspension showed a clear phosphorescence decay signal at 1275 nm in the H-medium, which was assigned to singlet oxygen since it fulfilled the well-established validation criteria: (i) the signal disappeared in the presence of 10 mM sodium azide; (ii) the emission lifetime increased in  $\text{D}_2\text{O}$ -based media (from 5.4  $\mu\text{s}$  to 13  $\mu\text{s}$ ); (iii) the signal disappeared at 1100 nm, where only the residual phosphorescence of the photosensitizer could be observed. Raw emission signals and controls are shown in Figure S4.

Taken together, the findings above unequivocally demonstrate that singlet oxygen is produced in HCC1954 cells treated with **Tz-IR700**. The enhancement with  $\text{D}_2\text{O}$  and the quenching by sodium azide align with the observed enhancement and suppression of photocytotoxicity, respectively. Thus, our results indicate that singlet oxygen is the main primary cytotoxic species in the photodynamic eradication of trastuzumab-resistant, HER2 positive HCC1954 cells.

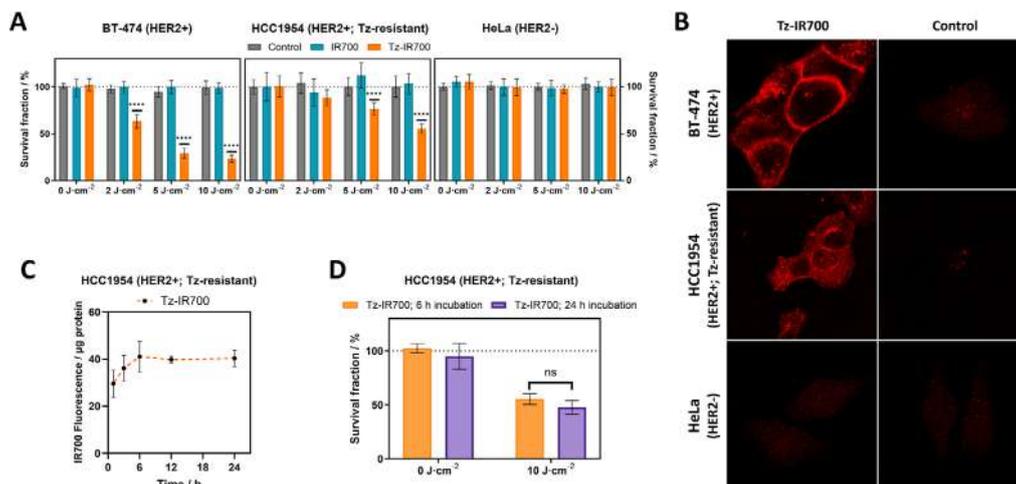
### 3.4. In vivo fluorescence studies

The drug's posology in our animal model was established based on the results of a prior pilot study. The fluorescence of **Tz-IR700** in the mice was imaged using an IVIS® Lumina imaging system. The images revealed that the peak drug fluorescence at the tumour site occurred 24 h after its injection. It was also observed that the fluorescence progressively vanished upon application of the phototherapy. Based on this, we decided to administer the therapy in two phases, with the intention of achieving a cumulative therapeutic effect, and the mice were imaged before and after each light application (Fig. 4A).

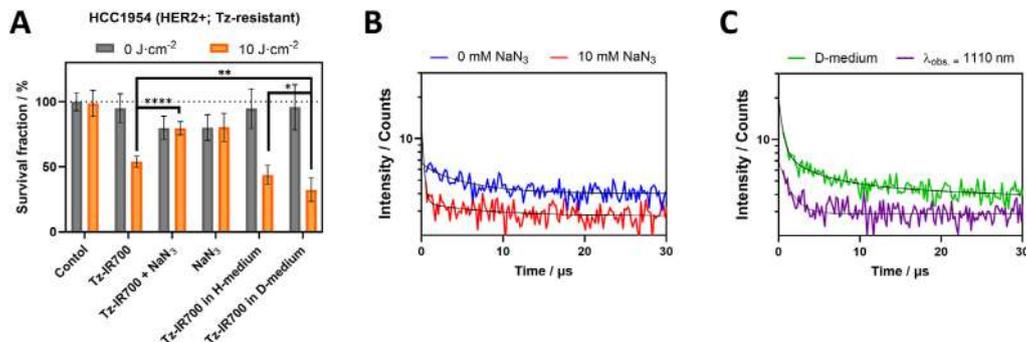
### 3.5. In vivo photodynamic treatments

Fig. 4B and Tables S1 and S2 show the evolution of the tumour size since the first irradiation. It can be appreciated that the tumour growth is arrested in the mice group that received light.

Statistical analysis of the results shows that there is a statistically



**Fig. 2.** *In vitro* cellular studies. A) Cell survival fraction of BT-474, HCC1954 and HeLa cells upon treatment with IR700 and Tz-IR700 (eq. to 0.1  $\mu\text{M}$  IR700) incubated for 6 h. Data are means  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  according to Student's *t*-test). B) Confocal fluorescence microscopy images of HCC1954, BT-474 and HeLa cells with Tz-IR700 incubated for 3 h. C) HCC1954 cellular uptake of Tz-IR700 (eq. to 0.1  $\mu\text{M}$  of IR700). Data are means  $\pm$  SD,  $n = 3$ . D) Cell survival fraction of HCC1954 with Tz-IR700 (eq. to 0.1  $\mu\text{M}$  of IR700). Samples were incubated for 6 h (orange) or 24 h (purple). Data are means  $\pm$  SD ( $n = 3$ , ns = non-significant according to Student's *t*-test). Non-treated cells were used as controls.



**Fig. 3.** *In vitro* mechanistic studies. A) Survival cell assay of Tz-IR700 (eq. to 0.1  $\mu\text{M}$  of IR700) in HCC1954 cells. Samples were incubated for 6 h with Tz-IR700 and 1 h with 10 mM of  $\text{NaN}_3$  or H-medium or D-medium. Data are means  $\pm$  SD ( $n = 3$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  according to Student's *t*-test). Non-treated cells were used as controls. B) Singlet oxygen phosphorescence decays in H-medium before (blue) and after (red) addition of 10 mM  $\text{NaN}_3$ . C) Singlet oxygen phosphorescence decays in the control experiments: signal in D-medium at 1275 nm (green) and in H-medium at 1110 nm (purple). Tz-IR700 was incubated for 6 h with the HCC1954 cells.  $\lambda_{\text{exc}} = 660$  nm.

significant effect of PDT on the MTD ( $F(2,29) = 30.938$ ,  $p < 0.05$ ,  $\eta^2 = 0.516$ ) when comparing the "Tz-IR700 Dark" and "Tz-IR700 Light" groups (Descriptive analysis shown in Table S3).

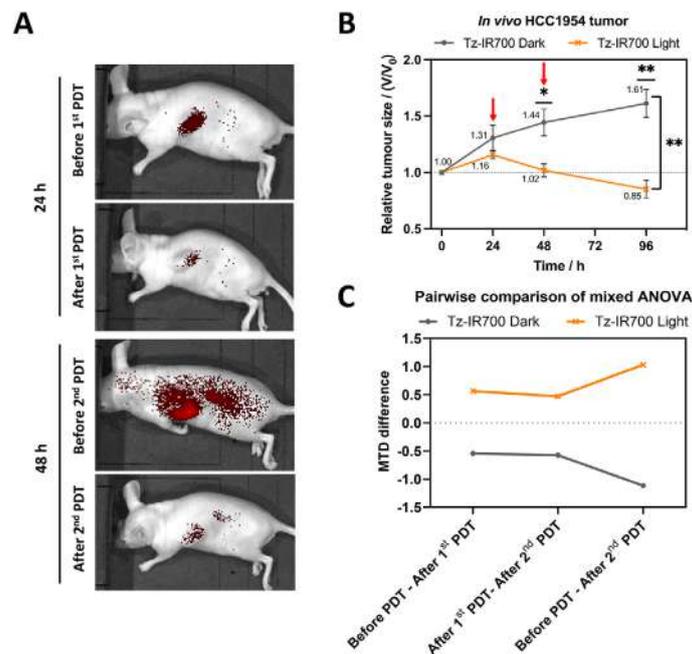
Pairwise comparisons of mixed ANOVA by group in relation to treatment phase were also assessed, where the time points "Before PDT", "After 1st PDT", and "After 2nd PDT" were used. We obtained statistically significant differences in MTD between the "Before PDT" and "After 1st PDT" measurements, between the "After 1st of PDT" and "After 2nd PDT" measurements and between the "Before PDT" and "After 2nd PDT" measurements (Table 2).

Additionally, as represented in Fig. 4C, the "Tz-IR700 Dark" group yielded negative differences in all comparisons, thus showing a

proliferative nature in tumours treated with Tz-IR700 but no light. On the contrary, the "Tz-IR700 Light" group showed positive differences, indicating a decreasing trend of tumour size after the photodynamic treatments, the reduction becoming progressively greater after each photodynamic treatment. Of note, it has been established that HCC1954 tumours grow equally well in the presence of trastuzumab as in its absence [30], confirming the added benefit of PDT over the antibody alone.

### 3.6. Histology and immunohistochemical analysis

Tumour-containing areas were analysed histologically, all specimens



**Fig. 4.** *In vivo* HCC1954 tumour studies. A) Fluorescence of the IR700 photosensitizer at the different treatment phases. B) Tumour proliferation assay in nude Balb/c mice. HCC1954 tumour cells were treated with 71  $\mu\text{g}$  Tz-IR700 and 100  $\text{J cm}^{-2}$  ( $\lambda = 660 \text{ nm}$ ). In grey control specimens (Tz-IR700 in the dark) and in orange Tz-IR700 with light treatment. Red arrows indicate the time points at which irradiation was applied. Data expressed as mean  $\pm$  SEM;  $n = 15$  for Tz-IR700 Dark and  $n = 16$  for Tz-IR700 Light group. Statistical significance was calculated by Student's *t*-test: \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ . C) Pairwise comparison of mixed ANOVA by group in relation to treatment phase.

**Table 2**

Pairwise comparison of mixed ANOVA by group in relation to the treatment phase. Data expressed as mean  $\pm$  SD, the star (\*) represents significant differences.

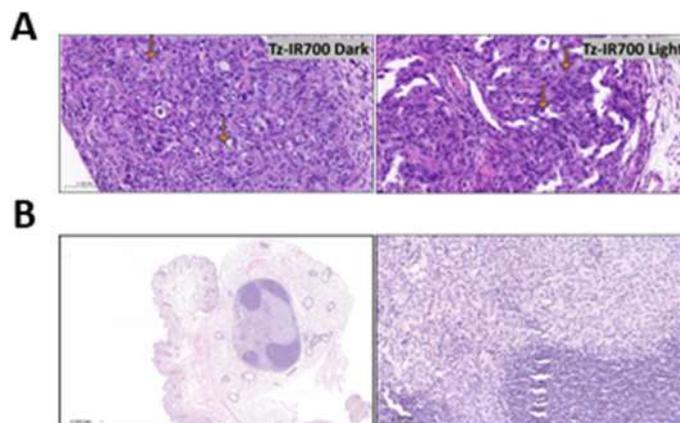
		Before PDT -After 1st PDT	After 1st PDT -After 2nd PDT	Before PDT - After 2nd PDT	Power
MTD (mm)	Tz-IR700 Dark	$-0.54 \pm 0.17^*$	$-0.57 \pm 0.17^*$	$-1.12 \pm 0.22^*$	0.991
	Tz-IR700 Light	$0.56 \pm 0.18^*$	$0.47 \pm 0.18^*$	$1.03 \pm 0.23^*$	0.970

exhibited grade 3 due to their solid growth, high nuclear pleomorphism and mitotic rate as illustrated in Fig. 5A. Three of the Tz-IR700 Light cases present an inflammatory reaction consisting in an inflammatory nodule composed by lymphocytes and histiocytes (Fig. 5B). Tumour is not identified in two of these three cases after multiple histological cuts. None of the control cases present this type of reaction.

P53 is a tumour suppressor gene, and its mutation is related to the absence of correct repair of damaged DNA. Its aberrant expression (strong staining in more than 80 % of tumour cells or complete absence of expression) has a strong correlation with the presence of mutations. BCL-2 is a proto-oncogene that prevents cells from undergoing apoptosis. Ki67 is a cell proliferation marker. Both groups (Tz-IR700 Dark and Tz-IR700 Light) do not present obvious differences in p53, BCL-2 and HER2 expression. The percentage of necrosis was slightly higher in the dark group (Table 3). Regarding Ki67, the mean of the 13 cases with tumours identified in the dark group (51.07 %) was higher than the mean of the 12 cases in the group treated with Light (42.41 %) (Table 3), as frequently occurs in human tumours treated with neoadjuvancy [31,32], supporting the conclusion that our model might have clinical applications.

#### 4. Discussion

The conjugation of the photosensitizer IR700 to different antibodies has been extensively investigated in connexion to PIT treatments. Photoimmunoconjugates reported so far include the antibodies trastuzumab [17], cetuximab [33], panitumumab [17,34,35], anti-CD44 [36], avelumab [37], rituximab [38], anti-PSMA [39], anti-CEA [40], anti-mesothelin [41], anti-TROP2 [42], anti-CD25 [43], anti-CD133 [44] and anti-CD206 [45]. In addition, IR700 has been conjugated to affibodies, low molecular weight proteins with high binding affinity to specific receptors ( $\approx 7 \text{ kDa}$ ) [46–48]. Of particular interest to this work, the Tz-IR700 photoimmunoconjugate has been studied for PIT treatment of a variety of oncological diseases [17,18,49–55]. All these reports endure the feasibility of PIT with Tz-IR700 for oncological patients. However, none of these reports addresses the issue of the usefulness of PIT against trastuzumab-resistant cancers. A recent report, however, showed that HER2-selective nanobodies and affibodies conjugates, alone or in combination with Tz, are effective against the trastuzumab-resistant cell line HCC1954, which suggests that this might be the case also for Tz-IR700 [56]. However, these nanobodies do not



**Fig. 5. Histological studies.** A) Grade 3 tumour with high pleomorphism, solid growth and high mitotic rate ( $\downarrow$ ). Left: Tz-IR700 Dark. Right: Tz-IR700 Light. B) Inflammatory reaction in Tz-IR700 Light cases.

**Table 3**

**Immunohistochemical analysis of tumour samples.** HER2 (0–1+, negative; 2+, equivocal; 3+, positive). p53 and BCL-2 percentage expression (%). Ki67 percentage expression (QuPath %).

	Tz-IR700 Dark	Tz-IR700 Light
HER2	3+	3+
p53	100 ± 0.0	97.9 ± 1.0
BCL-2	0 ± 0.0	0 ± 0.0
ki67	51.1 ± 4.1	42.4 ± 4.9
Necrosis	8.5 ± 2.8	8.3 ± 3.7

compete for the binding epitope with trastuzumab. Another recent study demonstrated the efficiency of Tz-IR700 against a different trastuzumab-resistant cell line, namely JIMT-1, however only *in vitro* [16]. The observation that the Tz-IR700 conjugate is effective against the JIMT-1 cell line does not anticipate the efficiency against the HCC1954 cell line chosen for our studies and actually points to the generalizability of our findings. Thus, our results suggest that PIT treatments with Tz-IR700 may have a wider therapeutic scope than trastuzumab alone for the treatment of HER2-positive cancers as long as the receptor retains the ability to bind trastuzumab [57]. In addition, our results also show that cumulative treatments could potentially enhance the extent of the therapeutic effect, paving the way for personalised treatment approaches tailored to individual patients.

For the surgical management of cancer, achieving complete tumour resection is crucial. In many cases, patients are deemed ineligible for surgery if it is known beforehand that the surgeon will not be able to remove the entire tumour, since incomplete surgical resections are associated with poorer oncological outcomes despite the aggressiveness of the intervention. The Union of International Cancer Control (UICC) classification of resections has shown prognostic value, where R0 are complete resections, R1 resections leaving microscopic tumours and R2 resections leaving macroscopic tumours [58]. In this context, Moore et al. have proven the potential of the combined use of panitumumab-IR700 PIT and surgery for the eradication of residual cancer cells after R1 surgical resection of head and neck cancer models [59]. In addition to the elimination of residual cancer cells, combining surgery with PIT treatments may activate anti-tumour immunity responses that may prevent tumour regrowth and metastasis [11,60]. Thus, PIT shows great potential as an adjuvant modality to surgery.

The second major finding of this work is the observation that singlet oxygen is essential for HCC1954 cell photokilling. On one hand, Tz-IR700 produces singlet oxygen both in aqueous solutions and in the HCC1954 cells, as unequivocally demonstrated by the observation of its specific phosphorescence in the near-IR. Moreover, when 10 mM sodium azide, a potent singlet oxygen quencher, was added, no photokilling could be observed. Thus, singlet oxygen is the primary cytotoxic species for this photoimmunoconjugate in the HCC1954 cells.

Our results may shed light on how IR700 photoimmunoconjugates kill cancer cells, which is currently a matter of debate. Several reports have concluded that singlet oxygen plays a minor role in the phototoxic effect of the IR700 photoimmunoconjugates. Thus, Mitsunaga et al. observed that sodium azide reduced only partially the extent of photokilling [17]. They hypothesized that the mechanism of cell death involves the rapid expansion of locally heated water, singlet oxygen having only a marginal contribution. Sato et al. reported that IR700 photoimmunoconjugates (with cetuximab, panitumumab and trastuzumab) formed non-fluorescent aggregates larger than IgG upon irradiation due to axial-ligand release [18]. Previously, they had reported that molecular oxygen did not play a major role in photocytotoxicity [21]. In contrast, Kishimoto et al. [19] and Raikar et al. [61] reported that PIT with panitumumab-IR700 is oxygen-dependent and generates ROS, identifying singlet oxygen as a significant contributor to cell death, as shown by the use of scavengers like sodium azide, biliverdin and trolox.

Additional insights can be gained from the work of Cockrell et al., [20] who observed aggregation of a trastuzumab-eosin conjugate upon exposure to light. Similar observations have been made in other conjugates [62,63]. This suggests that antibody aggregation may be a general phenomenon when photosensitisers are covalently attached to them rather than a specific effect of axial-ligand release in IR700 photoimmunoconjugates.

## 5. Conclusions

Our work demonstrates that photodynamic treatments with a Tz-IR700 photoimmunoconjugate can overcome resistance to trastuzumab in an *in vivo* model of HER2-positive breast cancer. Moreover, we provide compelling evidence for the central role of singlet oxygen in the process. The results of the study pave the way for the further development of photoimmunotherapy of cancer, alone or as an adjuvant to fluorescence-guided surgery to eliminate residual cancer cells and as a

M. Jordà-Redondo et al.

European Journal of Medicinal Chemistry 290 (2025) 117511

means to activate an immune response that may prevent tumour regrowth and the onset of metastasis. Thus, Tz-IR700 photodynamic therapy may expand the therapeutic scope of trastuzumab.

#### CRedit authorship contribution statement

**Mireia Jordà-Redondo:** Writing – original draft, Investigation. **Ana Piqueras:** Writing – original draft, Investigation. **Ana Castillo:** Writing – original draft, Investigation. **Pedro Luis Fernández:** Writing – review & editing, Validation, Supervision, Methodology, Data curation, Conceptualization. **Roger Bresolf-Obach:** Writing – review & editing, Validation, Supervision, Investigation, Data curation. **Lidia Blay:** Writing – review & editing, Supervision, Resources, Investigation, Data curation. **Joan Francesc Julián Ibáñez:** Writing – review & editing, Validation, Supervision, Resources, Project administration, Methodology, Funding acquisition, Conceptualization. **Santi Nonell:** Writing – review & editing, Validation, Supervision, Resources, Project administration, Methodology, Funding acquisition, Conceptualization.

#### Ethics

All animal experiments were approved by the Generalitat de Catalunya (project number 11756).

#### Funding

The authors gratefully acknowledge financial support from the Spanish Agencia Estatal de Investigación through grants PID2020-115801RB-C22 and PID2023-149483NB-C22, and the Fundación Científica de la AECC (grant IDEAS19135NONE). S.N. thanks the Department de Recerca i Universitats de la Generalitat de Catalunya for the support given to the research group (2021 SGR 01023) and the ICREA-Catalan Institution for Research and Advanced Studies for grant No. Ac223230. R.B.O. thanks the Spanish Agencia Estatal de Investigación for a Ramon y Cajal contract (RYC2021-032773-I). This work was also supported by a grant from the JMC Legacy Research Fund of Germans Trias i Pujol University Hospital.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2025.117511>.

#### Data availability

The data presented in this study are available in this article.

#### References

- [1] P. Tarantino, E. Hamilton, S.M. Tolaney, J. Cortes, S. Morganti, E. Ferraro, A. Marra, G. Viale, D. Trapani, F. Cardoso, F. Penault-Llorca, G. Viale, F. André, G. Curigliano, HER2-Low breast cancer: pathological and clinical landscape, *J. Clin. Oncol.* (2020) 1–13.
- [2] R.R. Zhang, A.B. Schroeder, J.J. Grudzinski, E.L. Rosenthal, J.M. Warram, A. N. Pinchuk, K.W. Elieiri, J.S. Kuo, J.P. Weichert, Beyond the margins: real-time detection of cancer using targeted fluorophores, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 14 (2017) 347–364.
- [3] E.L. Rosenthal, J.M. Warram, E. De Boer, J.P. Basilion, M.A. Biel, M. Bogyo, M. Bouvet, B.E. Brigman, Y.L. Colson, S.R. DeMeester, G.C. Gurtner, T. Ishizawa, P. M. Jacobs, S. Keereweer, J.C. Liao, Q.T. Nguyen, J.M. Olson, K.D. Paulsen, D. Rieves, B.D. Sumer, M.F. Tweedle, A.L. Vahrmeijer, J.P. Weichert, B.C. Wilson, M.R. Zenn, K.R. Zinn, G.M. Van Dam, Successful translation of fluorescence navigation during oncologic surgery: a consensus report, *J. Nucl. Med.* 57 (2016) 144–150.
- [4] Y. Zhang, J. Wu, W. Huang, Y. Wang, L. Rivera Galvis, T. Chen, B. Han, Pathologic evaluation of lumpectomy resection margins for invasive breast cancer: a single institution's experience, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 16 (2023) 40–47.
- [5] J. Keating, J. Tchou, O. Okusanya, C. Fisher, R. Batista, J. Jiang, G. Kennedy, S. Nie, S. Singhal, Identification of breast cancer margins using intraoperative near-infrared imaging, *J. Surg. Oncol.* 113 (2016) 508–514.
- [6] B. Rodríguez-Amigo, O. Planas, R. Bresolf-Obach, J. Torra, R. Ruiz-González, S. Nonell, in: H. Kostron, T. Hasan (Eds.), *Photodynamic Medicine: From Bench to Clinic*, The Royal Society of Chemistry, 2016, pp. 23–62.
- [7] J.S. Ross, J.A. Fletcher, K.J. Bloom, G.P. Linette, J. Stec, E. Clark, M. Ayers, W. F. Symmans, L. Pusztai, G.N. Hortobagyi, HER-2/neu testing in breast cancer, *Am. J. Clin. Pathol.* 120 (2003) 53–71.
- [8] S. Ahn, J.W. Woo, K. Lee, S.Y. Park, HER2 status in breast cancer: changes in guidelines and complicating factors for interpretation, *J. Pathol. Transl. Med.* 54 (2020) 34–44.
- [9] M. Sibilla, C.C. Zielinski, R. Bartsch, T.W. Grunt, *Drugs for HER-2-Positive Breast Cancer (Milestones in Drug Therapy)*, first ed., Springer, 2011.
- [10] X. Wang, D. Luo, J.P. Basilion, Photodynamic therapy: targeting cancer biomarkers for the treatment of cancers, *Cancers* 13 (2021) 1–19.
- [11] E. Reginato, Immune response after photodynamic therapy increases anti-cancer and anti-bacterial effects, *World J. Immunol.* 4 (2014) 1–11.
- [12] H. Kobayashi, P.L. Choyke, Near-infrared photoimmunotherapy of cancer, *Acc. Chem. Res.* 52 (2019) 2332–2339.
- [13] Rakuten Medical, Rakuten Medical Japan Announces Marketing Approval of Akalux® IV Infusion 250mg and BioBlade® Laser System from the Ministry of Health, Labour and Welfare in Japan for Locoregional Cancer Treatment, Rakuten Medical, Inc., 2020.
- [14] Rakuten Medical, Rakuten Medical Announces First Patient Treatment in India in Global Phase 3 Trial of Alluminox Treatment (Photoimmunotherapy) Using ASP-1929 for Recurrent Head and Neck Cancer, Rakuten Medical, Inc., 2024.
- [15] National Library of Medicine, ASP-1929 Photoimmunotherapy (PIT) Study in Recurrent Head/Neck Cancer for Patients Who Have Failed at Least Two Lines of Therapy, 2023, *ClinicalTrials.gov*.
- [16] H. Yamaguchi, J. On, T. Morita, T. Suzuki, Y. Okada, J. Ono, A. Evdokiou, Combination of near-infrared photoimmunotherapy using trastuzumab and small protein mimetic for HER2-positive breast cancer, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 1–16.
- [17] M. Mitsuana, M. Ogawa, N. Kosaka, L.T. Rosenblum, P.L. Choyke, H. Kobayashi, Cancer cell-selective in vivo near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules, *Nat. Med.* 17 (2011) 1685–1691.
- [18] K. Sato, K. Ando, S. Okuyama, S. Moriguchi, T. Ogura, S. Totoki, H. Hanaoka, T. Nagaya, R. Kokawa, H. Takakura, M. Nishimura, Y. Hasegawa, P.L. Choyke, M. Ogawa, H. Kobayashi, Photoinduced ligand release from a silicon phthalocyanine dye conjugated with monoclonal antibodies: a mechanism of cancer cell cytotoxicity after near-infrared photoimmunotherapy, *ACS Cent. Sci.* 4 (2018) 1559–1569.
- [19] S. Kishimoto, M. Bernardo, K. Saito, S. Koyasu, J.B. Mitchell, P.L. Choyke, M. C. Krishna, Evaluation of oxygen dependence on in vitro and in vivo cytotoxicity of photoimmunotherapy using IR-700-antibody conjugates, *Free Radic. Biol. Med.* 85 (2015) 24–32.
- [20] G.M. Cockrell, M.S. Wolfe, J.L. Wolfe, C. Schöneich, Photoinduced aggregation of a model antibody-drug conjugate, *Mol. Pharm.* 12 (2015) 1784–1797.
- [21] J. Jin, B. Krishnamachary, Y. Mironchik, H. Kobayashi, Z.M. Bhujwala, Phototheranostics of CD44-positive cell populations in triple negative breast cancer, *Sci. Rep.* 6 (2016).
- [22] C.J. Tynan, D.T. Clarke, B.C. Coles, D.J. Rolfe, M.L. Martin-Fernandez, S.E. D. Webb, Multicolour single molecule imaging in cells with near infra-red dyes, *PLoS One* 7 (2012) 1–7.
- [23] B. Gaitan, L. Frankle, S. Vig, E. Oskoui, M. Adwan, Y. Chen, R. Elespuru, H. C. Huang, T.J. Pfeifer, Quantifying the photochemical damage potential of contrast-enhanced fluorescence imaging products: singlet oxygen production, *Photochem. Photobiol.* 98 (2022) 736–747.
- [24] L. Gandullo-Sánchez, E. Capone, A. Ocaña, S. Iacobelli, G. Sala, A. Pandiella, HER3 targeting with an antibody-drug conjugate bypasses resistance to anti-HER2 therapies, *EMBO Mol. Med.* 12 (2020) 1–16.
- [25] T. Nakajima, K. Sato, H. Hanaoka, R. Watanabe, T. Harada, P.L. Choyke, H. Kobayashi, The effects of conjugate and light dose on photo-immunotherapy induced cytotoxicity, *BMC Cancer* 14 (2014) 389.
- [26] R.D. Hall, C.F. Chignell, Steady-state near-infrared detection of singlet molecular oxygen: a Stern-Volmer quenching experiment with sodium azide, *Photochem. Photobiol.* 45 (1987) 459–464.
- [27] M. Bregnhøj, M. Westberg, F. Jensen, P.R. Ogilby, Solvent-dependent singlet oxygen lifetimes: temperature effects implicate tunneling and charge-transfer interactions, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18 (2016) 22946–22961.
- [28] H. Abe, K. Ikebuchi, S.J. Wagner, M. Kuwabara, N. Kamo, S. Sekiguchi, Potential involvement of both type I and type II mechanisms in M13 virus inactivation by methylene blue photosensitization, *Photochem. Photobiol.* 66 (1997) 204–208.
- [29] S. Hatz, J.D.C. Lambert, P.R. Ogilby, Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability, *Photochem. Photobiol. Sci.* 6 (2007) 1106–1116.
- [30] R.M. Hoffmann, S. Mele, A. Cheung, D. Larcombe-Young, G. Bucaite, E. Sachouli, I. Zlatareva, H.O.J. Morad, R. Marlow, J.M. McDonnell, M. Figini, K.E. Lacy, A.J. N. Tutt, J.F. Spicer, D.E. Thurston, S.N. Karagiannis, S. Crescioli, Rapid conjugation of antibodies to toxins to select candidates for the development of anticancer Antibody-Drug Conjugates (ADCs), *Sci. Rep.* 10 (2020) 8869.

- [31] G. Von Minckwitz, W.D. Schmitt, S. Loibl, B.M. Müller, J.U. Blohmer, B.V. Sinn, H. Eidtmann, W. Eiermann, B. Gerber, H. Tesch, J. Hilfrich, J. Huober, T. Fehm, J. Barinoff, T. Rüdiger, E. Erbstoesser, P.A. Fasching, T. Karn, V. Müller, C. Jackisch, C. Denkert, Ki67 measured after neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer, *Clin. Cancer Res.* 19 (2013) 4521–4531.
- [32] L. Pons, L. Hernández, A. Urbizu, P. Osorio, P. Rodríguez-Martínez, E. Castella, A. Muñoz, C. Sanz, L. Arnaldo, E. Felip, V. Quiroga, G. Tapia, M. Margelí, P. L. Fernandez, Pre- and post-neoadjuvant clinicopathological parameters can help in the prognosis and the prediction of response in HER2+ and triple negative breast cancer, *Cancers* 15 (2023) 3068.
- [33] S. Takao, H. Fukushima, A.P. King, T. Kato, A. Furusawa, S. Okuyama, M. Kano, P. L. Choyke, F.E. Escorcía, H. Kobayashi, Near-infrared photoimmunotherapy in the models of hepatocellular carcinomas using cetuximab-IR700, *Cancer Sci.* 114 (2023) 4654–4663.
- [34] D. Fujimura, F. Inagaki, R. Okada, A. Rosenberg, A. Furusawa, P.L. Choyke, H. Kobayashi, Conjugation ratio, light dose, and pH affect the stability of panitumumab-ir700 for near-infrared photoimmunotherapy, *ACS Med. Chem. Lett.* 11 (2020) 1598–1604.
- [35] M. Mitsunaga, T. Nakajima, K. Sano, P.L. Choyke, H. Kobayashi, Near-infrared theranostic photoimmunotherapy (PIT): repeated exposure of light enhances the effect of immunoconjugate, *Bioconjug. Chem.* 23 (2012) 604–609.
- [36] T. Nagaya, Y. Nakamura, S. Okuyama, F. Ogata, Y. Maruoka, P.L. Choyke, C. Allen, H. Kobayashi, Syngeneic mouse models of oral cancer are effectively targeted by anti-cd44-based NIR-PIT, *Mol. Cancer Res.* 15 (2017) 1667–1677.
- [37] T. Nagaya, Y. Nakamura, K. Sato, T. Harada, P.L. Choyke, J.W. Hodge, J. Schlom, H. Kobayashi, Near infrared photoimmunotherapy with avelumab, an anti-programmed death-ligand 1 (PD-L1) antibody, *Oncotarget* 8 (2017) 8807–8817.
- [38] T. Nagaya, Y. Nakamura, K. Sato, T. Harada, P.L. Choyke, H. Kobayashi, Near infrared photoimmunotherapy of B-cell lymphoma, *Mol. Oncol.* 10 (2016) 1404–1414.
- [39] T. Nagaya, Y. Nakamura, S. Okuyama, F. Ogata, Y. Maruoka, P.L. Choyke, H. Kobayashi, Near-infrared photoimmunotherapy targeting prostate cancer with Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) antibody, *Mol. Cancer Res.* 15 (2017) 1153–1162.
- [40] A.A. Maawy, Y. Hiroshima, Y. Zhang, R. Heim, L. Makings, M. Garcia-Guzman, G. A. Luiken, H. Kobayashi, R.M. Hoffman, M. Bouvet, Near infra-red photoimmunotherapy with anti-CEA-IR700 results in extensive tumor lysis and a significant decrease in tumor burden in orthotopic mouse models of pancreatic cancer, *PLoS One* 10 (2015) e0121989.
- [41] T. Nagaya, Y. Nakamura, K. Sato, Y.-F. Zhang, M. Ni, P.L. Choyke, M. Ho, H. Kobayashi, Near infrared photoimmunotherapy with an anti-mesothelin antibody, *Oncotarget* 7 (2016) 23361–23369.
- [42] T. Nishimura, M. Mitsunaga, R. Sawada, M. Saruta, H. Kobayashi, N. Matsumoto, T. Kanke, H. Yanai, K. Nakamura, Photoimmunotherapy targeting biliary-pancreatic cancer with humanized anti-TROP2 antibody, *Cancer Med.* 8 (2019) 7781–7792.
- [43] K. Sato, N. Sato, B. Xu, Y. Nakamura, T. Nagaya, P.L. Choyke, Y. Hasegawa, H. Kobayashi, Spatially selective depletion of tumor-associated regulatory T cells with near-infrared photoimmunotherapy, *Sci. Transl. Med.* 8 (2016), 352ra110.
- [44] H. Jing, C. Weidensteiner, W. Reichardt, S. Gaedicke, X. Zhu, A.L. Grosu, H. Kobayashi, G. Niedermann, Imaging and selective elimination of glioblastoma stem cells with theranostic Near-Infrared-Labeled CD133-Specific antibodies, *Theranostics* 6 (2016) 862–874.
- [45] C. Zhang, L. Gao, Y. Cai, H. Liu, D. Gao, J. Lai, B. Jia, F. Wang, Z. Liu, Inhibition of tumor growth and metastasis by photoimmunotherapy targeting tumor-associated macrophage in a sorafenib-resistant tumor model, *Biomaterials* 84 (2016) 1–12.
- [46] J. Mączynska, C. Da Pieve, T.A. Burley, F. Raes, A. Shah, J. Sazcko, K.J. Harrington, G. Kramer-Marek, Immunomodulatory activity of IR700-labelled affibody targeting HER2, *Cell Death Dis.* 11 (2020) 886.
- [47] Q. Shi, Z. Tao, H. Yang, Q. Fan, D. Wei, L. Wan, X. Lu, PDGFR $\beta$ -specific affibody-directed delivery of a photosensitizer, IR700, is efficient for vascular-targeted photodynamic therapy of colorectal cancer, *Drug Deliv.* 24 (2017) 1818–1830.
- [48] H. Yamaguchi, N. Pantarat, T. Suzuki, A. Evdokiou, Near-infrared photoimmunotherapy using a small protein mimetic for HER2-overexpressing breast cancer, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 5835.
- [49] K. Ito, M. Mitsunaga, S. Arihiro, M. Saruta, M. Matsuoka, H. Kobayashi, H. Tajiri, Molecular targeted photoimmunotherapy for HER2-positive human gastric cancer in combination with chemotherapy results in improved treatment outcomes through different cytotoxic mechanisms, *BMC Cancer* 16 (2016) 1–10.
- [50] K. Ito, M. Mitsunaga, T. Nishimura, M. Saruta, T. Iwamoto, H. Kobayashi, H. Tajiri, Near-infrared photochemoimmunotherapy by photoactivatable bifunctional antibody-drug conjugates targeting human epidermal growth factor receptor 2 positive cancer, *Bioconjug. Chem.* 28 (2017) 1458–1469.
- [51] M. Ishida, S. Kagawa, K. Shimoyama, K. Takehara, K. Noma, S. Tanabe, Y. Shirakawa, H. Tazawa, H. Kobayashi, T. Fujiwara, Trastuzumab-based photoimmunotherapy integrated with viral HER2 transduction inhibits peritoneally disseminated HER2-negative cancer, *Mol. Cancer Therapeut.* 15 (2016) 402–411.
- [52] T. Nagaya, S. Okuyama, F. Ogata, Y. Maruoka, P.L. Choyke, H. Kobayashi, Near infrared photoimmunotherapy using a fiber optic diffuser for treating peritoneal gastric cancer dissemination, *Gastric Cancer* 22 (2019) 463–472.
- [53] M. Ogawa, T. Yamauchi, H. Iwai, Y. Magata, P.L. Choyke, H. Kobayashi, Investigation of dynamic morphological changes of cancer cells during photoimmunotherapy (PIT) by low-coherence quantitative phase microscopy, in: *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XXIII*, SPIE, 2014 893113.
- [54] K. Ito, M. Mitsunaga, T. Nishimura, H. Kobayashi, H. Tajiri, Combination photoimmunotherapy with monoclonal antibodies recognizing different epitopes of human epidermal growth factor receptor 2: an assessment of phototherapeutic effect based on fluorescence molecular imaging, *Oncotarget* 7 (2016) 14143–14152.
- [55] S. Yamashita, M. Kojima, N. Onda, T. Yoshida, M. Shibutani, Trastuzumab-based near-infrared photoimmunotherapy in xenograft mouse of breast cancer, *Cancer Med.* 12 (2023) 4579–4589.
- [56] M.M. Deken, M.M. Kijanka, I. Beltrán Hernández, M.D. Slooter, H.S. de Bruijn, P. J. van Diest, P.M.P. van Bergen en Henegouwen, C.W.G.M. Lowik, D.J. Robinson, A.L. Vahrmeijer, S. Oliveira, Nanobody-targeted photodynamic therapy induces significant tumor regression of trastuzumab-resistant HER2-positive breast cancer, after a single treatment session, *J. Contr. Release* 323 (2020) 269–281.
- [57] C. Vernieri, M. Milano, M. Brambilla, A. Mennitto, C. Maggi, M.S. Cona, M. Prisciandaro, C. Fabbri, L. Celio, G. Mariani, G.V. Bianchi, G. Capri, F. de Braud, Resistance mechanisms to anti-HER2 therapies in HER2-positive breast cancer: current knowledge, new research directions and therapeutic perspectives, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 139 (2019) 53–66.
- [58] B. O'Sullivan, J. Brierley, D. Byrd, F. Bosman, S. Kehoe, C. Kossary, M. Piñeros, E. Van Eycken, H.K. Weir, M. Gospodarowicz, The TNM classification of malignant tumours—towards common understanding and reasonable expectations, *Lancet Oncol.* 18 (2017) 849–851.
- [59] L.S. Moore, E. de Boer, J.M. Warram, M.D. Tucker, W.R. Carroll, M.L. Korb, M. S. Brandwein-Gensler, G.M. van Dam, E.L. Rosenthal, Photoimmunotherapy of residual disease after incomplete surgical resection in head and neck cancer models, *Cancer Med.* 5 (2016) 1526–1534.
- [60] P. Agostinis, K. Berg, K.A. Cengel, T.H. Foster, A.W. Girotti, S.O. Gollnick, S. M. Hahn, M.R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B.C. Wilson, J. Golab, Photodynamic therapy of cancer: an update, *CA Cancer J. Clin.* 61 (2011) 250–281.
- [61] R. Raikar, L.S. Krane, Q.Q. Li, T. Sanford, M.R. Siddiqui, D. Haines, S. Vourganti, S.J. Brancato, P.L. Choyke, H. Kobayashi, P.K. Agarwal, Epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted photoimmunotherapy (PIT) for the treatment of EGFR-expressing bladder cancer, *Mol. Cancer Therapeut.* 16 (2017) 2201–2214.
- [62] E. Hipper, M. Blech, D. Hinderberger, P. Garidel, W. Kaiser, Photo-oxidation of therapeutic protein formulations: from radical formation to analytical techniques, *Pharmaceutics* 14 (2022) 72.
- [63] J.W. Buecheler, M. Winzer, C. Weber, H. Gieseler, Oxidation-induced destabilization of model antibody-drug conjugates, *J. Pharmaceut. Sci.* 108 (2019) 1236–1245.

## **11.6. PROTOCOLO A PRIORI REGISTRADO EN LA BASE DE DATOS PROSPERO**

La presente revisión sistemática fue registrada en PROSPERO (ID: CRD42023409056) antes del inicio del proceso de selección y extracción de datos. Tras la realización del estudio, se han identificado algunas modificaciones menores respecto al protocolo original. No obstante, se ha optado por posponer la actualización del registro hasta la aceptación o publicación definitiva de los resultados, momento en el que se procederá a su actualización formal conforme a los requisitos establecidos por el registro.

## Photoimmunotherapy in General Surgery

*Ana Piqueras, Mireia Jordà Redondo, Lidia Blay Aulina, Celia Martínez Álvarez, Joan Francesc Julian Ibañez, Santiago Nonell Marrugat*

### Citation

Ana Piqueras, Mireia Jordà Redondo, Lidia Blay Aulina, Celia Martínez Álvarez, Joan Francesc Julian Ibañez, Santiago Nonell Marrugat. Photoimmunotherapy in General Surgery. PROSPERO 2024 Available from <https://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO/view/CRD42024523715>

## REVIEW TITLE AND BASIC DETAILS

### Review title

Photoimmunotherapy in General Surgery

### Review objectives

What is the effect of photoimmunotherapy and surgery in animals and humans in neoplasms in the field of General Surgery?

### Context and rationale

Photoimmunotherapy is a therapeutic strategy widely studied both in vitro and in vivo but with certain limitations for its use in humans, which means that despite having been developed for the first time more than a decade ago, its use has been limited to skin neoplasms that allow topical application of drugs.

One of the potential fields where its routine use could be expected is General Surgery, given that it has diagnostic and therapeutic properties that, together, can be a powerful tool in the treatment of neoplasms of different etiologies. The wide variety of antibodies experimentally tested in photoimmunotherapy has already been the subject of some reviews, and it is not the objective of this article. This systematic review aims to study which neoplasms within the field of General Surgery have been successfully treated experimentally to analyze possible limitations in the daily use of these therapies and establish the groundwork for future studies. We aim to shorten the steps that remain to be taken until reaching the routine application of photoimmunotherapy in the field of surgery.

### Keywords

cancer, photoimmunotherapy, surgery, Systematic review

## SEARCHING AND SCREENING

---

### Searches

We will search the following electronic bibliographic databases: PubMed (MEDLINE), Embase, Web of Science, Cochrane Library, ClinicalTrials.gov

The full search strategy (see pdf) is based on the search components "photoimmunotherapy", "surgery" and "cancer". Only spanish and english publications will be eligible.

We will screen the reference lists of included studies for additional eligible studies not retrieved by our search.

### Study design

#### *Included*

There will be no restrictions on the types of study design eligible for inclusion, since there are not many publications available for this topic. Results will be carefully analyzed

#### *Excluded*

None

## ELIGIBILITY CRITERIA

---

### Human disease modelled

Neoplasms in the field of General Surgery

### Animals/Population

#### *Included*

All animal models with experimental cancer (all species, all sexes, all tumor models) in the field of General Surgery

#### *Excluded*

In vitro and in silico models

### Intervention(s) or exposure(s)

#### *Included*

Exposure to Photoimmunotherapy with Near Infrared Light after the administration of any photosensitive agent+antibody drug complex, alone or in combination with surgery

#### *Excluded*

Exposure to Photoimmunotherapy without the previous administration of the inclusion criteria drug complexes

### Comparator(s) or control(s)

#### *Included*

Animals undergoing no treatment at all, Animals receiving the drug complex without near infrared light exposure, Vehicle-treated animals, Sham-treated animals

#### *Excluded*

All other control conditions

### Other selection criteria or limitations applied

## 11. ANEXOS

21/4/25, 12:29

PROSPERO

**Inclusion criteria:** Spanish and English articles, original experimental animal or human studies  
**Exclusion criteria:** publication language other than Spanish or English, publications other than original experimental studies (reviews, conference abstracts, case reports, etc)

### OUTCOMES TO BE ANALYSED

---

#### **Outcome measure(s)**

##### *Included*

Tumor growth, Tumor shrinkage, Tumor length, Tumor weight, Tumor Volume, Local or distal Recurrence, Metastasis, Local histological changes, Tumor microenvironment changes, Immunological changes, Fluorescence

##### *Excluded*

None of the above

### DATA COLLECTION PROCESS

---

#### **Study selection and data extraction**

##### *Procedure for study selection*

Screening will be performed in two phases, namely initial screening based on title and abstract, followed by a full-text screening of the eligible articles for final inclusion. In each phase, 2 observers will independently assess each article. Discrepancies will be resolved through discussion, or by consulting a third investigator.

##### *Prioritise the exclusion criteria*

- Title-abstract screening:
1. Not an original full research paper (e. g. review, editorial)
  2. Experimental cancer outside the field of General Surgery
  3. Not an in vivo animal study
  4. No NIR-PIT alone or in combination with surgery used
  5. Not in English nor Spanish studies

##### Full text-screening:

As above, with the addition of:

6. No control group
7. No tumoral effect stated

##### *Methods for data extraction*

A standardised, pre-piloted form will be used to extract data from the included studies for assessment of study quality and evidence synthesis. Extracted information will include: study setting; study population and baseline characteristics (neoplasm type); details of the intervention and control conditions; study methodology; outcomes; information for assessment the risk of bias.

Two reviewers will independently extract data from tables, text or figures. In case an outcome is measured at multiple time points, data from the time point where efficacy is highest will be included.

##### *Data to be extracted: study design*

Experimental group(s), control group(s), number of animals per group.

## 11. ANEXOS

21/4/25, 12:29

PROSPERO

*Data to be extracted: animal model*

Species and sex of the animals, type of tumor (e. g. cellular injection, xenograft)

*Data to be extracted: intervention of interest*

Dose, timing of administration, frequency of administration, route of administration

*Data to be extracted: primary outcome(s)*

All the information will be extracted and collected in a comparative table showing all items in the different selected articles. The table will show the following data:- Tumor growth (continuous): diameter measurement (cm, mm, or any other length unit in the metric decimal system), difference between tumoral diameters in different time-points or between individuals (cm, mm or any other decimal metric unit). Percentual changes will also be accepted as a measurement.

- Tumoral volume (continuous): measured in cm<sup>3</sup>, mm<sup>3</sup> or any other decimal metric unit.
- Tumor weight (continuous): measured in g, mg or any other weight unit in the metric decimal system
- Local or distal recurrence (dichotomous): yes/no
- Metastasis (dichotomous): yes/no
- Therapy effectiveness (dichotomous): yes/no

All continuous variables will be extracted in decimal metric system units. If the reviewed article does not express its measurements in such system, data will be transformed in order to homogenize the comparisons between articles.

*Data to be extracted: secondary outcome(s)*

- Tumoral fluorescence tested (dichotomous): yes/no
- Tumoral fluorescence effective (dichotomous): yes/no
- Tumoral histological changes evaluated (dichotomous): yes/no
- Tumoral microenvironment evaluated (dichotomous): yes/no

*Data to be extracted: other*

Author, year, language and country

**Risk of bias and/or quality assessment**

By use of SYRCLE's risk of bias tool

By use of the CAMARADES checklist for study quality

*Method for risk of bias and/or quality assessment*

SYRCLE's risk of bias tool and CAMARADES checklist for study quality, performed by two reviewers

### PLANNED DATA SYNTHESIS

---

**Strategy for data synthesis**

*Planned approach*

We will provide a narrative synthesis of the findings from the included studies, structured around the type of intervention, tumor characteristics, type of outcome and intervention content. We will provide summaries of intervention effects for each study by calculating risk ratios (for dichotomous outcomes) or standardised mean differences (for continuous outcomes). We anticipate there will be limited scope for meta-analysis because of the range of different outcomes measured across the small number of existing trials.

## 11. ANEXOS

21/4/25, 12:29

PROSPERO

### *Effect measure*

Meta-analysis not planned

### *Effect models*

Meta-analysis not planned

### *Heterogeneity*

Meta-analysis not planned

### *Other*

Meta-analysis not planned

## **Analysis of subgroups or subsets**

### *Subgroup analyses*

None planed

### *Sensitivity*

Meta-analysis not planned

### *Publication bias*

Meta-analysis not planned

## REVIEW AFFILIATION, FUNDING AND PEER REVIEW

---

### **Review team members**

- Miss Ana Piqueras, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona
- Miss Mireia Jordà Redondo, Institut Químic de Sarrià, Universitat Ramon Llull
- Dr Lidia Blay Aulina, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona
- Miss Celia Martínez Álvez, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol
- Professor Joan Francesc Julian Ibañez, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona
- Professor Santiago Nonell Marrugat, Institut Químic de Sarrià, Universitat Ramon Llull

### **Review affiliation**

Hospital Universitari Germans Trias i Pujol

Institut Germans Trias i Pujol

Universitat Autònoma de Barcelona

### **Funding source**

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors

## TIMELINE OF THE REVIEW

---

### **Review timeline**

Start date: 29 April 2024. End date: 31 December 2024

## 11. ANEXOS

21/4/25, 12:29

PROSPERO

### Date of first submission to PROSPERO

28 April 2024

### Date of registration in PROSPERO

28 May 2024

## CURRENT REVIEW STAGE

---

### Publication of review results

The intention is to publish the review once completed. The review will be published in English, Spanish

### Stage of the review at this submission

Review stage	Started	Completed
Pilot work	✓	
Formal searching/study identification	✓	✓
Screening search results against inclusion criteria		
Data extraction or receipt of IP		
Risk of bias/quality assessment		
Data synthesis		

### Review status

The review is currently planned or ongoing.

## ADDITIONAL INFORMATION

---

### Review type

Pre-clinical animal intervention review

### Additional information

This review is being undertaken as a fundamental part of a PhD Project.

### PROSPERO version history

- Version 1.0 published on 28 May 2024

### Review conflict of interest

None known

### Country

Spain

### Medical Subject Headings

Animals; Humans; Immunotherapy; Phototherapy; Skin Neoplasms

### Disclaimer

The content of this record displays the information provided by the review team. PROSPERO does not peer review registration records or endorse their content.

<https://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO/view/CRD42024523715>

6/7

## 11. ANEXOS

21/4/25, 12:29

PROSPERO

PROSPERO accepts and posts the information provided in good faith; responsibility for record content rests with the review team. The owner of this record has affirmed that the information provided is truthful and that they understand that deliberate provision of inaccurate information may be construed as scientific misconduct.

PROSPERO does not accept any liability for the content provided in this record or for its use. Readers use the information provided in this record at their own risk.

Any enquiries about the record should be referred to the named review contact

## 11.7. DIFUSIÓN NO ACADÉMICA: COBERTURA MEDIÁTICA DE LA INVESTIGACIÓN

Titular y enlace	Medio y QR
<p>Investigan el uso de la terapia fotodinámica para tratar el cáncer de mama  <a href="https://www.lavanguardia.com/vida/20250203/10346241/investigan-terapia-fotodinamica-tratar-cancer-mama-agenciaslv20250203.html">https://www.lavanguardia.com/vida/20250203/10346241/investigan-terapia-fotodinamica-tratar-cancer-mama-agenciaslv20250203.html</a></p>	<p>La Vanguardia</p> 
<p>Un estudio aplica fotoimmunoterapia para tratar un tipo de cáncer de mama  <a href="https://www.infosalus.com/salud-investigacion/noticia-estudio-aplica-fotoimmunoterapia-tratar-tipo-cancer-mama-20250203110019.html">https://www.infosalus.com/salud-investigacion/noticia-estudio-aplica-fotoimmunoterapia-tratar-tipo-cancer-mama-20250203110019.html</a></p>	<p>Infosalus</p> 
<p>La fotoimmunoterapia se abre paso como nueva vía para tratar el cáncer de mama HER2+  <a href="https://gacetamedica.com/investigacion/foto-immunoterapia-tratar-cancer-mama-her2/">https://gacetamedica.com/investigacion/foto-immunoterapia-tratar-cancer-mama-her2/</a></p>	<p>Gaceta Médica</p> 
<p>Un estudio aplica fotoimmunoterapia para tratar un tipo de cáncer de mama  <a href="https://www.catalunyapress.es/articulo/saladeespe-2025-02-03/5165946-estudio-aplica-fotoimmunoterapia-tratar-tipo-cancer-mama">https://www.catalunyapress.es/articulo/saladeespe-2025-02-03/5165946-estudio-aplica-fotoimmunoterapia-tratar-tipo-cancer-mama</a></p>	<p>Catalunya Press</p> 
<p>L'IQS i l'Hospital Trias i Pujol proven una nova fototeràpia per tractar un càncer de mama agressiu  <a href="https://beteve.cat/societat/proven-nova-fototerapia-tractar-cancer-mama-agressiu/">https://beteve.cat/societat/proven-nova-fototerapia-tractar-cancer-mama-agressiu/</a></p>	<p>Betevé</p> 
<p>L'Hospital Germans Trias i Pujol i l'Institut Químic de Sarrià obren la porta de la fotoimmunoteràpia com a nova via per tractar un tipus agressiu de càncer de mama  <a href="https://www.eltotbadalona.cat/lhospital-germans-trias-i-pujol-i-linstitut-quimic-de-sarria-obren-la-porta-de-la-foto-immunoterapia-com-a-nova-via-per-tractar-un-tipus-agressiu-de-cancer-de-mama/">https://www.eltotbadalona.cat/lhospital-germans-trias-i-pujol-i-linstitut-quimic-de-sarria-obren-la-porta-de-la-foto-immunoterapia-com-a-nova-via-per-tractar-un-tipus-agressiu-de-cancer-de-mama/</a></p>	<p>Tot Badalona</p> 
<p>Nova combinació terapèutica per tractar un tipus agressiu de càncer de mama en una sola intervenció  <a href="https://www.bdncom.cat/notice/nova-combinacio-terapeutica-permetria-eliminar-un-tipus-agressiu-de-cancer-de-mama-en-una-sola-intervencio">https://www.bdncom.cat/notice/nova-combinacio-terapeutica-permetria-eliminar-un-tipus-agressiu-de-cancer-de-mama-en-una-sola-intervencio</a></p>	<p>Badalona Comunicació</p> 
<p>Un fàrmac activat amb llum, contra el càncer de mama  <a href="https://www.3cat.cat/3cat/un-farmac-activat-amb-llum-contra-el-cancer-de-mama/noticia/3342717/">https://www.3cat.cat/3cat/un-farmac-activat-amb-llum-contra-el-cancer-de-mama/noticia/3342717/</a></p>	<p>3Cat</p> 

