

# EL LÁSER Y LA HEMATOPORFIRINA EN EL DIAGNÓSTICO DEL CARCINOMA BRONCOGÉNICO

J.P. Díaz Jiménez

Servicio de Neumología. Hospital Príncipes de España. Ciudad Sanitaria de Bellvitge. Hospitalet de Llobregat. Barcelona

## Introducción

Desde principios de siglo existe la inquietud manifiesta de detectar por medios físicos o químicos las células malignas incipientes en nuestro organismo. Buena muestra de ello son los innumerables trabajos de investigación efectuados con marcadores celulares utilizando derivados de las tetraciclinas, varios componentes de las porfirinas, acridina naranja, azul de toluidina, isótopos radioactivos etc, con la finalidad de identificar aquellas células malignas no detectables por métodos convencionales<sup>1-5</sup>.

En los Estados Unidos se diagnosticaron 75.000 nuevos casos de cáncer de pulmón en 1975. En la década de los 80 esta cantidad se ha duplicado, confirmando al cáncer de pulmón como la primera causa de muerte por cáncer en el hombre. El constante aumento de mujeres fumadoras, incrementa progresivamente la incidencia de esta enfermedad en el sexo femenino.

Por otra parte, todos los especialistas saben que en la mayoría de los casos, cuando los síntomas aparecen, es signo de que la enfermedad se encuentra en estado avanzado de su evolución. Sin embargo, los cánceres detectados por citología de esputo cuando la radiología de tórax no muestra lesiones sospechosas, son los de mejor pronóstico.

La detección del carcinoma pulmonar, cuando aún está localizado o confinado en el bronquio y con radiología de tórax negativa supone, tras tratamiento quirúrgico, tasas de curaciones entre el 90 y el 100 %<sup>6-8</sup>.

Con estos datos, parece razonable pensar que la supervivencia del cáncer de pulmón depende más de la extensión de la enfermedad en el momento del diagnóstico que del tipo histológico del mismo<sup>9</sup>.

Todos los nuevos casos diagnosticados por aparición de síntomas clínicos o radiológicos, forzosamente han pasado por una fase precoz o preinvasiva de

alrededor de unos 5 años, durante los cuales las células malignas son exfoliadas al esputo. En esta fase de carcinoma oculto, los pacientes, por lo general, están asintomáticos y con radiología de tórax negativa.

Es lógico suponer pues, que durante este período se podría detectar la enfermedad por citología de esputo en individuos de alto riesgo. Para ello, en los EE.UU. en los años setenta, se iniciaron protocolos de diagnóstico y tratamiento precoz en fumadores de más de un paquete de tabaco al día durante un año o más y por encima de los 45 años de edad. Tres grandes centros estaban implicados en el programa: la Clínica Mayo, el John Hopkins University y el Memorial Sloan Kettering Cancer Center<sup>10-12</sup>. Después de 10 años de estudio se pudieron sacar algunas conclusiones: con la citología de esputo y la radiología de tórax se detectó cáncer entre el 0,5 y el 1 % de los 30.000 encuestados; la mayoría de los enfermos diagnosticados por radiología, tenían carcinoma de células grandes o bien adenocarcinoma, mientras que los diagnosticados por citología fueron casi todos escamosos. La mitad de los cánceres detectados fueron localizados en el estadio I de la enfermedad. Otros hallazgos llamativos fueron la multicentricidad en el carcinoma oculto: 7 % en la Clínica Mayo y 15 % en el Memorial Sloan Kettering, y la frecuencia con que se desarrolló en estos enfermos un segundo cáncer de pulmón primitivo, definido éste como un nuevo cáncer de distinto tipo celular o del mismo tipo celular desarrollado o bien fuera del área señalada como de recidiva local, o bien en el parénquima pulmonar como lesión única y sin evidencia de cáncer extratorácico. Esta frecuencia ha sido de un 24 o de un 32 % según los autores<sup>7, 13-15</sup>.

La localización de estos cánceres requiere forzosamente inspección broncoscópica. Aproximadamente sólo el 50 % de ellos serán diagnosticados en la primera broncoscopia. Alguno de estos pacientes tendrá simultáneamente más de un cáncer primario, de los cuales alguno o todos podrían ser endoscópicamente

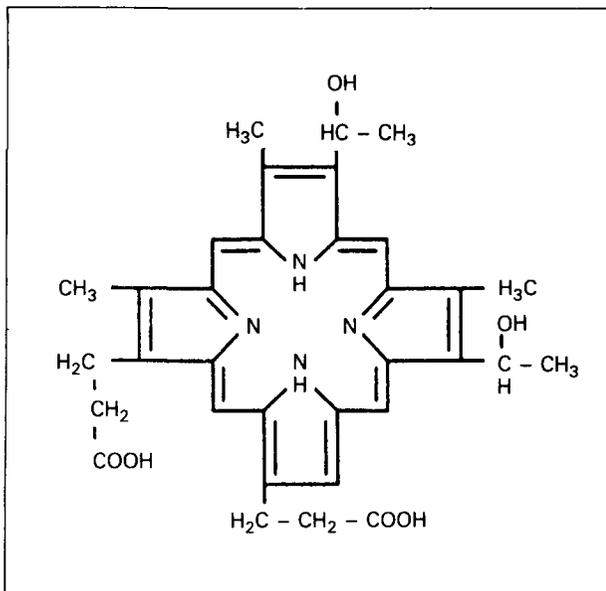


Fig 1. Hematoporfirina.

invisibles. El diagnóstico endoscópico podría finalmente necesitar unas cinco exploraciones durante un período de aproximadamente 16 meses para la localización definitiva de estos tumores<sup>16</sup>. Es decir, existe un proceso evolutivo tumoral desde un estadio definido como *in situ*, en donde el cáncer no ha penetrado la membrana basal y todavía no es metastásico, a fases progresivas más agresivas. Esta progresión no puede ser determinada en términos de tiempos concretos para cada fase, pero es generalmente aceptado que la etapa de carcinoma *in situ* tiende a ser indolente y de muy lento crecimiento<sup>14, 15, 17</sup>.

En esta fase, ni los síntomas clínicos como la tos, hemoptisis, dolor torácico, ni los signos radiológicos como densidades mal delimitadas, atelectasias, hiperclaridades, neumonitis obstructivas, etc, pueden ser considerados como específicos del carcinoma pulmonar. Sin embargo, la presencia de células malignas en el esputo serán consideradas como diagnóstico de seguridad de la enfermedad.

Como hemos señalado más arriba, el carcinoma oculto podrá ser diagnosticado en una primera broncoscopia sólo en un bajo porcentaje de casos. Este problema ha frustrado a los neumólogos hasta el punto de dudar de la eficacia de los estudios protocolarios de detección por citología de esputo. Dicho de otra manera, el diagnóstico por métodos endoscópicos o radiológicos no es difícil, o sólo es fácil, cuando el carcinoma es visible endoscópicamente.

El problema se plantea cuando encontramos citología de esputo positiva con radiología y broncoscopia negativas. En este caso, el método endoscópico sufre unas variantes con relación a la broncoscopia simple. La finalidad será la búsqueda del lugar desde donde proceden las células malignas encontradas en el esputo. El método más utilizado hasta ahora consiste en la

práctica de exploraciones endoscópicas exhaustivas bajo anestesia general con lavados, cepillados repetidos, broncoaspirados y biopsias de espulones en todos y cada uno de los segmentos de ambos árboles bronquiales<sup>18</sup>. Incluso en manos experimentadas, no más de un 50 % de los carcinomas ocultos serán diagnosticados por este método.

En los últimos años un nuevo procedimiento diagnóstico, utilizando la luz y un marcador fotosensible, la hematoporfirina o sus derivados, viene a darnos nuevas esperanzas en la detección precoz de esta enfermedad.

### Hematoporfirina y láser

La hematoporfirina, derivado de las porfirinas, pigmento tetrapirrólico cuya base es la porfina, presenta un peso molecular de 598,7 y su fórmula,  $C_{34}H_{38}O_6N_4$  aparece en la figura 1. Su obtención se realiza a partir de la sangre completa en dos pasos consecutivos. En un primer paso se obtiene la hemina por tratamiento de la sangre con ácido sulfúrico y alcohol. En un segundo paso se extrae el hierro consiguiéndose la hematoporfirina cristalizada bastante impura por la gran variabilidad en la composición de sus *batches*. En 1960, Lipson et al obtienen el derivado de la hematoporfirina o Mayo Clínic HpD, por tratamiento de la hematoporfirina con ácido sulfúrico concentrado y glacial acético, seguido de varios pasos de recristalización<sup>19, 20</sup> observando que cuando la HpD era activada por la luz violeta entre 400 y 407 nanómetros dentro del espectro electromagnético, producía fluorescencia en los tumores<sup>21-22</sup>.

Posteriormente se observó que cuando la hematoporfirina era acetilada se producía monoacetato en un 20-30 %, diacetato en un 50-60 % y hematoporfirina sin cambios de un 5 a un 20 % con la formación de hidroxietil-vinil-deuteroporfirina<sup>23</sup>. Ninguno de los componentes de esta mezcla de acetatos son capaces de producir sensibilización, sin embargo en los pasos siguientes, cuando se disuelven en hidróxido sódico, los grupos acetatos son rápidamente hidrolizados, formando una mezcla de porfirinas muy activas en la localización y sensibilización de los tumores.

Dougherty en 1983<sup>24</sup> identifica un nuevo componente en el HpD, el bi-1-3-hidroxietil-deuteroporfirina 8 y el 1-etil-eter o dihematoporfirina-eter (DHE) Fotofrin<sup>R</sup>, responsable de la capacidad de fotosensibilizar los tumores.

La distribución de la hematoporfirina en el organismo tras su inyección endovenosa es desigual, observándose que al cabo de 48 horas existen altos niveles detectados por radioisótopos en tejido tumoral, hígado, riñones y bazo<sup>25</sup>. Por otra parte, utilizando métodos autorradiográficos se puede detectar la distribución de la hematoporfirina en el organismo en función del tiempo<sup>26</sup>. Inicialmente existe una vasta distribución por todos los tejidos seguida de un rápido aclaramiento, sin embargo al cabo de siete días la hematoporfirina todavía puede observarse fuertemente retenida en el tejido tumoral. El por qué la hematoporfiri-



na queda retenida en el tejido tumoral no se conoce con exactitud y según Dougherty el mecanismo podría estar relacionado con una fagocitosis de la hematoporfirina por las células tumorales<sup>27</sup>.

Los primeros trabajos de detección de fluorescencia por el tejido tumoral impregnado de sustancias activadas por la luz, como es el caso de las hematoporfirinas, datan de principios de siglo<sup>3, 28, 29</sup>. Sin embargo, fue a partir de los años cuarenta cuando los investigadores empezaron a pensar seriamente en su utilización para el diagnóstico precoz del cáncer. Auler y Banzer en 1942<sup>30</sup> demuestran fluorescencia tumoral selectiva en ratas tras inyección de hematoporfirinas. Figge et al, en 1948<sup>31</sup> observaron que las hematoporfirinas y las metaloporfirinas eran captadas selectivamente por los ganglios y por los tejidos embrionario, traumático y neoplásico y que la luz ultravioleta podía producir fluorescencia allá donde se encontraran dichas sustancias.

### Reacción fotodinámica

Para llegar a una mejor comprensión de los mecanismos de activación de la hematoporfirina por la luz de la detección de la fluorescencia necesaria para testificar la presencia tumoral, trataremos de explicar muy brevemente algunos conceptos físicos y fotobiológicos fundamentales.

La luz es una forma de energía propagada a muy alta velocidad, como las ondas electromagnéticas. Cuando interacciona con lentes o prismas puede comportarse como verdaderas ondas, sin embargo cuando es absorbida por las moléculas es capaz de liberar energía en forma de fotones. El color de la luz en el rango de visibilidad del espectro electromagnético es constantemente cambiante y va desde los 400 a los 705 nanómetros, desde el violeta al rojo pasando por el índigo, azul, verde, amarillo y naranja. Sin embargo, el ultravioleta y el infrarrojo, aunque parte de la luz del espectro electromagnético, no son perceptibles para el ojo humano.

Los fotones emitidos en la región ultravioleta y cerca del infrarrojo tienen suficiente energía para excitar las moléculas. Dichas moléculas excitadas pueden sufrir cambios químicos o causarlos en otras en forma de reacciones de fotosensibilización, producidas sólo cuando una de ellas absorbe un fotón.

Las hematoporfirinas presentan muchos dobles enlaces conjugados en sus moléculas con cuatro anillos pirrólicos que le dan una configuración cíclica. Debido a esta configuración, su rango de absorción se encuentra entre las regiones ultravioleta y el infrarrojo del espectro electromagnético. La figura 2 muestra el espectro de absorción de la dihidrohematoporfirina (DHE) en NaOH. Su mayor excitación la obtiene cuando es irradiada por una luz violeta a 405 nanómetros, produciendo fluorescencia en el rojo a 630-690 nanómetros<sup>20, 22, 32</sup>. El mecanismo por el cual se produce dicha fluorescencia es el siguiente: Cuando la luz incide sobre el estado basal de la hematoporfirina o sus derivados se produce absorción fotónica por

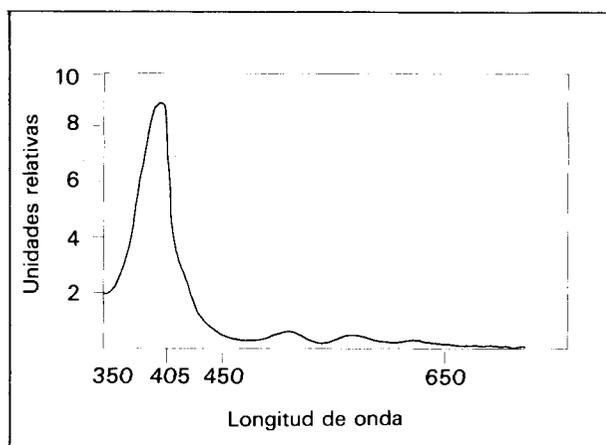


Fig 2. Absorción de HpD.

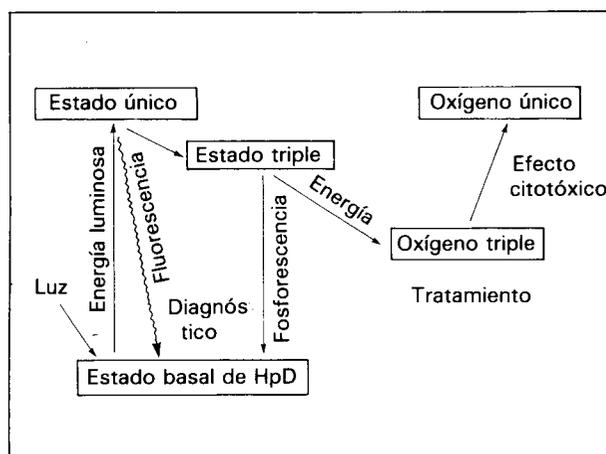


Fig 3. Mecanismo de activación de HpD.

parte de sus moléculas, lo cual provoca el paso desde el estado basal de energía al llamado estado excitado o *singlet status*. Desde este estado, la tendencia será retornar al estado inicial, que se puede producir por varios pasos (fig. 3). En primer lugar puede haber una caída espontánea al estado basal, en esta caída habrá una emisión de energía por desprendimiento de fotones que son los que producen la fluorescencia. Esta será la fase de detección utilizada para el diagnóstico tumoral por captación de dicha fluorescencia utilizando métodos que trataremos de describir más adelante.

En otro momento, desde el estado excitado, las moléculas de hematoporfirina pueden pasar a otro estado, el llamado *triplet status* desde donde, en presencia de oxígeno, existe una liberación de energía que es aprovechada para el tratamiento del cáncer<sup>33-39</sup>, gracias a las propiedades citotóxicas que presenta dicha sustancia o sus derivados a este nivel, ya expuestas en una revisión anterior<sup>40</sup>. Por otra parte, muchos trabajos de investigación intentan perfeccionar la eficacia de la combinación de la luz con la hematoporfirina en el tratamiento del cáncer<sup>41-45</sup>.



### Métodos de detección fotodinámicos

Haciendo uso de las propiedades de la hematoporfirina de acumularse y retenerse en las células malignas desprendiendo fluorescencia desde éstas cuando es estimulada con una luz emitida en longitud de onda adecuada, se idearon los primeros aparatos de detección tumoral por fluorescencia aplicables en clínica. Desgraciadamente, la fluorescencia que emite la hematoporfirina es de muy baja intensidad y no puede ser detectada con la luz blanca de los fibroscopios convencionales.

Hemos de decir sin embargo, que la fluorescencia de la hematoporfirina no es específica del carcinoma, ya que se han visto áreas de marcada fluorescencia en zonas de atipias o de metaplasia escamosa en la mucosa bronquial o en procesos fuertemente inflamatorios, aunque en más baja intensidad que en el carcinoma<sup>46</sup>, por lo que el diagnóstico definitivo se hará sólo cuando exista confirmación histológica por biopsia.

Lipson et al en la Clínica Mayo, inventaron el primer detector de tumores endobronquiales, utilizando una lámpara de mercurio como fuente emisora de luz violeta transmitible a través de un broncoscopio rígido hasta el tejido neoplásico para captar la fluorescencia desde allí desprendida por la hematoporfirina previamente inyectada. Con dicho artificio se publicaron los primeros 15 casos de tumores endobronquiales<sup>21</sup>. Más tarde, los mismos autores publicaron su experiencia añadiendo patología maligna esofágica<sup>47</sup>. Desde entonces, otros autores investigaron la fluorescencia tumoral desprendida en otros órganos: Gray en 1967<sup>46</sup> demostró fluorescencia tumoral en 18 de 23 casos de pacientes con cáncer de cuello uterino. Leonard y Beck en 1971<sup>48</sup> demostraron fluorescencia en el 100 % de 40 carcinomas epidermoides de boca, hipofaringe, laringe y tráquea.

A pesar del éxito de esta técnica, el objetivo fundamental seguía siendo la detección precoz de cánceres

no visibles por endoscopia convencional. Después de varios años de investigación, los estudios fueron perfeccionándose hasta la actualidad y ahora ya podemos disponer de algunos aparatos que demuestran fluorescencia en carcinomas en fases iniciales y que trataremos de describir a continuación.

Hemos de decir primeramente que todos ellos se basan en la detección de la hematoporfirina o de sus derivados inyectados 48 o 72 horas antes por vía endovenosa a dosis que oscilan entre los 2,0 y los 3,5 mg por kilogramo de peso corporal. Todos ellos asimismo, utilizan métodos endoscópicos para hacer llegar la luz adecuada hasta la mucosa bronquial. Todos ellos finalmente, y también por métodos endoscópicos recogen la fluorescencia en las células malignas y la transmiten hasta el aparato que, de una manera o de otra nos testificará los cambios que ocurren en la mucosa.

El instrumento ideado por Profio y Doiron en 1979<sup>49,50</sup>, recoge la fluorescencia y la hace llegar a un intensificador de imágenes en donde el cambio de coloración de la pantalla nos avisa de la presencia de hematoporfirina en la mucosa bronquial. Consiste esencialmente en un fibroscopio, un intensificador de imágenes y un láser para generar luz monocromática violeta en una longitud de onda adecuada para excitar la hematoporfirina. Dicho método utilizado en la Universidad de California ha ido sufriendo variaciones con la finalidad de mejorar la calidad de imagen.

El método original utilizaba una lámpara de mercurio de 200 W que generaba luz violeta transportada por un endoscopio especial, ya que con el convencional sólo se podía transportar luz blanca. Este método fue usado para detectar fluorescencia de tumores endobronquiales, aunque casi todos ellos ya eran visibles por endoscopia convencional.

Más tarde se utilizó un láser de kriptón (fig. 4a), en lugar de la lámpara de mercurio, con la finalidad de

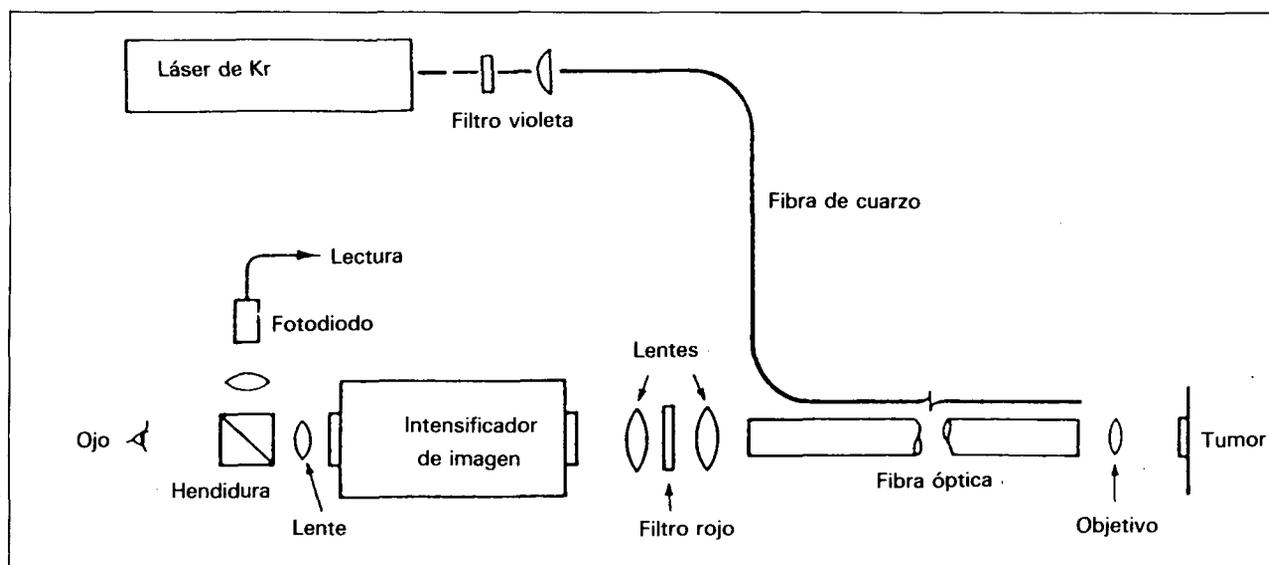


Fig 4a. Sistema de detección de fluorescencia (Profio 1979).

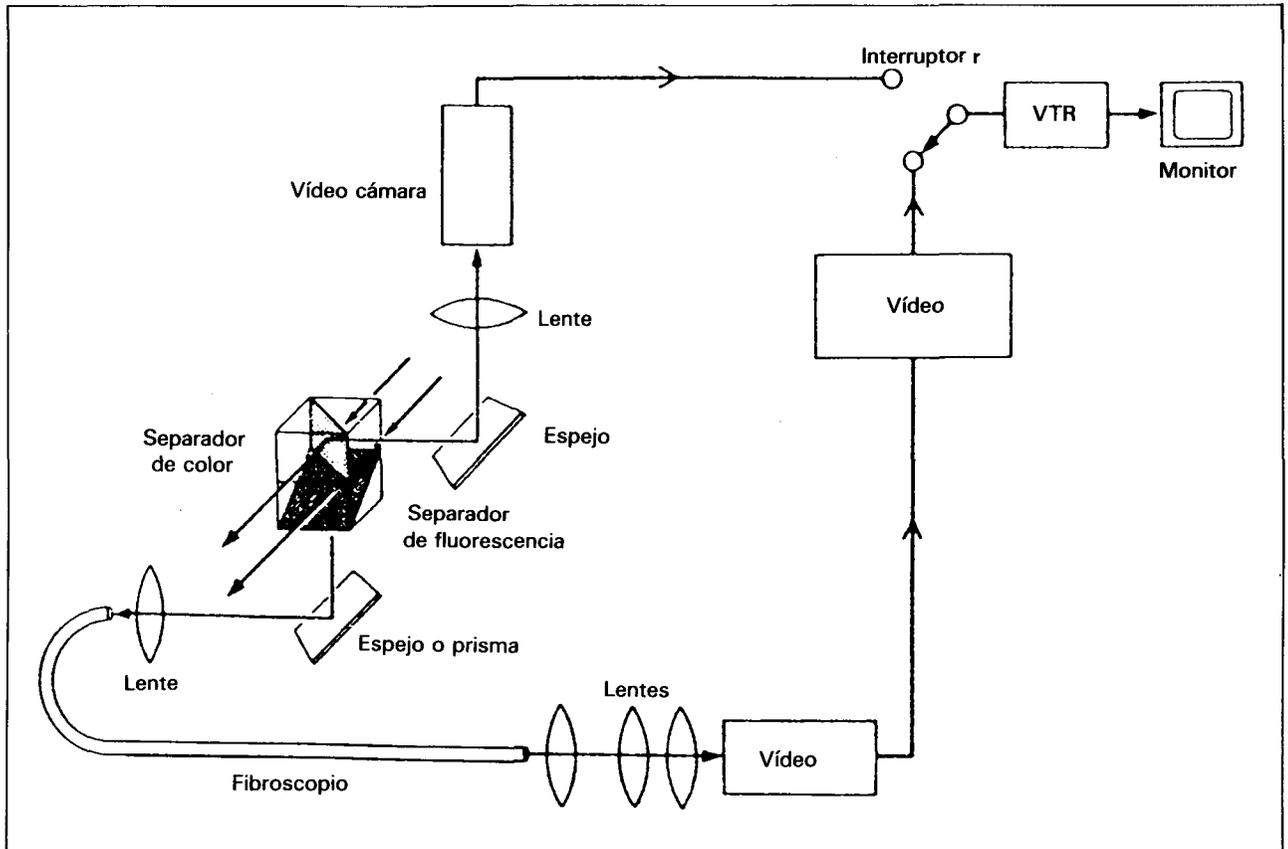


Fig 4b. Sistema de detección fluorescente/reflectante (Proffio 1983).

disminuir el rojo del entorno de la mucosa y una fibra de cuarzo no fluorescente como conductora. En este método de detección, el sistema consta además de un filtro violeta o prisma y lentes convergentes. La potencia máxima del láser es de 240 mW en tres líneas, 406,7 nm (36 %), 413,1 nm (60 %) y 415,4 nm (4 %). El diámetro de la fibra del láser es de 1,1 mm y su divergencia de 0,69 miliradiales. Los lentes focalizan el láser dentro de la fibra de cuarzo, de 400 micrones de diámetro y de varios metros de largo, sin que se pierda mucha energía al liberarse los 10 mW requeridos al llegar al tumor para excitar la hematoporfirina. Esta fibra puede ser introducida por el canal de espiración de un fibroscopio. La imagen detectada es magnificada y focalizada en un intensificador de imágenes después de pasarla a través de un filtro rojo que disminuye en  $10^{-6}$  el rojo del entorno normal de la mucosa bronquial.

Con este método es posible visualizar tumores de sólo 1 mm de espesor por pocos mm de largo que serían raramente visibles a la luz blanca del fibroscopio convencional. Este método permite también fotografiar la fluorescencia captada. De los primeros 38 casos publicados por los autores de este sistema diagnóstico<sup>51</sup>, 22 fueron verdaderos positivos, 7 verdaderos negativos, 9 falsos positivos y ningún falso negativo. En estos 38 enfermos, 92 sitios de la mucosa bronquial fueron examinados para fluorescencia y

para histología por biopsia y cepillados, de ellos 28 fueron verdaderos positivos, 16 falso positivos, 47 verdaderos negativos y 1 falso negativo. La eficacia estimada de este método obtuvo una sensibilidad de 100 % para los pacientes y del 97 % para los sitios de la mucosa bronquial examinados. La especificidad fue del 45 y del 75 % y la eficacia del 76 y del 82 %, respectivamente.

Posteriormente<sup>52</sup>, un segundo tipo de intensificador de imágenes fue desarrollado por los mismos autores mediante un sistema alternativo fluorescente-reflectante, básicamente igual que el anterior, pero con la salvedad de la presencia en este último de una micro-lente divergente en la punta de la fibra (fig. 4b).

En la Clínica Mayo se desarrolló a finales de los años setenta, un método que utiliza un detector fotoeléctrico de energía fluorescente y que genera una señal sonora cuando el fibroscopio pasa por la mucosa neoplásica, aunque la fluorescencia no puede ser visualizada. Este sistema de detección fotoeléctrico de la fluorescencia del HpD, ideado y desarrollado por Kinsey y Cortese, permite el examen directo de las vías aéreas bajo luz blanca. El detector fotoeléctrico, simultáneamente, indica la presencia de dicha fluorescencia en el campo visual del broncoscopio.

Tal y como muestra la figura 5, el aparato consta fundamentalmente de dos sistemas: un sistema de excitación y un sistema de detección. El sistema de

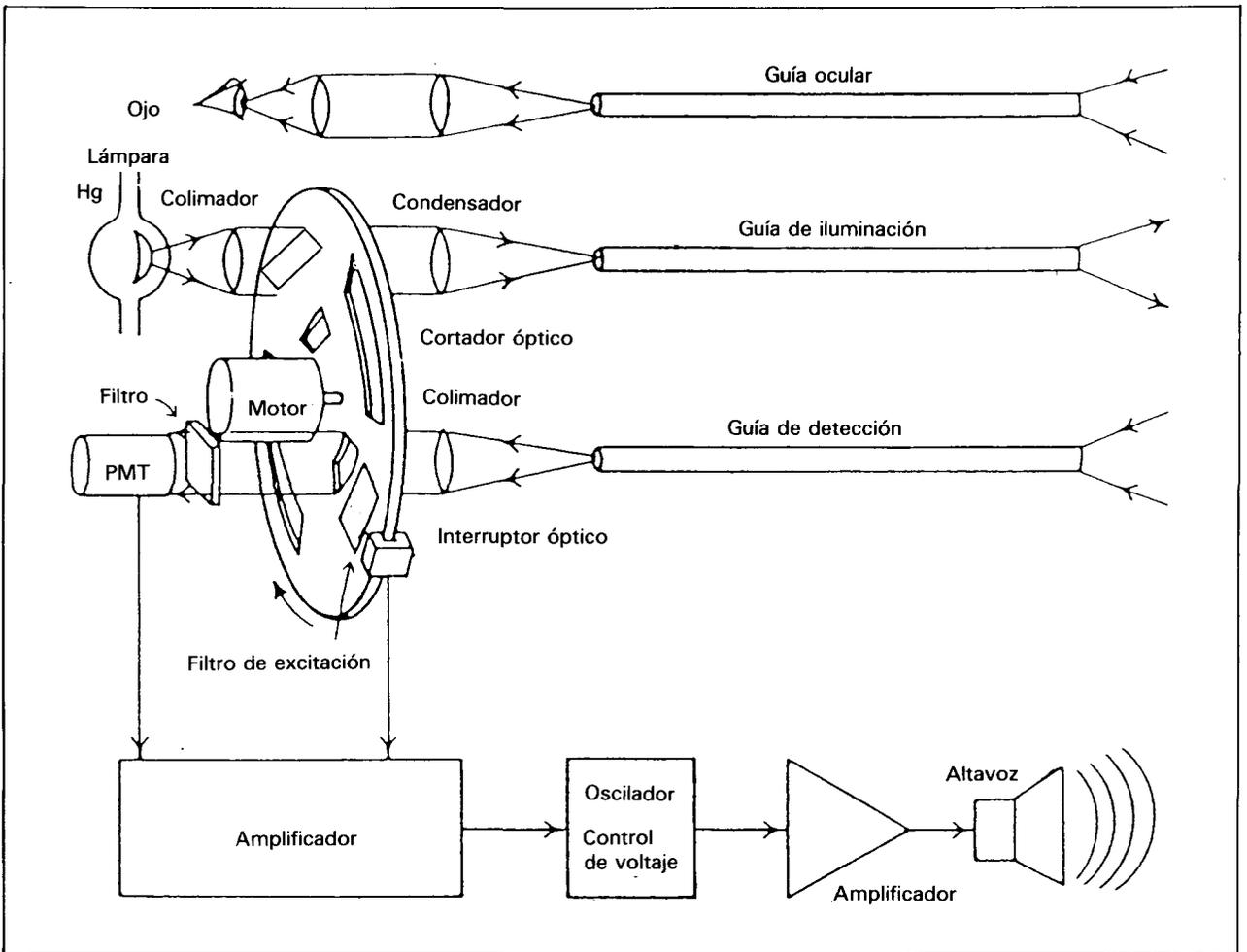
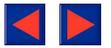


Fig 5. Sistema de detección de fluorescencia (Mayo Clinic).

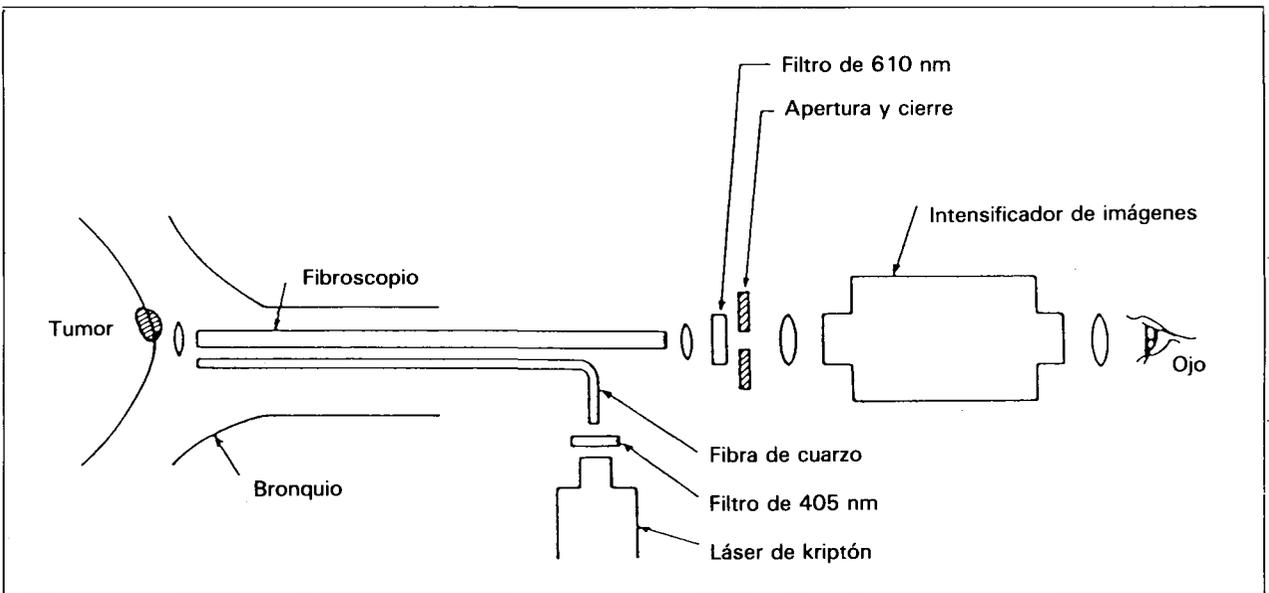


Fig 6. Sistema de detección de fluorescencia TMC.

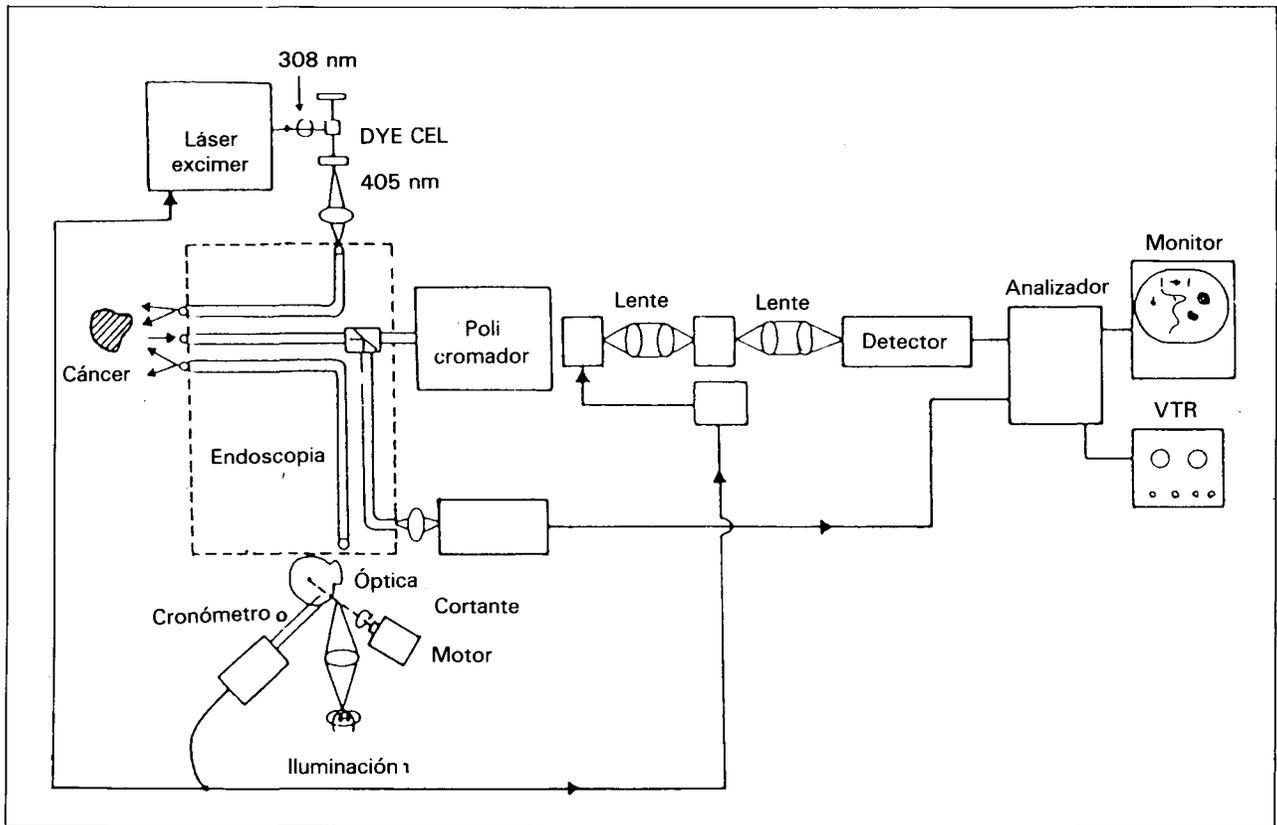


Fig 7. Sistema de detección de fluorescencia TMC II.

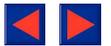
excitación consiste en una lámpara de mercurio como fuente que envía luz azul, una rueda que gira de 30 a 50 hercios, lentes colimadoras/condensadoras, filtros estrechos de excitación y una guía de excitación luminosa. Al girar la rueda y mediante unas hendiduras en la misma, se va cortando la luz que llega a la mucosa bronquial en forma de impulsos. Al llegar la luz azul al tejido con hematoporfirina, se emitirá fluorescencia roja. El poder de excitación liberado en la zona visualizada es de aproximadamente 1 mW. El sistema de detección de esa fluorescencia roja trata básicamente, mediante una serie de elementos, de hacerla llegar a un aparato fotomultiplicador receptor (PMT) el cual la transforma y la transmite a un amplificador en forma de sonido<sup>53</sup>. El broncoscopista no puede ver la fluorescencia pero sí oírla.

Con este sistema se publicaron los primeros trece tumores en diez enfermos con carcinoma oculto<sup>54</sup>. De los trece, cuatro eran visibles endoscópicamente, tres tenían dos cánceres en lugares distintos al mismo tiempo y seis eran carcinoma *in situ* con o sin microinvasión. Estos últimos probablemente no hubieran sido diagnosticados por broncoscopia convencional.

Siempre con la intención de mejorar la reproducción de la fluorescencia en el intensificador de imagen y teniendo como prototipo el sistema ideado por Pro-

fio, en Japón se fabrica un nuevo sistema que tiene la particularidad de poseer un filtro de interferencia de 405 nanómetros entre el láser de kriptón y la fibra de cuarzo que transmitirá el haz luminoso hasta el tumor<sup>55</sup> (fig. 6). Posteriormente este mismo sistema es mejorado al utilizar una cámara de video ultrasensible en vez del intensificador de imágenes, es el TMC I (Tokio Medical College System I)<sup>56</sup>. El TMC II fue designado para separar la fluorescencia propia emitida desde el tumor y la autofluorescencia que en ocasiones se desprende de la mucosa normal (fig. 7). Este sofisticado sistema, posee un espectrofotómetro y una serie de filtros que seleccionan y transmiten la imagen hasta unos microordenadores que almacenan y separan posteriormente ambas fluorescencias<sup>56</sup>. Con estos últimos sistemas de fluorescencia se publicaron un total de 78 casos de carcinoma y todos, menos dos adenocarcinomas y tres carcinomas escamosos, mostraron fluorescencia.

Los métodos descritos parecen auspiciar un rayo de esperanza en el diagnóstico precoz del carcinoma broncogénico, si bien hemos de tener en cuenta que en todos ellos la indicación la establece la presencia de células malignas en el esputo, la mayoría de las veces de carcinoma escamoso, tanto en enfermos con radiología y broncoscopia negativas, como en enfermos con anomalía radiográfica periférica, ya que en este

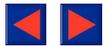


último caso podría existir un segundo carcinoma simultáneo y oculto<sup>57</sup>.

El futuro de la detección precoz del cáncer ha de pasar por el desarrollo de nuevos sensibilizadores, además del HpD y del DHE (Fotofrín®), con mejores propiedades fotofísicas que deriven en una mayor selectividad por los tumores y en menores efectos secundarios. En este sentido ya existen trabajos de investigación con nuevos sensibilizadores, los llamados de segunda generación como los meso-tetrafenil porfinas, diéteres de la hematoporfirina, derivados de la clorina o el benzoderivado de la protoporfirina IX<sup>58</sup> que, aunque su principal aplicación vaya dirigida al tratamiento por fotoquimioterapia o terapia fotodinámica (PDT), no cabe duda de que podrían ser aplicadas también en el diagnóstico de la neoplasia. Por otra parte, la utilización de nuevos láseres como los de vapor de oro, el excimer, etc, unidos al desarrollo de nuevos aparatos de detección de fluorescencia, mejorarán también las esperanzas en la lucha contra esta enfermedad.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Rall DP, Loo TL, Lane M et al. Appearance and persistence of fluorescence material in tumor tissue after tetracycline administration. *J Natl Cancer Inst* 1957; 19:79-84.
- Rasmussen, Taxdall DS, Ward DS, Figge FH. Fluorescence of human lymphatic and cancer tissues following high doses of intravenous hematoporphyrin. *Cancer* 1955; 8:78-81.
- Raab O. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusoria. *Z Biol* 1900; 39:524.
- Mellors RC, Glassman A, Pappanicolaou CN. A microfluorometric scanning method for the detection of cancer cells in smears of exfoliated cells. *Cancer* 1952; 5:458-468.
- Tomson SH, Emmett EA, Fox SH. Photodestruction of mouse epithelial tumors after oral acridine orange and argon laser. *Cancer Res* 1974; 34:3.124-3.127.
- Martini N. Lung mapping. *Symp Advances in Bronchoscopy, ACCP, March 17-19. S. Diego California. 1983.*
- Martini N, Melaned MR. Occult carcinoma of the lungs. *Ann Thorac Surg* 1980; 30:215-223.
- Molaned MR, Flehinger BJ, Muhammad BZ, Heeland RT, Hallerman ET, Martini N. Detection of true pathology stage I lung cancer in a screening program and the effect on survival. *Cancer* 1981; 47:1.182-1.187.
- Williamns DE, Pairolero PC, Davis CS et al. Survival of patients surgically treated for stage I lung cancer. *J Thor Cardiovasc Surg* 1981; 82:70-76.
- Sanderson DR, Fontana RS, Woolner LB, Bernatz PE, Payne WS. Bronchoscopic localization of radiographically occult lung cancer. *Chest* 1974; 65:608-612.
- Martini N, Beatt EJ, Clifton EE, Melaned MR. Radiologically occult lung cancer. Report of 26 cases *Surg Clin North Amer* 1974; 54:811-823.
- Sanderson DR, Fontana RS. Early lung cancer detection and localization. *Ann Otol* 1975; 84:583-588.
- Melaned MR, Flehinger BJ, Muhammad B, Zaman Helan RT, Perchick WA, Martini N. Screening for early lung cancer. Result of the Memorial Sloan Kettering Study in New York. *Chest* 1984; 1:44-53.
- Woolner LB, Fontana RS, Cortese DA et al. Roentgenographically occult lung cancer: pathologic findings and frequency of multicentricity during a ten year period. *Mayo Clinic Proc* 1984; 59:453-456.
- Cortese DA, Pairolero PC, Bergstralh MH, et al. Roentgenographically occult lung cancer. A ten year experience. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1983; 86:373-380.
- Cortese DA, Kinsey JH. Hematoporphyrin derivative fluorescence for lung cancer localization. *Semin Respir Med* 1981; 3:37-41.
- Saccomano G, Archer VE, Auerbach O, Saunders RP, Brennan LM. Development of carcinoma of the lung as reflected in exfoliated cells. *Cancer* 1974; 33:256-270.
- Marsch BR, Frost JK, Erizan YS, Carter D, Proctor DF. Flexible fiberoptic bronchoscopy. Its place in the search for lung cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1973; 82:757-764.
- Lipson RL, Baldes EJ. The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivate. *Arch Dermatol* 1960; 82:508-516.
- Lipson RL, Baldes EJ, Olsen AM. The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J Natl Cancer Inst* 1961; 26:1-10.
- Lipson RL, Baldes EJ, Olsen AM. Hematoporphyrin derivative: a new aid for endoscopic detection of malignant disease. *J Cardiovasc Surg* 1961; 42:623-629.
- Lipson RL, Baldes EJ, Gray MJ. Hematoporphyrin derivate for detection and management of cancer. *Cancer* 1967; 20:2.255-2.267.
- Berembaun MC, Bonnet R, Sourides PA. *In vivo* biological activity of component of hematoporphyrin derivative. *Br J Cancer* 1982; 45:571-581.
- Douquerty TJ, Boyle DG, Weishaup KR, et al. Photoradiation therapy. Clinical and drugs advances. *Adv Exp Med Biol* 1983; 160:3.
- Gomer CJ, Douquerty TJ. Determination of H<sup>3</sup> and C<sup>14</sup> hematoporphyrin derivative distribution in malignant and normal tissues. *Cancer Res* 1979; 39:146.
- Bugelsky PJ, Porter CW, Dougherty TC. Autoradiographic distribution of hematoporphyrin in normal and tumor tissues of the mouse. *Cancer Res* 1981; 41:4.606-4.612.
- Douquerty TJ, Weishaup KR, Boyle DG. En: Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer. Principles and practice on Oncology. Philadelphia, Toronto 1982; 1.836.*
- Hausmann W. Über die sensibilisierenden Wirkung tierischer Farbstoffe und ihre physiologische Bedeutung. *Biochem Z* 1908; 14:275.
- Meyer-Betz F. Untersuchungen über die biologische (photodynamische) Wirkung der hamatoporphyrins und uanderer Derivate der Blut und Gallenfarbstoffe. *Dtsch Arch Klin Med* 1913; 112:476-503.
- Auler H, Banzer G. Untersuchungen über die Rolle der Porphyrie bei gschwulsskranken Menschen und Tieren. *Z Krebsforsch* 1943; 53:65-68.
- Figge FHG, Weiland GS, Manganiello LOJ. Cancer detection and therapy: Affinity of neoplastic, ambrionic and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins. *Proc Soc Exp Biol Med* 1948; 68:640-641.
- Carpenter RJ III, Neel HB III, Ryan RJ, Sanderson DR. Tumor fluorescence with hematoporphyrin derivative. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1977; 86:661-666.
- Cortese DA, Kinsey JH. Endoscopic management of lung cancer with hematoporphyrin derivative phototherapy. *Mayo Clin Proc* 1982; 57:543-547.
- Hayata Y, Kato H, Konaka C et al. Photoradiation therapy with hematoporphyrin derivative in early and stage I lung cancer. *Chest* 1984; 86:169-177.
- Cortese DA, Kinsey JH. Hematoporphyrin derivative phototherapy in the treatment of the bronchogenic carcinoma. *Chest* 1984; 86:8-13.
- Balchum OJ, Doiron DR. Photoradiation therapy of endobronchial lung cancer. Large obstructing tumors and early stage bronchial cancer lesions. *Clin Chest Med* 1985; 6:255-275.
- Edell ES, Cortese DA. Bronchoscopic phototherapy with hematoporphyrin derivative for treatment of localized bronchogenic carcinoma: a 5-year experience. *Mayo Clin Proc* 1987; 62:8-14.
- Kato H, Konaka C, Kawatw N et al. Five year disease free survival of a lung cancer patient treated only by photodynamic therapy. *Chest* 1986; 90:768-770.
- Mc Caughan JS, Nims TA, Guy JT, Hicks WJ, Williams TE, Laufman LR. Photodynamic therapy for esophageal tumors. *Arch Surg* 1989; 124:74-80.
- Díaz Jiménez JP, Edell ES. Fotoquimioterapia. Utilidad de la hematoporfirina en el tratamiento del cáncer por fotorradiación. *Rev Clin Esp* 1988; 182:34-38.



41. Díaz Jiménez JP, Edell ES, Cortese DA. Time dependence on cell survival after hematoporphyrin derivative phototherapy. Abstract of the Porphyrin Photosensitization Workshop. Los Angeles California June 1986; 11.
42. Paramsothy M, Zainuddin J, Low KS. *In vivo* nuclear imaging studies of uptake and retention of Tc-99m-labelled HpD in a murine tumor. *Laser Med Sci* 1989; 4:205-210.
43. Edell ES, Cortese DA. Potentiation of hematoporphyrin derivative phototherapy with adriamycin. Abstracts of the orphyrin Photosensitization Workshop. Los Angeles California June 1986; 15.
44. Henderson BW, Dougherty TJ, Malone PB. Studies of the mechanisms of tumor destruction by photoradiation therapy. *Prog Clin Biol Res* 1984; 170:601-612.
45. Matthews W, Rizzoni W, Mitchell J, Russo A, Pass H. *In vitro* photodynamic therapy human lung cancer. *J Surg Res* 1989; 47:276-281.
46. Gray MJ, Lipson L, Maeck JVS, Parker L, Romeyn D. Use of hematoporphyrin derivative in detection and management of cervical cancer: A preliminary report. *A J Obstet Gynecol* 1967; 99:766-771.
47. Lipson RL, Baldes EJ, Olsen AM. Further evaluation of the use of hematoporphyrin derivative as a new aid for the endoscopic detection of malignant disease. *Chest* 1964; 46:676-679.
48. Leonard JR, Beck WL. Hematoporphyrin fluorescence: An aid in diagnosis of malignant neoplasms. *Laryngoscope* 1971; 81:365-372.
49. Profic AE, Doiron DR. Laser fluorescence bronchoscopy for localization of occult lung tumors. *Med Phys* 1979; 6:523-525.
50. Doiron DR, Profio AE, Vincent RJ, Dougherty TJ. Fluorescence bronchoscopy for detection of lung cancer. *Chest* 1979; 76:27-32.
51. Balcum OJ, Doiron DR, Profio AE, Huth GC. Fluorescence bronchoscopy for localizing early bronchial cancer and carcinoma *in situ*. *Recent Results Cancer Res* 1982; 82:97-120.
52. Profio AE, Doiron DR, Balcum OJ, Huth GC. Fluorescence bronchoscopy for localization of carcinoma *in situ*. *Med Phys* 1983; 10:35-39.
53. Kinsey JH, Cortese DA, Sanderson DR. Detection of hematoporphyrin fluorescence during fiberoptic bronchoscopy to localize early bronchogenic carcinoma. *Mayo Clin Proc* 1978; 53:594-600.
54. Cortese DA, Kinsey JH, Woolner LB, Sanderson DR, Fontana RS. Hematoporphyrin derivative in the detection and localization of radiographically occult lung cancer. *Am Rev Respir Dis* 1982; 126:1.087-1.088.
55. Hayata Y, Kato H, Honaka C et al. Fiberoptic bronchoscopic photoradiation in experimentally induced canine lung cancer. *Cancer* 1983; 51:50-56.
56. Kato H, Cortese DA. Early detection of lung cancer by means of hematoporphyrin derivative fluorescence and laser photoradiation. *Clin Chest Med* 1985; 6:237-253.
57. Cortese DA. Endobronchial management of lung cancer. *Chest* 1986; 89:234S-236S.
58. Kreimer-Birnbaum M. Modified porphyrins, clorins, pthalocyanines, and purpurins: Second generation photosensitizers for photodynamic therapy. *Semin Hematol* 1989; 26:157-173.
59. Morgan AR, Selman SH. New photosensitizers for the photodynamic therapy of tumors. *Drugs of the Future* 1988; 13:1.073-1.082.