



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

**ESPAÑA** 



11) Número de publicación: 2 434 244

51 Int. Cl.:

A61N 5/06 (2006.01) C12Q 1/04 (2006.01) G01N 21/91 (2006.01)

12 TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 21.01.2009 E 09702254 (5)
 (97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: 07.08.2013 EP 2240597

(54) Título: Fotoestimulación selectiva para inducir proliferación celular

(30) Prioridad:

18.01.2008 US 22202 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 16.12.2013

(73) Titular/es:

THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION (100.0%)
55 FRUIT STREET
BOSTON, MA 02114, US

(72) Inventor/es:

LATINA, MARK A. y YARMUSH, MARTIN L.

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

### **DESCRIPCIÓN**

Fotoestimulación selectiva para inducir proliferación celular.

#### Campo técnico

Esta invención se refiere al foto-tratamiento de tejido, y más particularmente al uso de fotoestimulación para inducir proliferación celular.

#### Antecedentes

5

10

20

25

40

45

50

El tratamiento de tejido con luz, por ejemplo, de un láser, es una práctica común en diversos campos médicos. En oftalmología, por ejemplo, las aplicaciones incluyen el uso de un láser para la fotocoagulación, es decir, la irradiación de luz que provoca daño tisular. La fotocoagulación se usa para tratar enfermedades de trastorno de la retina tales como degeneración macular relacionada con la edad (AMD), maculopatía diabética (DMP), retinopatía diabética proliferativa (PDR), una retinopatía serosa central (CSR). Además, la patente estadounidense n.º 5,549,596 describe el uso de direccionamiento de láser selectivo como método de daño de células intraoculares pigmentadas mientras que se evitan células no pigmentadas adyacentes.

#### Sumario

15 La invención se refiere a un sistema tal como se describe en la reivindicación 1.

La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que si se irradia un tejido con una dosis subletal de radiación, por ejemplo, desde un láser, las células pigmentadas en el tejido se estimulan selectivamente (es decir, se fotoestimulan) para proliferar y producir niveles superiores de determinados factores mitogénicos y factores de crecimiento tales como factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Por tanto, la radiación subletal, cuando se aplica apropiadamente, puede provocar una respuesta bioquímica celular, que induce proliferación y crecimiento, y de ese modo da como resultado un efecto cicatrizante sobre tejido atrofiado o enfermado, mientras que evita el daño celular y la muerte celular.

En particular, los diversos parámetros de una radiación pulsada, tales como la potencia, la duración de pulso (que también se denomina en el presente documento "ancho de pulso"), la energía de radiación total (que también se denomina en el presente documento "fluencia"), la longitud de onda y, si se usan múltiples pulsos, la tasa de pulsos y el número total de pulsos, se seleccionan y controlan cuidadosamente para minimizar la destrucción de las células pigmentadas irradiadas. Por ejemplo, la duración del pulso de láser subletal, o los pulsos, debe ser inferior al tiempo de relajación térmica de células individuales en el tejido, y la longitud de onda usada debe ser próxima al máximo de absorbancia de las células que van a seleccionarse como diana, o de un pigmento dentro de esas células.

30 Como ejemplo, se describen métodos que implican fotoestimular selectivamente células pigmentadas, tales como células intraoculares, por ejemplo, células del retículo trabecular (TM), células epiteliales pigmentadas de la retina, células pigmentadas uveales, células de melanoma o células pigmentadas conjuntivales. Las células pigmentadas pueden contener pigmento sintetizado endógenamente o pueden ser células, por ejemplo, células fagocíticas, en las que se introduce pigmento exógeno poniendo en contacto las células fagocíticas con pigmento exógeno antes de irradiar el área de tejido que contiene las células. Alternativamente, pueden introducirse pigmentos en células no fagocíticas mediante técnicas de ingeniería genética o haciendo pasar los pigmentos a través de la membrana celular.

Tal como se usa en el presente documento, pigmento endógeno se refiere a pigmento sintetizado y retenido dentro de una célula, y pigmento exógeno se refiere a pigmento dentro de una célula que no se sintetizó dentro de la misma célula

En algunas realizaciones, la célula fagocítica es una célula del retículo trabecular y se introduce pigmento exógeno en el humor acuoso mediante irradiación por láser del iris.

Los nuevos métodos implican irradiar tejido con una dosis total de radiación o fluencia "subletal" administrada en una sesión de tratamiento que implica la administración de un pulso o una serie corta de pulsos administrada para fotoestimular las células pigmentadas en el tejido, mientras se mantiene un porcentaje significativo (de más del 90%) de las células totales dentro del tejido irradiado vivo, según se mide mediante un ensayo de viabilidad/citotoxicidad de células vivas/muertas.

La fluencia subletal varía para ejemplos que no son parte de la invención para diferentes potencias, longitudes de onda, duraciones de pulso y tasas de repetición, así como para diferentes tipos de láseres y células y niveles de pigmentación en las células. Por ejemplo, para una irradiación con un único pulso de células del RPE con duraciones de pulso de entre 250 ns y 3 μs, la fluencia subletal puede estar en el intervalo de desde aproximadamente 5 a 8 mJ/cm² hasta aproximadamente 250 a 285 mJ/cm², por ejemplo, de aproximadamente 10 a 220, de 25 a 200 y de 55 a 110 mJ/cm². Por ejemplo, una fluencia de menos de 120 mJ/cm² para una sesión de tratamiento de un pulso de 1 μs a 590 nm es una fluencia subletal usando un láser de colorante pulsado sobre

células del RPE. Como ejemplo adicional, para una irradiación de un único pulso de células del RPE con duraciones de pulso inferiores a 250 ns, por ejemplo, duraciones de pulso de 10-20 ns, la fluencia subletal puede estar en el intervalo de desde aproximadamente 0,1 a 1 mJ/cm² hasta aproximadamente 20 a 30 mJ/cm², por ejemplo, de aproximadamente 0,5 a 20, de 1 a 15 y de 5 a 10 mJ/cm².

- Tal como se usa en el presente documento, la fotoestimulación selectiva de células es un efecto inducido mediante un láser que se hace funcionar a una longitud de onda absorbida de manera preferencial por un pigmento específico en células pigmentadas en comparación con células sin pigmentar (también denominadas en el presente documento no pigmentadas). El efecto es provocar que las células pigmentadas irradiadas tengan una respuesta bioquímica que aumente la producción de determinados factores mitogénicos y/o de crecimiento tales como, por ejemplo, uno o más de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante beta (TGFβ), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento similar a insulina (IGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor derivado de epitelio pigmentado (PEDF) y proteínas de choque térmico, y/o provocar que las células irradiadas aumenten su nivel de proliferación en comparación con células no irradiadas y sin pigmentar.
- Tal como se usa en el presente documento, una célula sin pigmentar o no pigmentada es una célula que tiene un nivel de un pigmento específico que es inferior a la mitad del nivel encontrado en una célula pigmentada dada.

20

35

40

45

50

55

- Como ejemplo se describen métodos para fotoestimular selectivamente células pigmentadas en un tejido en un paciente que incluyen seleccionar una región de tejido que contiene una célula diana pigmentada y una célula no pigmentada, en los que el pigmento es o bien pigmento sintetizado endógenamente o bien exógeno, e irradiar el tejido con uno o más pulsos de radiación, por ejemplo, desde un láser, en los que cada pulso comprende (i) una longitud de onda que se absorbe más en la célula pigmentada que en la célula no pigmentada, y (ii) una duración de pulso que es más corta que un tiempo de relajación térmica de la célula pigmentada, y en los que la energía de radiación total aplicada proporciona una fluencia subletal a las células diana pigmentadas, fotoestimulando así selectivamente células pigmentadas en el tejido.
- Los ejemplos de los métodos pueden incluir una o más de las siguientes características y/o características de otros aspectos descritos en el presente documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la fluencia subletal de la radiación por láser total puede ser inferior a 120 mJ/cm² y la duración de pulso está en el intervalo de desde 0,5 μs hasta 8 μs. En algunas realizaciones, la radiación puede tener una longitud de onda en el espectro visible (por ejemplo, en un intervalo de desde aproximadamente 400 nm hasta aproximadamente 800 nm).
- 30 En determinadas realizaciones que no son parte de la invención, la radiación por láser puede suministrarse en uno o más pulsos, cada uno con una duración de pulso de entre aproximadamente 1 ns y aproximadamente 2 μs. En algunas realizaciones, la fluencia de láser de la radiación por láser total puede ser inferior a 120 mJ/cm².
  - En algunas realizaciones que no son parte de la invención, la fluencia de láser subletal de la radiación por láser total puede ser inferior a 20 mJ/cm² y la duración de pulso puede ser de aproximadamente 10 nanosegundos. La radiación puede tener una longitud de onda en el espectro visible (por ejemplo, en un intervalo de desde aproximadamente 400 nm hasta aproximadamente 800 nm).
    - En otras realizaciones que no son parte de la invención, la fluencia de láser subletal de la radiación por láser total puede ser inferior a 200 mJ/cm² y la duración de pulso puede ser de aproximadamente 10 nanosegundos y la radiación puede tener una longitud de onda en el espectro infrarrojo (por ejemplo, en el intervalo de desde 1000 nm hasta 1500 nm).

Los métodos que no son parte de la invención pueden incluir una etapa o etapas de irradiación posteriores tras un periodo de regeneración.

En algunas realizaciones, el uno o más pulsos de radiación por láser pueden incidir sobre el tejido en un punto diana que tiene un diámetro de entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 1,5 mm o entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1,0 mm.

En diversas realizaciones, el tejido puede incluir un tejido de melanoma o intraocular, por ejemplo, una célula del retículo trabecular, una célula pigmentada epitelial de la retina, una célula pigmentada uveal y/o una célula de melanoma. En algunas realizaciones, la célula pigmentada puede ser una célula fagocítica dentro de un área intraocular en la que se introduce el pigmento poniendo en contacto la célula fagocítica con un pigmento exógeno antes de irradiar el área.

Como ejemplo se describen métodos para inducir selectivamente la proliferación de células epiteliales pigmentadas de la retina que incluye seleccionar una región de una retina que contiene células epiteliales pigmentadas de la retina, en los que las células epiteliales pigmentadas de la retina contienen pigmento que es o bien pigmento sintetizado endógenamente o bien exógeno, e irradiar la región de células epiteliales pigmentadas de la retina con uno o más pulsos de radiación subletal, en los que cada pulso proporciona una fluencia de menos de 120 mJ/cm² y comprende una duración de pulso de al menos 0,5 µs a una longitud de onda de entre 400 nm y 800 nm o una

duración de pulso en el intervalo de desde 5 ns hasta 0,5 µs a una longitud de onda de entre 1000 nm y 1500 nm y una longitud de onda que se absorbe más en las células epiteliales pigmentadas de la retina que en tejido circundante; en los que se aplican pulsos individuales con una separación de tiempo suficiente para garantizar la ausencia de fotocoagulación del tejido; y en los que la energía de radiación por láser total aplicada al tejido proporciona una fluencia de láser subletal a las células epiteliales pigmentadas de la retina, induciendo así selectivamente la proliferación de las células epiteliales pigmentadas de la retina en el tejido.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Realizaciones de los métodos que no son parte de la invención pueden incluir una o más de las siguientes características y/o características de otros aspectos descritos en el presente documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la radiación por láser puede incidir sobre el área intraocular en un punto diana de entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 1,5 mm de diámetro o entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1,0 mm de diámetro.

En algunas realizaciones, la exposición a radiación puede ser inferior a aproximadamente 20 mJ/ cm² a una duración de pulso en el intervalo de desde 5 ns hasta 0,5 ms a una longitud de onda de entre 400 nm y 800 nm. En determinadas realizaciones, los métodos incluyen además introducir pigmento exógeno en una o más de las células epiteliales pigmentadas de la retina.

Como ejemplo se describen métodos para fotoestimular selectivamente células pigmentadas en un tejido en un paciente que incluyen seleccionar una región de tejido que contiene una célula diana pigmentada y una célula no pigmentada, en los que el pigmento es o bien pigmento sintetizado endógenamente o bien exógeno, seleccionar una duración de pulso de uno o más pulsos de radiación, que es más corta que un tiempo de relajación térmica de la célula pigmentada, y una longitud de onda para generar uno o más pulsos de radiación que se absorbe más en la célula pigmentada que en la célula no pigmentada, seleccionar una fluencia generada con el uno o más pulsos de radiación a la longitud de onda seleccionada y la duración de pulso seleccionada que es una fluencia subletal para las células pigmentadas, e irradiar el tejido con el uno o más pulsos de radiación, en los que la energía de radiación total aplicada al tejido proporciona una fluencia subletal a las células diana pigmentadas, fotoestimulando así selectivamente células pigmentadas en el tejido. Realizaciones de estos métodos que no son parte de la invención pueden incluir una o más de las características de otros aspectos descritos en el presente documento.

Como ejemplo se describen métodos para inducir selectivamente la proliferación de células epiteliales pigmentadas de la retina que incluyen seleccionar una región de una retina que contiene células epiteliales pigmentadas de la retina, en los que las células epiteliales pigmentadas de la retina contienen pigmento que o bien es pigmento sintetizado endógenamente o bien es exógeno, seleccionar una duración de pulso de uno o más pulsos de radiación y una longitud de onda para generar el uno o más pulsos de radiación que se absorbe más en las células epiteliales pigmentadas de la retina que en tejido circundante, seleccionar una fluencia generada con el uno o más pulsos de radiación a la longitud de onda seleccionada y la duración de pulso seleccionada que es una fluencia subletal para las células epiteliales pigmentadas de la retina, e irradiar la región de células epiteliales pigmentadas de la retina con el uno o más pulsos de radiación, induciendo así selectivamente la proliferación de las células epiteliales pigmentadas de la retina en el tejido. Realizaciones de estos métodos que no son parte de la invención pueden incluir una o más de las características de otros aspectos descritos en el presente documento.

En general, en un aspecto adicional, la invención presenta sistemas para fotoestimular selectivamente células pigmentadas en un tejido en un paciente que incluyen una fuente de luz para generar uno o más pulsos de radiación, en los que cada pulso comprende (i) una longitud de onda que se absorbe más en la célula pigmentada que en la célula no pigmentada, y (ii) una duración de pulso que es más corta que un tiempo de relajación térmica de la célula pigmentada, un sistema óptico para dirigir el uno o más pulsos a una región de tejido que contiene una célula diana pigmentada y una célula no pigmentada, en los que el pigmento es o bien pigmento sintetizado endógenamente o bien exógeno, y una unidad de control configurada para controlar la irradiación del tejido con el uno o más pulsos de radiación de tal manera que la energía de radiación total aplicada al tejido proporciona una fluencia subletal a las células diana pigmentadas, fotoestimulando así selectivamente las células pigmentadas en el tejido. Realizaciones de estos sistemas pueden incluir una o más de las siguientes características y/o características de otros aspectos descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, la unidad de control puede estar configurada además para controlar al menos una de la duración de pulso, la longitud de onda y la fluencia para garantizar la fluencia subletal para las células diana pigmentadas. En determinadas realizaciones, los sistemas pueden incluir además una unidad de monitorización para monitorizar la duración, la longitud de onda y la fluencia del pulso emitido. La fuente de luz puede estar configurada para generar pulsos a una duración en el intervalo de nanosegundos. La fuente de luz está configurad a para generar pulsos a una longitud de onda en el espectro visible en el intervalo de aproximadamente 532 nm. Los sistemas están configurados para generar una fluencia de radiación en el tejido en el intervalo de desde 100 mJ/cm² hasta 250 mJ/cm².

En general, en un aspecto adicional, la invención presenta sistemas para inducir selectivamente la proliferación de células epiteliales pigmentadas de la retina que incluyen una fuente de luz para generar uno o más pulsos de radiación, medios para seleccionar una región de una retina que contiene células epiteliales pigmentadas de la retina, en los que las células epiteliales pigmentadas de la retina contienen pigmento que o bien es pigmento

sintetizado endógenamente o bien es exógeno, medios para seleccionar una duración de pulso del uno o más pulsos de radiación y una longitud de onda para generar el uno o más pulsos de radiación que se absorbe más en las células epiteliales pigmentadas de la retina que en tejido circundante, medios para seleccionar una fluencia generada con el uno o más pulsos de radiación a la longitud de onda seleccionada y duración de pulso seleccionada que es una fluencia subletal para las células epiteliales pigmentadas de la retina, y una óptica para irradiar la región de células epiteliales pigmentadas de la retina con el uno o más pulsos de radiación, induciendo así selectivamente la proliferación de las células epiteliales pigmentadas de la retina en el tejido. Realizaciones de estos sistemas pueden incluir una o más de las características de otros aspectos de las invenciones descritas en el presente documento.

- A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o pruebas de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados.
- 15 En caso de conflicto, regirá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no se pretende que sean limitativos.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

25

40

45

20 La figura 1 es un diagrama de un aparato láser para la fotoestimulación de tejido.

La figura 2 es un diagrama de flujo que ilustra la fotoestimulación.

La figura 3 es un diagrama de la viabilidad de células del RPE pigmentadas como función de la fluencia de láser y el contenido en melanina.

Las figuras 4A a 4H son una serie de representaciones de microfotografías de células del RPE (4A-4G) y un gráfico (4H) que ilustra la regeneración de células del RPE tras la irradiación por láser.

Las figuras 5A a 5E son una serie de representaciones de microfotografías de células en un modelo de cicatrización de heridas *in vitro* (5A-5D) y un gráfico (5E) que ilustra diversos niveles de cicatrización de heridas a lo largo del tiempo.

Las figuras 6A a 6E son una serie de imágenes de células (6A-6D) y un gráfico (6E) que ilustra la tinción con BrdU.

30 La figura 7 es una ilustración de análisis mediante RT-PCR de PDGFA, PDGFB, receptor alfa de PDGF (PDGFR-α) y PDGFR-β en células del RPE de control simulado e irradiadas con láser.

La figura 8A es una ilustración de RT-PCR que muestra la expresión génica de PDGFA y PDGFB y sus receptores a diferentes tiempos tras la irradiación por láser.

La figura 8B es una ilustración de RT-PCR que muestra la expresión génica de TGFβ1, bFGF, IGF, EGF, VEGF, PEDF, y sus receptores, así como la expresión de diversas proteínas de choque térmico y β-actina a diferentes tiempos tras la irradiación por láser.

La figura 9A es un gráfico de la viabilidad normalizada de células del RPE fetal humano (hfRPE) como función de la fluencia de un único pulso generado con un láser de Nd:YAG.

La figura 9B es un gráfico de la viabilidad normalizada de células del hfRPE como función de la fluencia de un único pulso generado con un láser de colorante.

Símbolos de referencia similares en los diversos dibujos indican elementos similares.

Descripción detallada

En la actualidad, hay una variedad de sistemas de láser comercialmente disponibles para su uso oftálmico, cualquiera de los cuales puede adaptarse para realizar los métodos descritos y reivindicados en el presente documento. Los láseres quirúrgicos oftálmicos comercialmente disponibles pueden modificarse fácilmente, por cualquier experto en la tecnología láser, para producir la longitud de onda, el tamaño de punto diana y la fluencia subletal requeridos para proporcionar la fotoestimulación selectiva inducida por láser de células pigmentadas.

Sistemas láser para fotoestimulación

La figura 1 muestra un sistema 1 a modo de ejemplo que proporciona pulsos de láser para la fotoestimulación de

tejido. Por ejemplo, la radiación del sistema 1 puede dirigirse a una retina 3 de un ojo 5 humano para fotoestimular las células del epitelio pigmentado de la retina (RPE), provocando un aumento en la proliferación.

El sistema 1 incluye una fuente 7 de láser pulsado (por ejemplo, un láser de rubí o de Nd:YAG de conmutación de Q), un láser 9 de apuntamiento, y elementos ópticos para dirigir el haz de tratamiento de la fuente 7 de láser y el haz de apuntamiento del láser 9 de apuntamiento a un tejido diana, por ejemplo las células del RPE. Los elementos ópticos incluyen, por ejemplo, divisores 13, 15 de haz, una placa 17 asférica, un colimador 19 de haz (fibra óptica), espejos 21 y lentes, por ejemplo, una lente 23 convergente.

El sistema 1 incluye además una unidad 8 de control para controlar la fuente 7 de láser (energía de pulso, ancho de pulso, número de pulsos), el láser 9 de apuntamiento, los elementos ópticos (por ejemplo, lente 23), la posición de la diana (por ejemplo, retina 3). La unidad 8 de control puede estar configurada para el control automático y/o manual. Por ejemplo, la unidad de control controla la longitud de onda de la radiación emitida, la duración de los pulsos de láser emitidos, y la fluencia de la radiación emitida dependiendo del modo de funcionamiento activado. En algunas realizaciones, la unidad 8 de control también puede usarse para controlar la posición y el tamaño del haz de láser en la retina (por ejemplo, manualmente por el médico). Los parámetros del haz de láser pueden monitorizarse, por ejemplo, con un medidor 25 de potencia de láser. Además, el tejido y el tamaño del punto de enfoque pueden observarse y medirse usando un microscopio 27 acoplado a la unidad 8 de control.

Aunque en la figura 1 el sistema 1 incluye la fuente 7 de láser, en algunas realizaciones, pueden usarse otros tipos de fuentes de luz tales como una fuente de luz incoherente para generar pulsos de radiación.

Por ejemplo, pueden irradiarse células del RPE usando un láser de colorante pulsado (por ejemplo de Palomar Medical Inc.) que emite a 590 nm. La energía de pulso puede medirse usando un medidor de potencia de energía (DigiRad, EE.UU., radiómetro universal R-752). Durante estudios que se describirán a continuación, se irradiaron células ARPE-19 a diversas exposiciones a radiación (mJ/cm²) usando la configuración experimental mostrada en la figura 1. Se usó un láser de helio-neón con una salida de 15 mW, acoplado en el trayecto óptico, para la alineación del haz de láser. El láser de colorante pulsado se acopló a una fibra de 1 mm de diámetro de núcleo (Thorlabs, Inc.

Newton, N.J., EE.UU., NA = 0,22) y la longitud de la fibra fue de 50 m para minimizar la modulación de intensidad espacial debida a la formación de manchas en la punta de la fibra distal. Se acopló directamente la fibra a una fibra de lámpara de hendidura.

La fluencia puede calcularse tal como se describe, por ejemplo, en R. Brinkmann, J. Roider, R. Bimgruber, "Selective Retina Therapy (SRT): A review on methods, techniques, preclinical and first clinical results", Bull. Soc. Belge Ophtalmol. 302, 51-60, 2006.

Pueden captarse imágenes de vídeo de la región de irradiación por láser mediante una cámara CCD a través de una lámpara de hendidura (SL130, Zeiss, Alemania), digitalizarse, analizarse y visualizarse en una pantalla o imprimirse. En algunos experimentos descritos en el presente documento, se usaron los siguientes parámetros: una fluencia de láser de 5 mJ/cm² - 2500 mJ/cm², una duración de pulso de láser de 1 µs, y 200 puntos por tejido de 3,5 cm de diámetro. Los puntos de tratamiento con láser se separaron, por ejemplo, una distancia de 2 mm. Se determinó que el perfil del láser era de aproximadamente 1,2 mm de diámetro. Por tanto, se calculó la irradiación por láser como la energía de pulso (medida por el medidor de potencia) dividida entre el área de punto.

En algunas realizaciones, la irradiación por láser puede suministrarse a través de un sistema de suministro de lámpara de hendidura de tal manera que se alcanza una exposición a radiación apropiada en el punto focal de la óptica de la lámpara de hendidura. Pueden usarse filtros de densidad neutra para atenuar los haces de láser.

En algunas realizaciones, el láser puede proporcionar una secuencia de pulsos, por ejemplo, a una tasa de repetición de hasta 500 Hz o más. Entonces, la energía por pulso de láser puede tener valores inferiores para evitar dañar de manera letal el tejido durante la aplicación de una serie de pulsos de láser.

#### Métodos de fotoestimulación

5

10

15

30

35

40

55

La figura 2 ilustra un diagrama de flujo de un protocolo de tratamiento fotoestimulado selectivo. En primer lugar, se selecciona un área de tejido que se desea estimular (etapa 30). El área de tejido o bien contiene células que muestran suficiente concentración de pigmento o bien puede introducirse pigmento antes o después de la selección (etapa 30). El área seleccionada puede diagnosticarse como atrófica o el área seleccionada puede estar relacionada con un área dañada de tejido. En el primer caso, el objetivo es reinstaurar un tejido sano o más sano mediante proliferación fotoestimulada. En el segundo caso, el objetivo es aumentar la tasa de migración de células sanas al interior de la región de tejido dañada.

A continuación, se realiza una primera sesión de tratamiento por fotoestimulación I (etapa 35). Durante la sesión de fotoestimulación I, se irradia un único pulso o una secuencia de pulsos de láser sobre el tejido (etapa 37). El único pulso de láser o la secuencia de pulsos de láser proporciona una fluencia subletal al área seleccionada. La irradiación puede realizarse, por ejemplo, en un modo sin movimiento, un modo de barrido continuo o en un modo de patrón. Si el tratamiento con láser puede realizarse en múltiples modos, una etapa de seleccionar la irradiación (etapa 39) puede ser parte de la sesión de fotoestimulación I (etapa 35) y preceder al único pulso o a una secuencia

de pulsos de láser.

20

35

50

55

Durante una denominada fase de "cicatrización" (etapa 40), el tejido irradiado desarrolla un aumento de proliferación y actividad de reparación tisular. Esta fase es la respuesta bioquímica de las células a la fotoestimulación. La fase de cicatrización puede estar temporalmente limitada, de tal manera que el tratamiento fotoestimulado selectivo incluye una segunda sesión de fotoestimulación II (etapa 45) o una secuencia de sesiones de fotoestimulación interrumpidas por fases de cicatrización. El número de sesiones de fotoestimulación puede determinarse por adelantado o puede ajustarse durante el tratamiento observando el éxito del tratamiento. Adicionalmente, el parámetro de las sesiones de fotoestimulación puede variar o puede adoptarse durante el tratamiento.

Los métodos descritos en el presente documento implican fotoestimular selectivamente células pigmentadas.

Cuando se irradia un área de tejido que contiene células pigmentadas con un láser, tal como un láser de Nd:YAG de conmutación de Q, se induce que las células en el tejido irradiado proliferen y provoquen la reparación y/o regeneración del tejido. Los efectos biológicos están selectivamente limitados a la región iluminada así como a las células que expresan el cromóforo que absorbe la luz de láser. Las células que van a seleccionarse como diana pueden expresar un cromóforo endógeno (por ejemplo, epitelio de la retina), o el cromóforo puede introducirse artificialmente o mediante expresión del cromóforo dentro de las células que van a inducirse usando una variedad de técnicas, tales como mediante terapia génica.

En algunos modos de poner en práctica la invención, se usa un láser de conmutación de Q de Nd:YAG, de pulsos cortos . Generalmente, los láseres de Nd:YAG emiten a 1064 nm, y cuando se dobla la frecuencia proporcionan una salida de 532 nm. Ambas de estas longitudes de onda son útiles dentro del ojo, porque se transmiten mediante medios y estructuras oculares incluyendo la córnea, el humor acuoso, el cristalino, el humor vítreo y la esclerótica. En otras realizaciones, puede usarse un láser de colorante pulsado (por ejemplo, un láser Palomar 3010; 590 nm, 1 μs, de 1 mm de diámetro), así como láseres de estado sólido bombeados por diodo, sistemas de láser de diodo pulsados o incluso fuentes de luz pulsada incoherente.

En general, el pigmento en las células hace que las células diana pigmentadas sean ópticamente más densas que las células circundantes no pigmentadas, y por tanto más susceptibles a la fotoestimulación inducida por láser a fluencias y longitudes de onda de láser seleccionadas. A fluencias subletales, la luz, que incide sobre las áreas de tejido diana durante cortas duraciones de tiempo, estimula selectivamente las células diana pigmentadas con un daño mínimo tanto a la célula diana como a las células circundantes. La selectividad de la estimulación tisular tiene un gran beneficio clínico en el tratamiento de estados patológicos limitados a células pigmentadas. Para estos estados, puede aumentarse la proliferación de las células estimuladas.

Los nuevos métodos requieren el uso de irradiación por láser que proporciona una fluencia subletal, o exposición a radiación total, durante una sesión de tratamiento dada de un tipo de célula específico con un nivel conocido o estimado de pigmentación endógena o exógena. A una duración de pulso de aproximadamente 1-5 µs, usando un láser de colorante pulsado o un láser de estado sólido bombeado por diodo, fluencias inferiores a 130 mJ/cm², por ejemplo, de aproximadamente 5, 8, 10, 15, 25, 35, 50, 75, 100, 110 ó 120 mJ/cm², son fluencias subletales, y por tanto son eficaces en fotoestimular células del RPE pigmentadas (con melanina endógena como pigmento) sin provocar destrucción significativa de las células pigmentadas, y sin provocar fotocoagulación del tejido. Debido al direccionamiento selectivo de los nuevos métodos, también se evitan células sin pigmentar, y por tanto no montan una respuesta celular.

40 A duraciones de pulso de varios nanosegundos a varios 100 de nanosegundos, la fluencia subletal se desplaza a valores inferiores y puede estar en el intervalo de desde aproximadamente varios μJ/cm² hasta aproximadamente varios mJ/cm², por ejemplo, de aproximadamente 10 μJ/cm² a 30 mJ/cm², de 0,1 a 10 y de 1 a 5 mJ/cm². Por ejemplo, una fluencia de menos de 10 mJ/cm² para una sesión de tratamiento de un pulso de 10 nanosegundos a 532 nm puede ser una fluencia subletal usando un láser de Nd-YAG de conmutación de Q. A duraciones de pulso más cortas, fluencias inferiores pueden ser eficaces para fotoestimular células del RPE pigmentadas sin provocar destrucción significativa de las células pigmentadas, y sin provocar fotocoagulación del tejido. Debido al direccionamiento selectivo de los nuevos métodos, también se evitan células sin pigmentar para estas duraciones de pulso más cortas.

La exposición a radiación deseada puede alcanzarse modificando la potencia, el tamaño de punto diana, la simetría de haz, los Julios/pulso suministrados y/o el número total de pulsos incluidos en una sesión de tratamiento. En general, el tamaño de punto diana es grande en comparación con los usados en muchas aplicaciones anteriores de terapia por láser en el ojo; en algunas realizaciones, el tamaño de punto diana es de desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 1 mm de diámetro. El uso de un tamaño de punto diana más grande es posible, porque los nuevos métodos proporcionan una estimulación celular selectiva basándose en pigmentación celular. Un área diana grande es ventajosa: se minimiza el tiempo de tratamiento cuando se necesita volver a dirigir el aparato láser menos veces

Pueden usarse duraciones de pulso de entre aproximadamente 1,0 nanosegundos y aproximadamente 2,0  $\mu$ s, por ejemplo, de 50, 100, 250, 500 ó 750 nanosegundos, o de 1,0 ó 1,5  $\mu$ s. La duración de pulso deseada se refiere al tipo y al tamaño de partícula de pigmento dentro de las células diana que van a fotoestimularse. Dado que la

relajación térmica de una partícula se refiere al tamaño de partícula del material de pigmento, partículas intracelulares más pequeñas requieren una menor duración de pulso para garantizar que se confina la energía a las células diana. Más específicamente, el calor se confina dentro de una diana esférica durante un tiempo de relajación térmica,  $T_r$ , que se refiere al diámetro diana,  $d_2$ , y la constante de difusividad térmica,  $D_r$ , mediante  $T_r = d_2 / 4D_r$ . Durante una exposición a láser más duradera, mayor que  $T_r$ , el calor dentro de la diana se difunde a estructuras o células circundantes. Por otro lado, si se genera calor dentro de la diana más rápido de lo que puede eliminarse calor por difusión, las temperaturas de la diana se vuelven muy superiores a sus tejidos circundantes y se minimiza la difusión térmica a estructuras circundantes. Por tanto, eligiendo una duración de pulso más corta que el tiempo de relajación térmica del pigmento diana (por ejemplo, melanina), puede alcanzarse una estimulación de diana selectiva. Suponiendo dianas esféricas de aproximadamente  $0.5~\mu m$  a  $5~\mu m$ , las estimaciones de tiempos de relajación térmica para dianas biológicas oscilan entre  $10^{-6}$  s y  $10^{-6}$  s.

La longitud de onda de emisión del láser puede estar dentro del espectro o bien visible o bien infrarrojo (excluyendo las líneas de absorción de agua, por ejemplo, para aplicaciones oftalmológicas). Se proporciona selectividad adicional para células diana mediante el uso de una longitud de onda de láser apropiada. Por ejemplo, cuando se aplican los nuevos métodos a tejido de la retina, puede evitarse la absorción fortuita por la hemoglobina en los vasos de la retina seleccionando una longitud de onda de 1064 nm para destruir células diana que contienen melanina; esta longitud de onda se absorbe por la melanina, pero no por la hemoglobina.

Dentro del ojo, hay varios tipos de células pigmentadas, que pueden estimularse ventajosamente cuando está clínicamente indicado. Estas células adquieren pigmento o bien sintetizando melanina endógenamente o bien mediante fagocitosis de pigmento exógeno. Los tipos de células que sintetizan y retienen melanina incluyen las células epiteliales pigmentadas de la retina, el cuerpo ciliar y el iris, así como melanomas oculares.

Aunque las células del retículo trabecular (TM) no pueden sintetizar melanina, estas células adquieren normalmente pigmento mediante fagocitosis a partir del humor acuoso, que normalmente contiene partículas de residuos celulares pigmentados. Además, en algunas realizaciones, la pigmentación de células del TM puede aumentarse añadiendo pigmento al humor acuoso, por ejemplo, inyectando una suspensión de partículas pigmentadas en la cámara anterior del ojo con una aguja fina. A medida que el humor acuoso con partículas de pigmento suspendidas fluye desde el ojo a través del TM, las células del TM captan pigmento, aumentando su densidad óptica con respecto a tejido circundante no pigmentado, y mejorando la selectividad celular de la estimulación por láser de las células. En algunas realizaciones, se introduce melanina en el humor acuoso mediante iridotomía por láser del iris, que libera partículas de melanina a partir de células del iris al interior del humor acuoso. Pueden introducirse otros pigmentos, tales como tinta de la India o cualquier otro colorante particulado insoluble, no tóxico, en células diana fagocíticas antes de la irradiación por láser para estimular las células pigmentadas. En general, cuanto mayor es el nivel de pigmentación, menor es la fluencia requerida para alcanzar la fotoestimulación.

Dentro de los ojos, las células diana pigmentadas pueden estar sobre la superficie de la córnea o la conjuntiva, dentro de la córnea o conjuntiva, o pueden constituir o estar fijadas a cualquiera de las regiones intraoculares del ojo, tales como la córnea interior, el iris, el cuerpo ciliar, el cristalino, el humor vítreo, el coroides, la retina, el nervio óptico, vasos sanguíneos oculares o la esclerótica. Específicamente, las enfermedades y los estados que pueden tratarse mediante fotoestimulación incluyen degeneración macular relacionada con la edad y cualquier otro trastorno de la retina que implica la degeneración o muerte de células epiteliales de la retina.

Los ejemplos descritos en el presente documento explican el uso de la fotoestimulación cuando se regenera el epitelio de la retina en el ojo, sin embargo puede usarse el mismo enfoque para fomentar la reparación y regeneración de otro tejido, tal como piel, músculo o paredes de vasos sanguíneos, o cualquier tejido en el que las células están selectivamente pigmentadas, y/o pueden pigmentarse selectivamente. Por tanto, los métodos descritos en el presente documento son útiles para tratar cualquier enfermedad o trastorno en la que la proliferación y/o migración de células pigmentadas es beneficiosa.

En general, se pretende que el término tratamiento incluya cualquier terapia de fotoestimulación aplicada a tejido, por ejemplo, tejido de mamífero, sin provocar fotocoagulación y sin provocar daño significativo al, o muerte celular en el, tejido tratado. Los pacientes que pueden tratarse mediante los nuevos métodos descritos en el presente documento incluyen seres humanos, así como primates no humanos, ovejas, caballos, ganado, cabras, cerdos, perros, gatos, conejos, cobayas, hámsteres, jerbos, ratas y ratones.

Métodos de tratamiento de la degeneración macular

10

15

20

25

30

35

50

55

La figura 2 ilustra etapas en los nuevos métodos de fotoestimulación selectiva, por ejemplo, según se aplican para tratar enfermedades del ojo, por ejemplo, para la degeneración macular, específicamente, degeneración macular relacionada con la edad. La selección del área de tejido que va a irradiarse se basa en el estado del epitelio pigmentado de la retina degenerada de la mácula, lo que puede evaluarse al comienzo de la sesión de tratamiento usando una lámpara de hendidura convencional. Entonces, se irradia el área de tejido seleccionada o bien manual o bien automáticamente con luz con los parámetros apropiados, por ejemplo, luz de láser con una longitud de onda de 590 nm, una duración de pulso de aproximadamente 1-5 µs y fluencia de láser de menos de 130 mJ/cm².

La separación temporal entre pulsos sucesivos en una secuencia de pulsos puede afectar a la fluencia subletal. Por ejemplo, una separación temporal corta puede provocar un efecto acumulativo en la interacción de los pulsos con las células, reduciendo así la fluencia subletal. En algunas realizaciones, las secuencias de pulsos incluyen, por ejemplo, 10-100 pulsos a una tasa de repetición de aproximadamente 500 Hz (por ejemplo, separaciones de pulsos de desde menos de 1 ms hasta varios cientos de ms). La fase de cicatrización, por ejemplo, entre sesiones de tratamiento, puede prolongarse a lo largo de una o más horas, un día, unos pocos días o unas pocas semanas.

Métodos de cicatrización de heridas

La terapia de fotoestimulación selectiva también puede aplicarse para cicatrizar heridas de diversos tejidos. Específicamente, si tejido que contiene (o se trata para contener) un pigmento o cromóforo particular está dañado, puede inducirse un aumento de la reparación tisular mediante fotoestimulación subletal. Las heridas pueden estar provocadas, por ejemplo, por interacción mecánica con el tejido durante una cirugía o mediante algún traumatismo, por ejemplo, un accidente. Entonces, la selección del área de tejido puede basarse en el grado de tejido dañado. El área de tejido seleccionada se irradia o bien manual o bien automáticamente con luz de láser con los parámetros apropiaos.

15 Métodos de fotocoagulación seguida por fotoestimulación combinadas

Un ejemplo específico de daño de tejido inducido por láser en el ojo es la cirugía por láser, por ejemplo, coagulación por láser del ojo. Como efecto secundario de la cirugía por láser, pueden dañarse áreas, por ejemplo, de la retina. Para fomentar la cicatrización y aumentar la migración de tejido sano desde áreas circundantes, puede aplicarse fotoestimulación selectiva en relación con la cirugía por láser. Por ejemplo, o bien inmediatamente tras la fotocoagulación, o bien en una sesión posterior, por ejemplo, unas pocas horas o uno o más días o una semana, tras la cirugía por láser, se irradia el tejido coagulado y las áreas de tejido adyacentes al tejido coagulado en una sesión de tratamiento separada con fluencia subletal para aumentar la proliferación y la migración del epitelio y acelerar la cicatrización tras la cirugía.

#### **Ejemplos**

10

20

30

35

40

50

55

La invención se describe además en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrito en las reivindicaciones.

Materiales y métodos experimentales

En los siguientes experimentos, los parámetros de irradiación por láser (usando un láser de colorante pulsado de Palomar Medical Inc. que emite a 590 nm con un diámetro de 1 mm) incluyeron: 5,0 mJ/cm² - 2550 mJ/cm² de exposición a radiación por láser, 1 μs de duración y 200 puntos por placa de 3,5 cm de diámetro. Los puntos de exposición a láser estaban separados una distancia de 2 mm. Se irradiaron cuatro placas de muestra por condición experimental. Se calculó la exposición a radiación por láser como la energía de pulso medida por un medidor de potencia dividida entre el área de punto.

Los resultados se presentan como media ± D.E., y n indica el número de muestras. Se realizaron comparaciones estadísticas usando pruebas de la t de Student y se consideró que p ≤0,05 era estadísticamente significativo.

Se pigmentaron artificialmente cultivos de células ARPE-19 adultas mediante incubación con melanina. Entonces se irradiaron las células a diversas exposiciones a radiación por láser usando un láser de colorante de un único pulso de 1 µs ajustado a 590 nm. Se evaluó la viabilidad de las células ARPE-19 adultas pigmentadas usando un ensayo de citotoxicidad de células vivas/muertas por fluorescencia. Se usaron modelos de regeneración celular y cicatrización de heridas *in vitro* para estudiar los efectos de la fotoestimulación/estimulación térmica posterior de irradiación por láser. Se evaluaron las expresiones de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y su receptor por las células ARPE-19 adultas en respuesta a la irradiación por láser mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR).

En general, se observaron los siguientes fenómenos: (1) la selección selectiva como diana de células del RPE pigmentadas no produjo daños térmicos a células no pigmentadas adyacentes incluso a una exposición a radiación por láser de 2550 mJ/cm²; (2) la exposición a irradiación por láser (< 120 mJ/cm²) potenció la proliferación y migración de células del RPE; y (3) la fotoestimulación selectiva aumentó las expresiones de PDGF, TGFβ1, bFGF, EGF, IGF, y sus receptores, VEGF, PEDF, y proteínas de choque térmico tras la irradiación por láser.

Por tanto, estos experimentos demuestran el tratamiento selectivo de células del RPE pigmentadas *in vitro*, así como la fotoestimulación/estimulación térmica de proliferación del RPE y mecanismos biológicos relacionados. Estos resultados pueden aplicarse en una modalidad de tratamiento para enfermedades de trastornos de la retina relacionados con RPE tales como degeneración macular relacionada con la edad. Los experimentos muestran una variación temporal en la expresión de factor de crecimiento en el RPE tras la fotoestimulación selectiva lo que sugiere que la cicatrización de heridas del RPE tras la fotoestimulación selectiva se regula por factores de crecimiento de una manera autocrina y estos factores de crecimiento funcionan en armonía para provocar la reparación de heridas.

#### Reactivos

10

20

25

30

35

Se obtuvieron medio de Eagle modificado por Dulbecco /F12 (DMEM/F12), suero bovino fetal (FBS), solución salina tamponada con fosfato (PBS), 100X disolución madre de penicilina-estreptomicina, y disolución madre de tripsina al 0,5%-EDTA al 0,02% de Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA). Se adquirió medio F-12K (modificación de Kaighn de F12 de Ham) de ATCC (Manasses, VA). Se obtuvieron melanina de sepia, urea, tiourea, CHAPS, DTE, EGTA y EDTA de Sigma-Aldrich Chemicals (St. Louis, MO). Se adquirieron inhibidores de proteasa de Roch Applied Science (Indianápolis, IN). Se obtuvo reactivo de ensayo de proteínas de Bradford de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). Se obtuvo el ensayo de viabilidad/citotoxicidad de células vivas/muertas por fluorescencia de Molecular Probes (Eugene, OR, EE.UU.). Se adquirió un kit de ELISA para factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)-BB de R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN). Se obtuvo el kit Nuclearspin® RNA II kit de Clontech Laboratories, Inc. (Mountain Vista, CA). Se adquirió un kit de primera cadena de SuperScriptTM III de Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA) y se adquirió un sistema principal de PCR de Promega (Madison, WI). Se obtuvieron dispositivos de filtro de centrífuga Microcon con un punto de corte de peso molecular de 3000 Dalton de Millipore (Billerica, MA).

#### 15 Colección de medios condicionados

Se hicieron crecer células ARPE-19 pigmentadas hasta después de la confluencia para ganar quiescencia. Se irradiaron células ARPE-19 pigmentadas mediante láser de colorante pulsado a diferentes fluencias de láser en PBS. Inmediatamente después de la irradiación por láser, se usó medio de cultivo celular con FBS al 1% para sustituir a la PBS. Se incubaron células irradiadas a 37°C, el 5% de CO<sub>2</sub>. Se recogió medio condicionado 48 horas tras la irradiación por láser.

#### Ejemplo 1 - Potenciación del contenido de melanina en células

Células ARPE-19 pigmentadas y no pigmentadas mixtas

Se hicieron crecer células ARPE-19 humanas en dos matraces correspondientes (75 cm²) hasta la confluencia tal como se describió anteriormente. Uno de los matraces se alimentó con melanina durante 20 horas, y posteriormente se lavó con PBS. Entonces se tripsinizaron (tripsina al 0,5%-EDTA al 0,02%) los cultivos de células ARPE-19 (no pigmentadas y pigmentadas) durante 10 minutos. Se recuperaron las suspensiones de células ARPE-19 mediante centrifugación (500 rpm durante 5 minutos), y volvieron a suspenderse en medio. Se combinaron las dos suspensiones de células y se mezclaron exhaustivamente, proporcionando una suspensión de una mezcla 1:1 de células no pigmentadas y células pigmentadas. Volvió a sembrarse en placa inmediatamente la suspensión de células mixta en una placa de 35 mm a la densidad confluente, se incubó durante 24 horas para permitir la formación de una lámina de células continua y después se irradió.

Evaluación del contenido de melanina en células del RPE pigmentadas

Se desprendieron células cultivadas con 1 ml de tripsina al 0,25% con EDTA al 0,02% (10 minutos a 37°C). Se retiró una alícuota (50 μl) y se contaron las células usando un hemocitómetro. Se centrifugó la suspensión de células restante y se disolvió el sedimento en NaOH 1 N. Se determinó la concentración de melanina mediante medición de la absorción a 475 nm y después se comparó con una curva patrón obtenida usando melanina sintética.

#### Ejemplo 2 - Fotoestimulación selectiva de células del RPE

Cultivo de células del RPE y fagocitosis de melanina

Los experimentos descritos en el presente documento se realizaron usando células del epitelio pigmentado de la retina humano (ARPE-19) de tercer, cuarto y quinto pase. Se cultivaron células ARPE-19 (obtenidas de la ATCC) en medio de Eagle modificado por Dulbecco /F12 (1:1) con suero bovino fetal al 10%, penicilina-estreptomicina al 1% a 37°C, en una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>/resto de aire. Las células se cultivaron en placas de cultivo tratado de cultivo tisular de 3,5 cm de diámetro. Las células ARPE-19 no están pigmentadas en su estado de crecimiento normal y sirven como células del RPE no pigmentadas de control.

Para obtener células ARPE-19 pigmentadas, se incubaron cultivos de células ARPE-19 confluentes durante 20 horas con diversas concentraciones de melanina de sepia tal como se describió anteriormente. Antes de la incubación, se lavó la melanina de sepia con medio de cultivo de células del RPE y se sonicó para obtener una suspensión uniforme. Justo antes de la irradiación, se sustituyó el medio por PBS para evitar la absorción de energía de láser por el medio y se sustituyó la PBS por medio convencional tras la irradiación por láser.

#### 50 Selección selectiva como diana de células pigmentadas

Aunque las células no pigmentadas parecen no absorber la irradiación por láser, la energía térmica absorbida por células pigmentadas puede potencialmente dañar a las células no pigmentadas vecinas. En la figura 3, las curvas de ajuste representan los ajustes lineales de mínimos cuadrados de los datos experimentales con los siguientes parámetros de regresión (a=pendiente; b=ordenada; umbral=intersección con la línea de viabilidad al 100%;

r=coeficiente de regresión); contenido de melanina de 0,03 mg/mg de proteína: a=0,99; b=-9,8x10-4; r=0,98; umbral=1140 mJ/cm²; contenido de melanina de 0,05 mg/mg de proteína: a=1,05; b=-1,1x10-3; r=0,98; umbral=460 mJ/cm²; (y=ax+b); los valores de P mostrados son comparaciones con células no pigmentadas.

Para evaluar la selectividad del tratamiento con láser, se analizaron sus efectos sobre poblaciones celulares mixtas de células ARPE-19 pigmentadas y no pigmentadas usando una alta exposición a radiación por láser (1100 mJ/cm²). Esta exposición a radiación por láser corresponde al 50% de viabilidad para células del RPE incubadas previamente en un contenido de melanina de 0,03 mg/mg de proteína. Los resultados de selección selectiva como diana de células ARPE-19 pigmentadas no mostraron ningún daño asociado en sus células no pigmentadas adyacentes. Sólo se destruyeron selectivamente las células ARPE-19 dentro de la zona de irradiación que contenía melanina, mientras que las células ARPE-19 no pigmentadas adyacentes no mostraron evidencias de daño celular. La viabilidad de las células ARPE-19 pigmentadas fue de aproximadamente el 50%, lo que fue significativamente inferior a la de las células ARPE-19 no pigmentadas, que fue del 100% (p < 0,001, n = 6). Inmediatamente después de la irradiación por láser, el daño a las células ARPE-19 que contenían pigmentos fue tan sutil que solo mediante microscopía de contraste de fase era difícil diferenciar morfológicamente las células afectadas de las no afectadas.

15 Estos resultados respaldan que las células ARPE-19 que contienen melanina pueden seleccionarse selectivamente como diana sin daño colateral significativo a las células ARPE-19 no pigmentadas adyacentes a los niveles de exposición a radiación por láser de hasta aproximadamente 1100 mJ/cm².

#### Ejemplo 3 - Ensayos de viabilidad y proliferación celular

5

10

30

35

40

Se sembraron células ARPE-19 en placas de 96 pocillos a una densidad de 1000 células/pocillo en medio condicionado recogido 48 horas tras la irradiación por láser. Se cambió el medio de cultivo celular dos veces por semana. Se evaluó la proliferación celular mediante un ensayo colorimétrico con bromuro de dimetiltiazol-difeniltetrazolio (MTT). Para el análisis se retiró el medio de cultivo y se añadieron 100 µl de PBS que contenía 10 µl de MTT (5 mg/ml) a cada pocillo. Entonces se incubaron las células a 37°C durante 3 horas. Se terminó la reacción añadiendo HCl 0,04 N en isopropanol. Entonces se determinó la absorbancia del medio usando un lector de ELISA a 570 y 630 nm. Las diferencias entre la absorbancia a las dos longitudes de onda sirvieron como estimación de la viabilidad celular. Se repitieron experimentos individuales al menos tres veces usando tres repeticiones para cada experimento.

Viabilidad celular de células del RPE pigmentadas tras irradiación por láser

Se evaluó la viabilidad de células ARPE-19 pigmentadas usando un ensayo de viabilidad/citotoxicidad de células vivas/muertas por fluorescencia. El ensayo de viabilidad/citotoxicidad de células vivas/muertas por fluorescencia usa homodímero de etidio y calceína-AM, que localizan células muertas y vivas, respectivamente. Se prepararon disoluciones de ensayo según el protocolo recomendado del fabricante. En resumen, se aplicaron 200 μl de la disolución (calceína-AM 2,0 μM y homodímero de etidio-1 4,0 μM en PBS) a cada placa de cultivo celular. Se incubó el cultivo durante 20 minutos a 37°C, y después se analizó usando microscopía de fluorescencia (Zeiss Axiovert 200M, Carl Zeiss MicroImaging, Inc.).

Se distinguieron células vivas mediante la presencia de actividad esterasa intracelular ubicua, determinada mediante la conversión enzimática de calceína-AM que penetra en la célula prácticamente no fluorescente en la calceína intensamente fluorescente. El colorante de calceína polianiónico se conserva bien dentro de células vivas, produciendo una intensa fluorescencia verde uniforme (excitación/emisión ~495 nm/515 nm). El homodímero de etidio-1 (EtD-1) entra en las células con membranas dañadas y experimenta una potenciación de 40 veces de fluorescencia tras unirse a ácidos nucleicos, produciendo así una fluorescencia roja brillante en células muertas (excitación/emisión ~495 nm/635 nm). Se excluye EtD-1 por la membrana plasmática intacta de células vivas. Se midió la viabilidad celular como un promedio de 3 puntos irradiados (de 440 µm de diámetro) divididos entre puntos no irradiados en la misma placa. Se tomaron imágenes en ajustes idénticos de ganancia y exposición.

Haciendo referencia a la figura 3, a una exposición a radiación por láser de 5 mJ/cm², la tinción citoplasmática demostró que no había lesión celular obvia en células del RPE pigmentadas. Cuando se aumentó la exposición a radiación por láser hasta 30 mJ/cm², aparecieron unas pocas células muertas con la tinción nuclear roja. Con el aumento de la exposición a radiación por láser, se observaron cada vez más células muertas con la tinción nuclear roja. A la mayor exposición a radiación por láser de 2550 mJ/cm² todas las células con un nivel de melanina de 0,03 mg/mg de proteína (■) y dentro del tamaño de punto de láser se dañaron o destruyeron. Para los controles simulados, que consistían en células irradiadas sin melanina (perfil superior en la figura 3 (◆)), el ensayo de citotoxicidad con fluorescencia no mostró evidencias de lesión celular usando una exposición a radiación incluso a 2550 mJ/cm². Todas las células con la mayor concentración de melanina de 0,05 mg/mg de proteína (A) estaban muertas a una fluencia de aproximadamente 900 mJ/cm².

Para la cuantificación de la viabilidad de las células del RPE pigmentadas tras la irradiación por láser, se usó el área objetivo dentro de un radio de tamaño de punto de láser para contar las células vivas/muertas para evaluar la viabilidad celular como función de la exposición a radiación por láser así como del contenido de melanina. La viabilidad de células ARPE-19 pigmentadas se definió como la razón de intensidad fluorescente verde. Esta razón se

calculó mediante la intensidad fluorescente verde dentro del tamaño de punto de láser tras la irradiación por láser, dividida entre aquella dentro de un tamaño de punto similar sin irradiación por láser. Se demostró la viabilidad celular como función de la exposición a radiación por láser y del contenido de melanina de las células del RPE.

En general, cuanto mayor es la exposición a radiación por láser, más células pigmentadas se seleccionan como diana. Con el aumento del contenido de melanina, este intervalo crítico de exposición a radiación por láser disminuyó. Por tanto, el contenido de melanina desempeñó un papel significativo durante la radiación por láser.

#### Ensayo de BrdU

5

10

15

20

30

35

40

45

50

55

Se sembraron células ARPE-19 pigmentadas en placas de 35 mm en medio libre de suero, medio F-12K, durante 24 horas. Se irradiaron las células en PBS. Se complementó PBS con medio de cultivo celular tras la irradiación por láser. Seis horas después, se añadió BrdU 10 μM a medio de cultivo celular y se incubó durante la noche a 37°C. Se fijaron las células con etanol al 70% durante 45 minutos a temperatura ambiente y se incubaron con HCl 4 M durante 20 minutos a temperatura ambiente. Entonces, se permeabilizaron las células con Tritox X-100® al 0,2% durante 15 minutos a temperatura ambiente y se desnaturalizó el ADN genómico añadiendo 1 ml/placa de tampón de bloqueo (PBS/FBS al 10%) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 10 μl de disoluciones madre de anticuerpo anti-BrdU-Alex594 y se incubaron durante 60 minutos a 37°C. Entonces se lavaron las células tres veces. Se evaluó la intensidad de fluorescencia mediante microscopía de fluorescencia a una longitud de onda de 594 nm. Las intensidades de fluorescencia de muestras irradiadas por láser se cuantifican mediante software METAMORPH® y se normalizan mediante la intensidad de fluorescencia de control simulado.

Para determinar la respuesta de proliferación de células del RPE pigmentadas frente a la irradiación, se cuantificó la incorporación de BrdU 6 horas tras la irradiación por láser. La tinción con BrdU demostró una proliferación significativamente potenciada de células del RPE pigmentadas expuestas a irradiación por láser subletal tal como se muestra en las figuras 6A-6E. La figura 6A muestra una imagen de control simulado. Además, las muestras irradiadas con láser a una fluencia de láser de 28 mJ/cm² (figura 6B), a 55 mJ/cm² (figura 6C) y a 110 mJ/cm² (figura 6D). La barra de escala es de 200 μm. Las comparaciones de valores de p se refieren a control simulado N=3.

#### 25 Ejemplo 4 – Ensayos de regeneración celular

Regeneración celular tras irradiación por láser

Se sembró una cantidad de 1,0X10<sup>6</sup> células ARPE-19, se hicieron crecer hasta confluencia en la que hay proliferación mínima y se alimentaron con melanina tal como se describió anteriormente. Se irradiaron las células en PBS. Inmediatamente tras la irradiación, se usó el medio con FBS al 1% para sustituir a PBS. Se usó el suero de porcentaje bajo para limitar las proliferaciones celulares. Se recogió el medio condicionado 48 horas tras la irradiación por láser. Tras tres sesiones de irradiación por láser, se usó el medio con FBS al 20% para realizar un seguimiento del proceso de regeneración celular inducida por láser. Se manipularon los controles de manera similar sin irradiación por láser. Se adquirieron las imágenes de los campos de visión con un aumento de 10X usando un microscopio invertido (Axiovert® 200 M, Zeiss, EE.UU.) con una cámara digital (AxioCam® MRm, Zeiss, EE.UU.). Se cuantificaron manualmente los números de células durante las regeneraciones celulares *in vitro* para cada campo de visión. Se escogieron tres campos al azar para la cuantificación.

Regeneración de células del RPE tras la irradiación por láser

Tras la irradiación por láser, se sustituyó PBS por el medio de cultivo celular que contenía FBS al 1%. Después se expusieron las células a la irradiación por tratamiento con láser cada dos días durante un total de tres tratamientos. En el día 6, se complementó el medio de cultivo celular con FBS al 20% y se cultivaron las células durante 11 días adicionales (desde el día 6 hasta el día 17) para realizar un seguimiento de la regeneración celular. Las células ARPE-19 que se sometieron a este procedimiento, sin tratamiento con láser (control simulado), demostraron una escasa regeneración tras 11 días de tratamiento con suero. Por otro lado, las células ARPE-19 expuestas a la irradiación por láser de baja potencia demostraron una buena regeneración tras cambiar a un medio de cultivo celular con FBS al 20%.

Las figuras 4A a 4H ilustran la regeneración de célula del RPE tras la irradiación por láser. La figura 4A muestra células confluentes antes de la irradiación por láser. Las figuras 4B a 4G muestran las imágenes en fase de células ARPE-19 en los controles simulados, tras tres sesiones de irradiación por láser, y las regeneraciones posteriores en el medio de cultivo celular con FBS al 20% tras la irradiación por láser. En particular, la figura 4A muestra una imagen en fase de células ARPE-19 confluentes antes de la irradiación por láser; la figura 4B muestra una imagen de control simulado en el día 6; la figura 4C muestra una imagen de control simulado en el día 17; la figura 4D muestra una imagen de células ARPE-19 irradiadas a 27 mJ/cm² en el día 6; la figura 4E muestra una imagen de células ARPE-19 irradiadas a 110 mJ/cm² en el día 17. La figura 4F muestra una imagen de células ARPE-19 irradiadas a 110 mJ/cm² en el día 17.

La figura 4H ilustra el número de células por campo como función del tiempo. La barra de escala es de 100 µm y los valores de p son para comparaciones con controles simulados. Específicamente, la figura 4H muestra los números

de células como función de exposiciones a radiación por láser y el día durante experimentos de regeneración celular *in vitro*. Para el control simulado, el número de células disminuyó significativamente hasta menos de 50 por campo de visión en el día 6, y no aumentó significativamente 11 días tras cambiar el medio a FBS al 20%. Esta disminución reflejó posiblemente la citotoxicidad de melanina sometida a endocitosis, lo que también se había notificado anteriormente. Las muestras irradiadas por láser a la exposición a radiación por láser de 27 mJ/cm² parecieron estar morfológicamente bien en el día 6, y el número de células no disminuyó significativamente después de eso (p = 0,003 en comparación con los controles simulados, n = 3). Para las muestras irradiadas por láser a la exposición a radiación por láser de 110 mJ/cm², el número de células disminuyó inicialmente, pero después aumentó significativamente hasta el día 17 tras cambiar al medio de cultivo complementado con FBS al 20% (p = 0,004 en comparación con los controles simulados, n = 3).

#### Ejemplo 5 – Ensayos de cicatrización de heridas

Ensayos de cicatrización de heridas in vitro

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Se cultivaron células ARPE-19 pigmentadas hasta después de la confluencia, en la que hay una proliferación mínima, tal como se describió anteriormente. Para estimular un entorno de herida, se realizaron líneas suavemente en monocapas confluentes usando una punta de pipeta de 1 ml. Este procedimiento realiza un carril uniforme que está carente de células. Entonces se incubaron las células a 37°C durante 30 minutos antes de irradiarse. Se sustituyó el medio de cultivo por PBS durante la duración de la irradiación por láser. Tras la irradiación por láser, se sustituyó PBS por medio de cultivo con FBS al 1%. El propósito de cambiar el FBS del 10% al 1% es limitar la proliferación de células del RPE. Se sustituyó el medio cada 48 horas, y se sometieron los cultivos a irradiación por láser cada 48 horas. Se evaluaron los cambios en las morfologías de células ARPE-19 normales y con heridas mediante microscopía óptica. Se contó el número de células durante el procedimiento.

La irradiación por láser subletal fomenta la respuesta de cicatrización de heridas

El daño a la capa de células del RPE es una parte importante de la degeneración macular. En este caso, se realizaron intentos de distinguir si la irradiación por láser subletal puede estimular la recuperación del RPE tras la lesión. Con un modelo de ensayo de raspado convencional, se comparó la respuesta de cicatrización de células irradiadas y no irradiadas tal como se muestra en las figuras 5A a 5E.

Las figuras 5A a 5E muestran imágenes en fase de cicatrización de heridas *in vitro*. En particular, la figura 5A muestra un modelo de raspado antes de la irradiación por láser. La figura 5B muestra una imagen de control simulado 3 días tras la lesión de heridas. La figura 5C muestra cultivos celulares irradiados a 27 mJ/cm² tras 3 días de lesión de heridas. La figura 5D muestra un cultivo celular irradiado a 110 mJ/cm² tras 3 días de lesión de heridas. La figura 5E muestra el número de células por campo (el campo es el centro de la herida, el área de herida es de aproximadamente 2 mm²) como función del día. La barra de escala es de 100 µm y el valor de p se refiere a comparaciones con controles simulados respectivos.

El número de células como función de la exposición a radiación por láser y el día durante el ensayo de cicatrización de heridas *in vitro* se representan en la figura 5E. Los márgenes de cicatriz permanecieron claramente definidos en el control simulado no irradiado (figura 5B) incluso tras 3 días de cultivo. En cambio, las células ARPE-19 pigmentadas que se trataron con irradiación por láser a niveles de energía que variaron desde 27 mJ/cm² hasta 110 mJ/cm² mostraron un aumento en la densidad celular (p = 0,001 en comparación con los controles simulados, n = 3) alrededor del margen de herida y presentaron una mayor tasa de migración y proliferación celular a través de la herida en un intento por cerrar la región de herida (figuras 5C y 5D). Sin embargo, las células no pigmentadas no se vieron afectadas por la irradiación por láser (datos no mostrados).

## Ejemplo 6 – Ensayo de estimulación con factores de crecimiento

Aislamiento de ARN y RT-PCR

Se hicieron crecer células ARPE-19 hasta posconfluencia, cuando hay una proliferación mínima, tal como se mencionó anteriormente. Se sembraron las células ARPE-19 pigmentadas en placas de 35 mm en el medio libre de suero F-12K durante 24 horas. Se irradiaron las células en PBS. Se complementó el PBS con F-12K tras la irradiación con láser. Se extrajo el ARN total de las células ARPE-19 pigmentadas cultivadas 8 horas tras la irradiación con láser según el protocolo del fabricante. Se realizó transcripción inversa sobre 10 ng de ARN total usando el sistema de preamplificación First Strand SUPERSCRIPT® para la síntesis de ADNc de primera hebra con cebadores de oligo(dT)20 según el protocolo del fabricante. Se añadieron cinco microlitros de ADNc a la mezcla de PCR en un volumen final de 50 μl que contenía KCI 50 mM, Tri-HCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM y 10 mM cada uno de los dNTP y 1 U de ADN polimerasa termoestable de *Thermus brockianus* (Promega, EE.UU.). Se usaron los siguientes parámetros de ciclo de PCR durante 40 ciclos: desnaturalización inicial durante 2 minutos a 95°C, apareamiento a 55°C durante 1 minuto; polimerización a 72°C durante 1 minuto; seguido por una extensión final a 72°C durante 2 minutos

Se realizaron las reacciones de RT-PCR paralelas sin transcriptasas inversas para cada muestra para confirmar que los productos de PCR resultaban de ADNc en vez de ADN genómico. Se usó actina β como producto génico

expresado de manera constitutiva para la comparación de la abundancia de ARNm de PDGF y receptor de PDGF entre las muestras. Se analizaron entonces todos los productos con electroforesis en gel de agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio, y se exploraron de manera densitométrica las bandas resultantes. Los cebadores 5' y 3' específicos para PDGF-A, PDGF-B, PDGFR- $\alpha$  y PDGFR- $\beta$  se obtuvieron comercialmente.

5 Expresión de PDGF y su ARNm de receptor en células del RPE pigmentadas

10

15

20

40

45

50

Se evaluaron los niveles de ARNm de cadenas de PDGF-A y B, y receptores de PDGF  $\alpha$  y  $\beta$  en células ARPE-19 pigmentadas con y sin irradiación con láser. Se usó el ARN total extraído de las células durante 8 horas tras tales tratamientos para la determinación de los niveles de ARNm mediante análisis de RT-PCR. Las células ARPE-19 expresaban de manera constitutiva ARNm de PDGF-A y B, y receptores  $\alpha$  y  $\beta$  tal como se ilustra en la figura 7, que muestra un análisis de RT-PCR de PDGFA, PDGFB, PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$  en células del RPE irradiadas con láser y control simulado.

Las expresiones de PDGF-A, B, y receptores  $\alpha$  y  $\beta$  aumentó mediante la irradiación con láser a 55 mJ/cm² y 110 mJ/cm² en comparación con los controles simulados. Se confirmó la identidad de los productos de reacción de tamaño esperado mediante electroforesis en gel de agarosa. No se obtuvieron productos de PCR en ausencia de transcriptasa inversa, lo que indica que ARN en vez de ADN genómico sirvió como molde.

Expresión génica de factores de crecimiento, sus receptores y proteínas de choque térmico

La expresión de PDGFA, PDGFB y sus receptores se regulaba por incremento tras la fotocoagulación selectiva. El nivel de PDGFA era 1,35 $\pm$ 0,005 (P = 4,57E-08, n = 3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 2,11  $\pm$  0,09 (P = 6,92E-05, n = 3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a 8 horas, entonces disminuyó hasta 1,12  $\pm$  0,04 (p = 0,028, n = 3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,41  $\pm$  0,04 (p = 0,0008) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 24 horas, hasta 1,12 $\pm$ 0,13 (p = 0,28, n = 3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,28  $\pm$  0,22 (p = 0,15, n = 3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 2 semanas tras la fotocoagulación con láser.

El nivel de expresión del receptor de PDGFα era 1,08±0,03 (P=0,044, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,60±0,17 (P=0,033, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 8 horas, entonces disminuyó hasta 1,31±0,08 (P=0,005, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,76±0,03 (P=5,39E-06, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 24 h, hasta 1,22±0,22 (P=0,21, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,73±0,03 (P=5,96E-06, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 2 semanas tras la fotocoagulación con láser.

30 El nivel de PDGFB era 1,22±0,02 (P=4,94E-05, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,44±0,11 (P=0,005, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 8 horas, entonces aumenta un poco hasta 1,22±0,02 (P=0,0009, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,45±0,03 (P=0,0001) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 24 horas, hasta 1,24±0,32 (P=0,28, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,85±0,05 (P=1,38E-05, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 2 semanas tras la fotoestimulación con láser.

El nivel de expresión de receptor de PDGFβ era 1,28±0,03 (P=9,65E-05, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,60±0,06 (P=0,033, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 8 horas, entonces aumentó hasta 1,80±0,17 (P=0,003, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 2,97±0,19 (P=0,001, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 24 h, hasta 2,04±0,2 (P=0,002, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 3,00±0,03 (P=1,87E-07, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 2 semanas tras la fotoestimulación con láser. (Figura 8A)

El nivel de expresión de TGF-β1 era 1,40±0,29 (P=0,116, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 2,38±0,11 (P=6,67E-05, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 6 horas, entonces disminuyó hasta 1,07±0,01 (P=0,002, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,85±0,05 (P=0,0001) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 24 horas, hasta 1,11±0,06 (P=0,06, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,31±0,07 (P=0,004, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 2 semanas tras la fotoestimulación con láser.

El nivel de expresión de receptor de TGF era 1,53±0,15 (P=0,0075, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 2,05±0,09 (P=6,39E-05, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 6 horas, entonces disminuyó hasta 1,1±0,14 (P=0,4, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 2,02±0,08 (P=5,61E-05, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 24 horas, hasta 1,85±0,05 (P=0,37, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,5±0,11 (P=0,003, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 2 semanas tras la fotoestimulación con láser. (Figura 8B).

La expresión de bFGF era 1,54±0,23 (P=0,029, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,93±0,18 (P=0,002, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 6 horas, entonces disminuyó hasta 1,08±0,02 (P=0,003, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,23±0,02 (P=0,0001, n=3) (fluencia de láser de

110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 24 horas, hasta 1,0±0,04 (P=0,725, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,04±0,03 (P=0,191, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 2 semanas tras la fotoestimulación con láser.

- El nivel de expresión de receptor de FGF era 1,73±0,015 (P=0,00043) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 2,72±0,42 (P=0,055) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 6 horas, entonces disminuyó hasta 1,27±0,01 (P=2,11E-06, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,46±0,12 (P=0,006, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 24 horas, hasta 1,0±0,035 (P=0,42, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,24±0,01 (P=0,0017, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 2 semanas tras la fotoestimulación con láser (figura 8B).
- La expresión génica de IGF-1 también había aumentado a las 6 horas, entonces disminución a las 24 horas hasta 2 semanas. Por tanto, el nivel era 1,39±0,10 (P=0,005, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,86±0,18 (P=0,0027, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 6 horas, entonces disminuyó hasta 1,25±0,18 (P=0,125, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,56±0,85 (P=0,097, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 24 horas, hasta 1,0±0,04 (P=1, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,31±0,17 (P=0,061, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 2 semanas tras la fotoestimulación con láser.
  - El nivel de expresión de receptor de IGF1 era 1,22±0,11 (P=0,044, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 2,27±0,24 (P=0,0016, n=3) veces el nivel del control simulado, disminuyó hasta 1,05±0,13 (P=0,75, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,51±0,12 (P=0,048, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 24 horas, entonces disminuyó hasta 1,0±0,04 (P=1, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,18±0,16 (P=0,193, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 2 semanas tras la fotoestimulación con láser. (Figura 8B)

20

45

50

- La expresión génica de IGF-2 también había aumentado a las 6 horas, entonces disminuyó a las 24 horas y se mantuvo casi constante a las 2 semanas. Por tanto, el nivel era 1,27±0,12 (P=0,033, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,73±0,09 (P=0,00039, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 6 horas, entonces disminuyó hasta 1,13±0,06 (P=0,106, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,65±0,10 (P=2,23E-07, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces a las 24 horas, hasta 1,07±0,07 (P=0,212, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,21±0,05 (P=0,004, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces a las 2 semanas tras la fotoestimulación con láser.
- 30 El nivel de expresión de receptor de IGF2 era 1,39±0,22 (P=0,064, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 2,62±0,21 (P=0,006, n=3), disminuyó hasta 1,29±0,05 (P=0,024, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,89±0,10 (P=0,011, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 24 horas, entonces disminuyó hasta 1,0±0,02 (P=0,71, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,41±0,32 (P=0,142, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) a las 2 semanas tras la fotoestimulación con láser. (Figura 8B)
- La expresión génica de EGF había aumentado a las 6 horas, 24 horas, entonces disminuyó a las dos semanas. Por tanto, el nivel era 1,17±0,06 (P=0,014, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,53±0,07 (P=0,00042, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 6 horas, entonces aumentó hasta 1,57±0,37 (P=0,092, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 2,45±0,14 (P=0,00012, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 24 horas, hasta 1,07±0,05 (P=0,131, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 2,17±0,39 (P=0,0014, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 2 semanas tras la fotoestimulación con láser.
  - El nivel de expresión de receptor de EGF era 1,11±0,02 (P=0,0013, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,89±0,21 (P=0,004, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 6 horas, entonces disminuyó hasta 1,11±0,005 (P=5,9E-06, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,67±0,09 (P=0,00053, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 24 horas, hasta 1,10±0,14 (P=0,358, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,48±0,01 (P=6,46E-07, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) el nivel del control simulado a las 2 semanas tras la irradiación con láser. (Figura 8B)
  - La expresión génica de VEGF había aumentado también ligeramente a las 6 horas, entonces disminuyó gradualmente hasta un nivel inferior al del control simulado. Por tanto, el nivel era 1,58±0,12 (P=0,0024, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 2,14±0,20 (P=0,00134, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 6 horas, pero entonces bajó hasta 0,93±0,17 (P=0,65, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 0,89±0,09 (P=0,125, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 24 horas, hasta 0,90±0,02 (P=0,0027, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 0,89±0,08 (P=4,47E-05, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 2 semanas tras la fotoestimulación selectiva. (Figura 8B)
- Tras la fotoestimulación selectiva, se observó una regulación por incremento de factor derivado de epitelio pigmentario (PEDF) en las células ARPE-19 pigmentadas a las 6 horas, tras lo cual el nivel de PEDF disminuyó gradualmente. El nivel era 1,19±0,06 (P=0,008, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,59±0,33 (P=0,07, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 6 horas, entonces se redujo hasta

1,07±0,03 (P=0,025, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,3±60,07 (P=0,0032, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 24 horas, entonces hasta 1,06±0,026 (P=0,027, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,34±0,09 (P=0,005, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las dos semanas tras la irradiación con láser. (Figura 8B)

Debe indicarse que las proteínas de choque térmico Hsp27, Hsp70 y Hsp90 mostraban un aumento transitorio de la expresión a las 6 horas tras la fotoestimulación selectiva y entonces disminuyó gradualmente. Por tanto, el nivel de Hsp27 era 1,17±0,04 (P=0,00053, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,59±0,12 (P=0,0003, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 6, pero entonces bajó hasta 1,03±0,04 (P=0,364, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,25±0,123 (P=0,047, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 24 horas, hasta 1,05±0,033 (P=0,124, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,16±0,033 (P=0,00245, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 2 semanas tras la fotoestimulación selectiva.

El nivel de Hsp70 era 1,24±0,08 (P=0,01, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,42±0,03 (P=0,000053, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 6 horas, pero entonces bajó hasta 1,37±0,09 (P=0,006, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,82±0,25 (P=0,01, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 24 horas, hasta 1,17±0,14 (P=0,124, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,68±0,09 (P=0,0004, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 2 semanas tras la fotoestimulación selectiva.

15

45

50

El nivel de Hsp90 era 1,44±0,24 (P=0,06, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,97±0,21 (P=0,003, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 6 horas, pero entonces bajó hasta 1,08±0,04 (P=0,47, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,22±0,08 (P=0,02, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 24 horas, hasta 1,05±0,04 (P=0,118, n=3) (fluencia de láser de 55 mJ/cm²) y 1,18±0,06 (P=0,02, n=3) (fluencia de láser de 110 mJ/cm²) veces el nivel del control simulado a las 2 semanas tras la fotoestimulación selectiva. (Figura 8B)

Estos resultados demuestran que la fotostimulación selectiva aumentaba las expresiones de PDGF, TGFβ1, bFGF, EGF, IGF y sus receptores, VEGF, PEDF, y proteínas de choque térmico tras la irradiación con láser. Los factores de crecimiento regulan muchos de los procesos cruciales para la cicatrización de heridas normal. Por ejemplo, TGF-β es un quimioatrayente para células inflamatorias y promueve la deposición de matriz. PDGF, EGF y FGF promueven la proliferación de células del RPE. IGF-1 es un potente factor de supervivencia celular así como está fuertemente implicado en la patobiología de la neovascularización prerretiniana. Parece probable que estos factores de crecimiento funcionen en harmonía provocando la reparación de heridas. Los experimentos presentados muestran una variación temporal en la expresión de factores de crecimiento en el RPE tras la fotostimulación selectiva, de lo que se deduce que la cicatrización de heridas en el RPE tras la fotoestimulación selectiva está regulada por factores de crecimiento de una manera autocrina/paracrina. La regulación por incremento de factores antiangiogénicos tales como PEDF y Hsps tras la fotoestimulación selectiva debe contribuir a los efectos beneficiosos de la fotostimulación selectiva.

# Ejemplo 7: El tratamiento con láser pulsado subletal induce regeneración potenciada en células del epitelio pigmentario de la retina

Este ejemplo proporciona una evaluación de la respuesta biológica de células del epitelio pigmentado de la retina (RPE) fetal humano al tratamiento con láser pulsado para desarrollar un régimen de tratamiento con láser selectivo y seguro para lograr una regeneración mejorada del RPE.

Se aislaron células del epitelio pigmentado de la retina fetal humano (hfRPE) de ojos de fetos de 19 semanas de edad tal como se describe por Maminishkis *et al.*, "Confluent monolayers of cultured human fetal retinal pigment epithelium exhibit morphology and physiology of native tissue," Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 47(8):3612-24 (2006), y se cultivaron sobre portaobjetos de vidrio recubiertos con laminina durante 4 semanas hasta que alcanzaron la confluencia y se pigmentaron de color oscuro. Se trataron células del RPE fetal humano con un láser de colorante pulsado (Palomar 3010; 590 nm, 1 μs, 1 mm de diámetro). Se irradiaron las células con un láser de un único pulso a fluencias entre 50-700 mJ/cm² y se analizaron usando una tinción de células vivas/muertas fluorescente (Invitrogen, Carlsbad, CA) dos horas tras el tratamiento. Se usaron las imágenes fluorescentes de células teñidas para determinar el número de células vivas y muertas dentro del campo de irradiación usando el software METAMORPH® (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Para este ejemplo, se asignó que el nivel de energía láser que provocaba un 50% de muerte celular dentro de la zona de irradiación era el nivel de energía umbral y se definió la energía por debajo del umbral como el nivel de energía en el que no se observaba muerte celular. Se realizaron los experimentos a un nivel de energía que era el 70% de la energía por debajo del umbral. Se evaluó la respuesta de regeneración de células hfRPE tras el tratamiento con láser de un único pulso en un modelo de cicatrización de heridas de arañazos *in vitro*. Se analizó la expresión de factores de crecimiento mitogénicos tales como factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF) y factor de crecimiento similar a la insulina (IGF1 y IGF2) dos horas tras el tratamiento con láser mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-

PCR).

Usando el láser de colorante de un único pulso de 1-µs, se determinó que el nivel de energía umbral era de 496 mJ/cm² y se determinó que el nivel de energía por debajo del umbral era de 285 mJ/cm² para células del hfRPE. Se realizaron los experimentos a 200 mJ/cm² (el 70% de la energía por debajo del umbral). En el modelo de cicatrización de heridas *in vitro* de tipo arañazo, había un aumento de aproximadamente 20 veces en la proliferación de células del hfRPE tras la irradiación con láser de un único pulso en comparación con controles simulados. Además, tras el tratamiento con láser, la expresión de factores de crecimiento se reguló por incremento tal como sigue: bFGF (1,96 veces), IGF1 (4,6 veces), IGF2 (2,2 veces) y PDGF (0,14 veces), tal como se analiza mediante RT-PCR y densitometría.

Los resultados indican que el tratamiento con láser pulsado subletal de células del hfRPE estimula la expresión de factores mitogénicos a una proliferación potenciada en un modelo de cicatrización de heridas *in vitro*. El tratamiento con láser pulsado subletal focal del RPE conserva las células circundantes y puede usarse para mejorar la regeneración del RPE en enfermedades en las que está implicada degeneración del RPE.

#### Ejemplo 8 - Estudio de viabilidad de células del RPE usando diferentes láseres

Las figuras 9A y 9B muestran los resultados de un estudio de viabilidad de células del RPE fetal humano (hfRPE) tras administrar un único pulso con un láser de Nd:YAG (duración de pulso de aproximadamente 3 ns) y un láser de colorante pulsado (duración de pulso de aproximadamente 1 μs), respectivamente. Para el láser de YAG, los valores de viabilidad normalizados estaban a aproximadamente del 100% al 95% de viabilidad a una fluencia de hasta aproximadamente 100 mJ/cm², una viabilidad de más del 80% a una fluencia de hasta aproximadamente 200 mJ/cm² y una caída brusca de la viabilidad hasta por debajo del 70% a una fluencia de aproximadamente 300 mJ/cm². Para el láser de colorante pulsado, una viabilidad normalizada de más del 90% a una fluencia de aproximadamente 300 mJ/cm², una viabilidad del 80% a una fluencia de aproximadamente 380-390 mJ/cm² y una viabilidad de aproximadamente el 50% a una fluencia de aproximadamente 500 mJ/cm².

Por tanto, para duraciones de pulso de ns, la figura 9A muestra que exponer las células del hfRPE a una fluencia de hasta varias decenas mJ no provoca esencialmente destrucción. Incluso un pulso fluencia entre 100 mJ/cm² y aproximadamente 250 mJ/cm² provoca sólo una pequeña reducción en la viabilidad normalizada de las células del hfRPE.

Para duraciones de pulso de μs, la figura 9B muestra que administrar a las células del hfRPE una fluencia de hasta varios cientos de mJ esencialmente no provoca muerte celular esencialmente. Incluso un pulso fluencia de aproximadamente 250 mJ provoca sólo una pequeña reducción en la viabilidad de las células del hfRPE.

Estos resultados muestras que administrar fluencias de desde nJ hasta varios mJ puede garantizar una alta viabilidad sin muerte celular significativa de células del hfRPE.

Aún cuando no se controló la concentración de melanina, una concentración de melanina superior reduciría el umbral de fluencia. Por tanto, el uso de un 70% del límite superior de ausencia de muerte celular ayuda a garantizar que no hay (o esencialmente no) destrucción de células.

#### Ejemplo 9 - Modelo de conejo in vivo de niveles subletales de fluencia

Usando una lente de contacto Mainster sobre la córnea de conejos Dutch Belted, se irradiaron células del RPE con una fluencia de aproximadamente 64 mJ/cm² usando un láser de colorante pulsado de 1 µs y de aproximadamente 8,0 mJ/cm² usando un láser de Nd:YAG de conmutación de Q a 532 nm. No se observaron daños visibles al RPE. Sin embargo, la angiografía de fluoresceína demostró fuga a las fluencias anteriores, indicando la apertura de las uniones entre las células, y por tanto proporcionando pruebas de un efecto bioquímico inducido por la energía lumínica sin cambios oftalmoscópicamente visibles en el RPE.

Estos datos sugieren que la fotostimulación del RPE *in vivo* se produce a energías de tratamiento inferiores que la notificada usando células del RPE en cultivo.

#### 45 Otras realizaciones

Debe entenderse que aunque la invención se ha descrito conjuntamente con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define mediante el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

50

30

35

40

#### REIVINDICACIONES

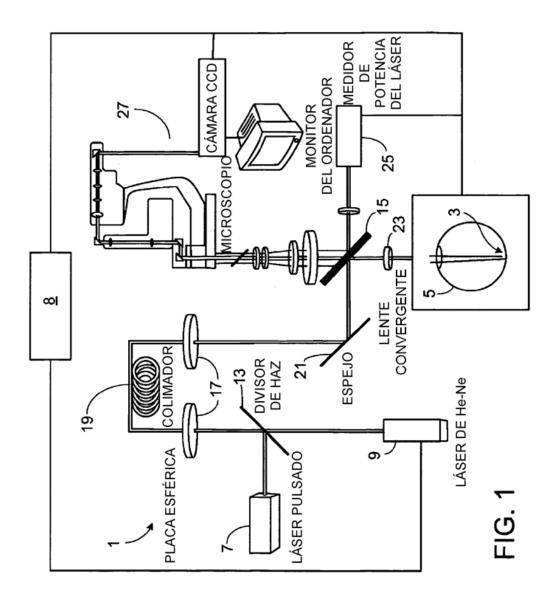
- 1. Sistema para fotoestimular selectivamente células epiteliales pigmentadas de la retina en un tejido en un paciente, comprendiendo el sistema:
- una fuente (7) de luz para generar uno o más pulsos de radiación, en el que la fuente de luz es un láser basado en Nd y en el que cada pulso comprende:
  - (i) una luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 532 nm que se absorbe más en células pigmentadas que en células no pigmentadas; y
  - (ii) una duración de pulso de aproximadamente 3 ns que es más corta que un tiempo de relajación térmica de las células epiteliales pigmentadas de la retina;
- un sistema óptico para dirigir el uno o más pulsos a una región de tejido que contiene células epiteliales pigmentadas de la retina y células no pigmentadas,
  - en el que el pigmento es o bien pigmento sintetizado endógenamente o bien exógeno; y
  - una unidad (8) de control configurada para controlar la irradiación del tejido con el uno o más pulsos de radiación de tal manera que la energía de radiación total aplicada al tejido proporciona una fluencia subletal a las células epiteliales pigmentadas de la retina de entre 100 mJ/cm² y 250 mJ/cm², fotoestimulando así selectivamente las células epiteliales pigmentadas de la retina en el tejido.
    - 2. Sistema según la reivindicación 1, en el que la unidad (8) de control está configurada para fotoestimular selectivamente las células epiteliales pigmentadas de la retina mientras se evita la muerte celular.
- 3. Sistema según la reivindicación 1, en el que la unidad (8) de control está configurada además para controlar al menos uno de una duración de pulso, una longitud de onda y un número total de pulsos de radiación generados por la fuente (7) de luz para aplicar la fluencia de energía subletal a las células epiteliales pigmentadas de la retina.
  - 4. Sistema según la reivindicación 1, en el que la unidad (8) de control está configurada además para fotoestimular selectivamente las células epiteliales pigmentadas de la retina en el tejido:
- (i) activando la fuente (7) de luz para generar uno o más pulsos de radiación para irradiar el tejido durante un primer periodo de tratamiento;
  - (ii) desactivar la fuente (7) de luz durante un periodo de cicatrización de una hora o más; y
  - (iii) reactivar la fuente (7) de luz para generar uno o más pulsos de radiación adicionales para irradiar adicionalmente el tejido durante un segundo periodo de tratamiento.
- 5. Sistema según la reivindicación 3, en el que la fuente (7) de luz es un láser de Nd:YAG de frecuencia doblada, y en el que la unidad (8) de control está configurada para inducir proliferación de las células epiteliales pigmentadas de la retina:
  - ajustando la fuente (7) de luz para generar pulsos de radiación; y

15

- aplicando los pulsos de radiación a las células epiteliales pigmentadas de la retina,
- en el que cada uno de los pulsos de radiación está separado por un tiempo de retardo para garantizar que no se produce fotocoagulación en el tejido.
  - 6. Sistema según la reivindicación 5, en el que la unidad (8) de control está configurada para aplicar un único pulso de radiación a las células epiteliales pigmentadas de la retina para inducir proliferación de las células.
  - 7. Sistema según la reivindicación 4, en el que la unidad (8) de control está configurada además para fotoestimular selectivamente las células epiteliales pigmentadas de la retina en el tejido
- 40 (ii) desactivando la fuente (7) de luz durante uno o más periodos de cicatrización adicionales; y
  - (iii) reactivando la fuente (7) de luz tras cada uno de los periodos de cicatrización adicionales para generar uno o más pulsos de radiación adicionales para irradiar adicionalmente el tejido durante uno o más periodos de tratamiento adicionales.
- 8. Sistema según la reivindicación 4, en el que la unidad (8) de control está configurada para activar la fuente (7) de luz para generar secuencias de pulsos de radiación de entre 10 y 100 pulsos durante cada uno de los periodos de tratamiento primero y segundo.
  - 9. Sistema según la reivindicación 8, en el que la unidad (8) de control está configurada para activar la fuente (7) de

luz para generar diferentes números de pulsos de radiación durante cada uno de los periodos de tratamiento primero y segundo.

- 10. Sistema según la reivindicación 1, en el que el uno o más pulsos de radiación inciden sobre el tejido en un punto diana que tiene un diámetro de entre aproximadamente 0,05 mm y aproximadamente 1,5 mm.
- 5 11. Sistema según la reivindicación 1, en el que la fuente (7) de luz es un láser de Nd:YAG, y en el que la longitud de onda de la luz corresponde a un doblado de frecuencia de una longitud de onda de salida fundamental del láser de Nd:YAG.



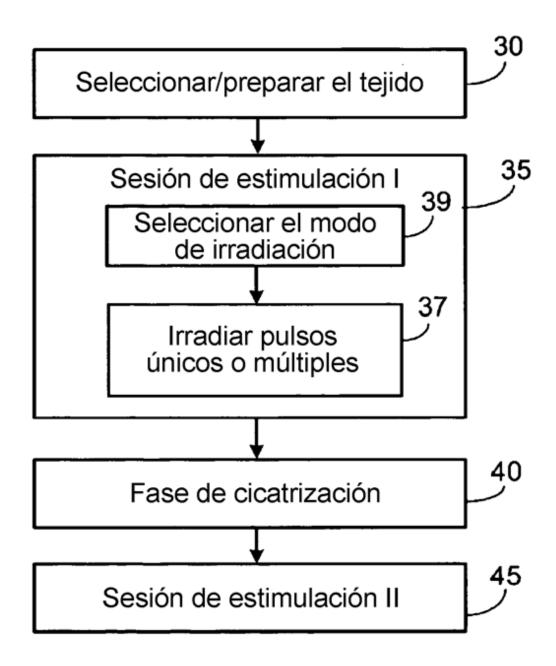


FIG. 2

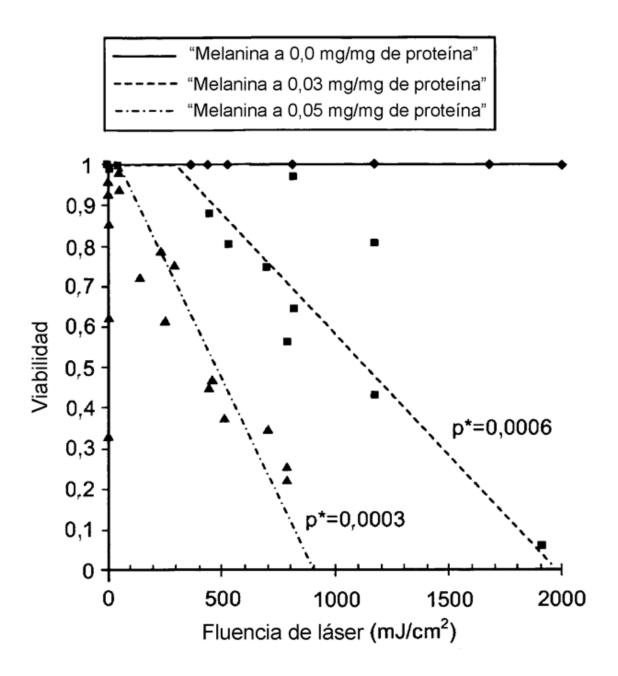
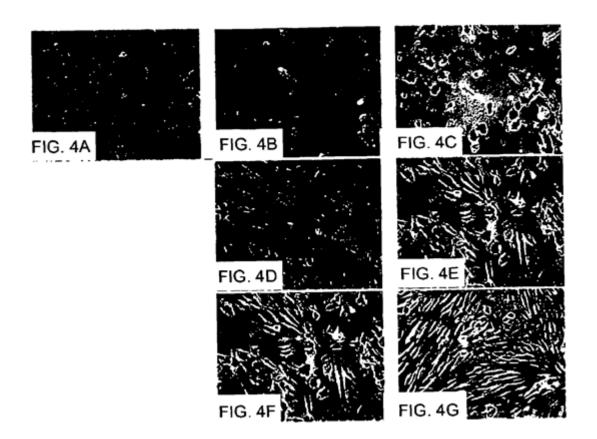
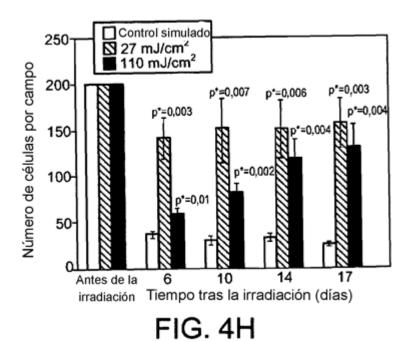
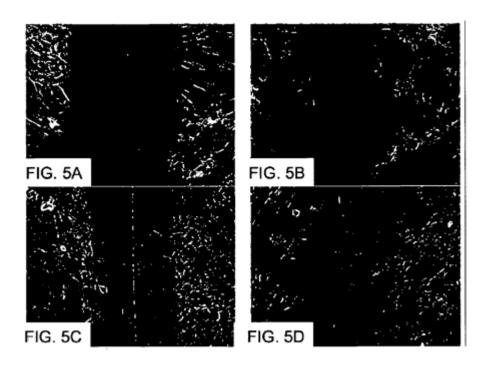
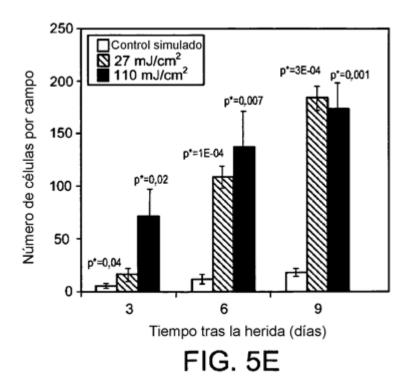


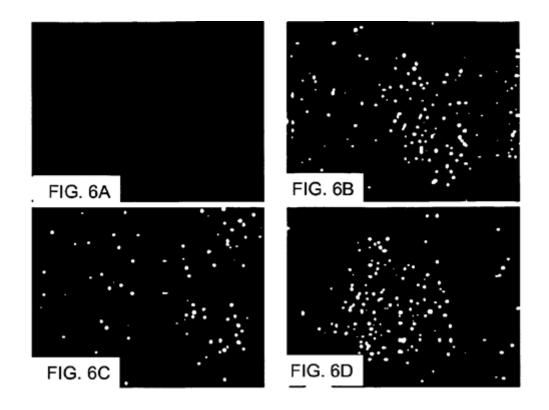
FIG. 3

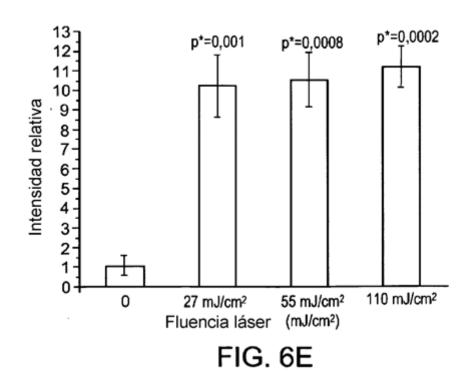












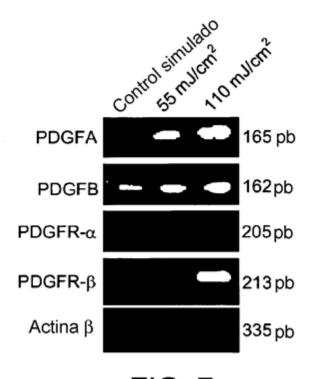


FIG. 7

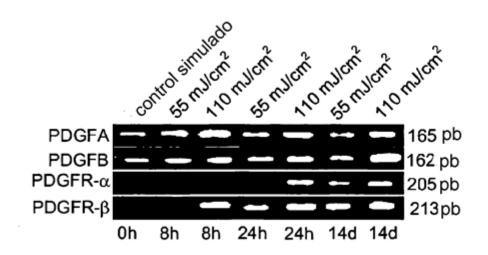


FIG. 8A

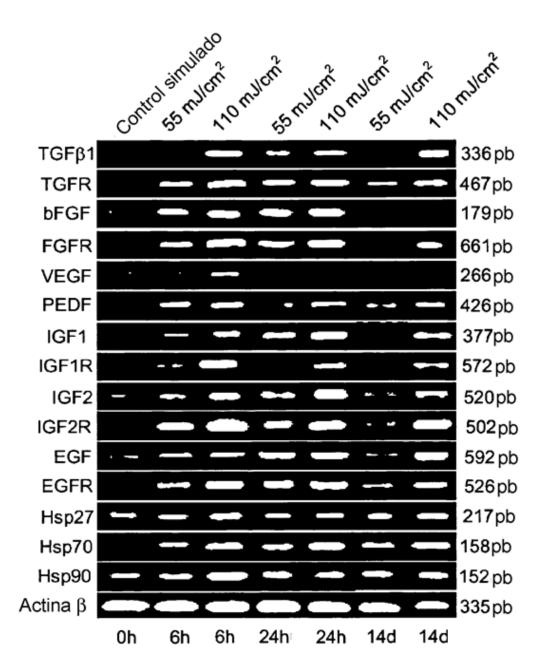


FIG. 8B

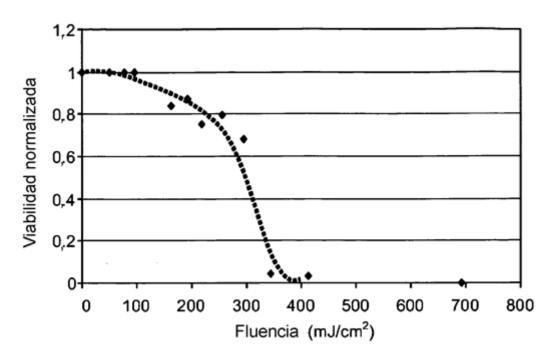


FIG. 9A

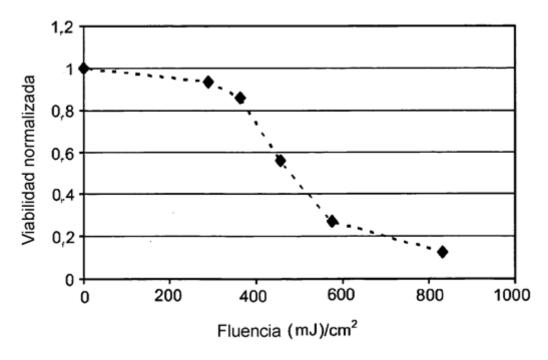


FIG. 9B