

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



ESCUELA SUPERIOR DE
ELÉCTRICA Y MECÁNICA

ESIME ZACATENCO

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN



**Diseño y construcción de un sistema de irradiación
para la terapia fotodinámica con control de
temperatura**

Tesis que presenta:

Ing. Fulgencio Yonadab López Silva

para obtener el Grado de:

Maestro en Ciencias en Ingeniería Electrónica

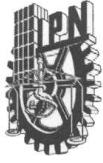
Directores de Tesis

Dr. Suren Stolik Isakina

Dr. José Manuel de la Rosa Vázquez

México,DF.

Febrero 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D. F. siendo las 18:00 horas del día 19 del mes de Enero del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ESIME-ZACATENCO para examinar la tesis titulada:
"DESARROLLO Y CONSTRUCCIÓN DE UN SISTEMA DE IRRADIACIÓN PARA TERAPIA FOTODINÁMICA CON CONTROL DE TEMPERATURA"

Presentada por el alumno:

LÓPEZ SILVA FULGENCIO YONADAB
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)

Con registro:

A	0	9	0	4	0	9
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA ELECTRÓNICA

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores(a) de tesis


DR. JOSÉ MANUEL DE LA ROSA VÁZQUEZ


DR. SUREN STOLIK ISAKINA

Presidente

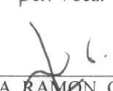
DR. ROBERTO LINARES Y MIRANDA

Secretario

DR. JOSÉ HIRAM ESPINA HERNÁNDEZ

2º. Vocal

DR. SUREN STOLIK ISAKINA

3er. Vocal

DRA. EVA RAMON GALLEGOS

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


DR. JAIME ROBLES GARCÍA





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la ciudad de México, Distrito Federal, el día _ del mes de Enero del año 2011, el que suscribe **Fulgencio Yonadab López Silva**, alumno del programa de **Maestría en Ciencias en Electrónica** con número de registro **A090409**, adscrito a la **Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la ESIME Zactenco**, manifiesta que es un autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dr. José Manuel de la Rosa Vázquez** y el **Dr. Suren Stolik Isakina** y cede los derechos del trabajo intitulado **Diseño y construcción de un sistema de irradiación para la terapia fotodinámica con control de temperatura** al **Instituto Politécnico Nacional** para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones: **fyonadabls@hotmail.com**, **jos_delarosa@yahoo.com**, **surenstolik@gmail.com**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento y citar la fuente del mismo.

Fulgencio Yonadab López Silva

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de todo corazón a *mis padres y hermana* por su amor, cariño, apoyo y comprensión que me han ofrecido durante el tiempo que estuve realizando mi tesis, así como la fuerza y el coraje que me inculcaron para terminarla. Es una alegría inmensa ser parte de esta familia.

Agradezco profundamente a mis asesores, al *Dr. Suren Stolik Isakina* y al *Dr. José Manuel de la Rosa Vázquez*, por la oportunidad que me dieron de trabajar a su lado y haberme guiado a la culminación de esta tesis. Gracias por sus conocimientos, ideas, sugerencias, por confiar en mí, por tenerme paciencia, así como ayudarme y apoyarme en los momentos difíciles. Siempre les estaré agradecido.

Agradezco a la *Dra. Eva Ramón Gallegos* de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional por permitirme colaborar con su grupo de trabajo y realizar experimentos en ratones y líneas de células.

Gracias a todos mis profesores de la Maestría en Ingeniería Electrónica de la ESIME Zacatenco por su aporte en mi formación profesional.

También agradezco a mi primo el *Dr. Israel Vite Silva* por el tiempo que dedicó a ayudarme en este trabajo de tesis. Gracias, no lo olvidaré.

Además deseo agradecer y dedicar este trabajo a *Ale* por su gran amor, apoyo, comprensión y paciencia incondicional que siempre me brinda. Gracias por ser parte de mi vida y hacerme pasar momentos agradables.

De igual forma agradezco al Instituto Politécnico Nacional por la formación académica que me ha brindado, así como al CONACYT, por la beca otorgada durante estos 2 años en los que realicé este trabajo.

Resumen

En este trabajo se reporta el diseño y construcción de un sistema de irradiación para la terapia fotodinámica con control de temperatura. El sistema desarrollado permite aplicar y realizar estudios sobre la terapia fotodinámica *in vivo* e *in vitro* en sinergia con la terapia fototérmica. El sistema está formado por un microcontrolador de gama alta *PIC18F4550*, con el cual se desarrolla la etapa de control del sistema, un LED de 5 W de 630 nm como dispositivo de entrega de luz, un regulador de corriente *Buckplus 7021 D-E 1000* de LUXDRIVE para controlar la corriente que circula por el LED, un termopar tipo K y un amplificador de instrumentación para termopares (*AD595*), para el monitoreo y control de temperatura y un regulador de voltaje *LM7805*. Además cuenta con un teclado matricial un display de 16 segmentos para que el usuario pueda introducir y visualizar en el sistema los parámetros de tiempo, densidad de potencia y temperatura. El sistema puede controlar la densidad de potencia y el tiempo de irradiación, que a su vez permite el control automatizado de temperatura durante la irradiación del tejido o muestra. También cuenta con una interfaz gráfica en *Labview*[®] 8.2 de National Instruments para el monitoreo de los parámetros de la densidad de potencia, el tiempo y la temperatura desde una PC o Laptop. Además, se presentan los resultados de experimentos realizados en ratones atómicos nu/nu y en líneas celulares, con los cuales se puede justificar la necesidad de controlar la temperatura durante la aplicación de la terapia fotodinámica.

Abstract

In this work the design and construction of an irradiation system for photodynamic therapy with temperature control is presented. The developed system is intended to enable studies on photodynamic therapy in synergy with photothermal therapy both *in vivo* and *in vitro*. The system consists of a microcontroller *PIC18F4550*, with which it develops the stage of system control, as a device for delivery of light, an LED of 5W of 630 nm, a current controller *Buckplus 7021 1000* of LUXDRIVE to control the current through the LED, for monitoring and control of temperature a type K thermocouple and a thermocouple instrumentation amplifier (textit AD595) is used, and a voltage regulator *LM7805*. For the user it also has a keyboard matrix and 16 segment display to enter and view the system parameters as the time, the power density and the temperature. The system can control the power density and irradiation time, which in turn allows automated control of temperature during irradiation or target tissue. It also has a textitLabview[®] 8.2 from National Instruments graphical interface for PC or laptop monitoring of the power density, time and temperature parameters. In addition, results of experiments in nu/nu mice and cell lines are presented, which justify the need of temperature control during photodynamic therapy application.

Índice general

Resumen	I
Abstract	III
Índice de figuras	VII
Índice de tablas	IX
Acrónimos y abreviaturas	XI
Objetivo general	XIII
Objetivos particulares	XIII
Justificación	XV
1. Introducción	1
1.1. Tipos de tratamiento del cáncer	1
1.2. Fototerapia	3
1.2.1. Fotoquimioterapia	4
1.3. Terapia fotodinámica	5
1.3.1. Breve reseña histórica de la terapia fotodinámica	5
1.3.2. Estudios con hematoporfirina	6
1.3.3. Descubrimiento de la hematoporfirina derivativa	8
1.3.4. Fotodetección en estudios clínicos con HpD	8
1.3.5. Explosión en el interés de la PDT	10
1.4. Acción fotodinámica	10
1.5. Efecto fotodinámico.	12
1.6. Fotosensibilizadores	14
1.7. Fuentes de luz	15
1.7.1. Láseres de Argón	15
1.7.2. Láseres de colorante bombeados por láser vapor metálico	16
1.7.3. Láseres de estado sólido	16
1.7.4. Diodo láser	17
1.7.5. Lámparas	17

1.7.6. LED´s	19
1.8. Efecto fototérmico	21
2. Sistema desarrollado	23
2.1. Consideraciones previas	24
2.2. Fuente de luz (<i>LED</i>)	26
2.3. Fuente de alimentación	28
2.3.1. Regulador de corriente <i>Buckplus 7021 D-E 1000</i>	28
2.4. Control del tiempo de irradiación	32
2.4.1. Control de tiempo con el integrado NE 555	32
2.4.2. Control de tiempo con el integrado XR-2240	33
2.4.3. Microcontrolador	34
2.5. Sistema óptico	35
2.5.1. Diafragma	35
2.5.2. Sistema de lentes condensadoras	36
2.5.3. Cabezal con un cilindro	38
2.6. Control de temperatura	40
3. Resultados	45
3.1. Sistema prototipo	45
3.1.1. Interfaz con Labview	46
3.1.2. Limitaciones del sistema	47
3.2. Aplicación de la PDT <i>in vivo</i>	48
3.2.1. Descripción macroscópica del efecto de la PDT	48
3.2.2. Monitoreo de la temperatura	49
3.3. Aplicación de la PDT <i>in vitro</i>	51
4. Conclusiones y trabajo a futuro	53
4.1. Introducción	53
4.2. Conclusiones del sistema desarrollado	53
4.3. Conclusiones del experimento en ratones	55
4.4. Recomendaciones para el trabajo a futuro	55
Appendices	56
A. Difusión del trabajo	57
B. Código fuente del programa desarrollado	59
C. Diagrama eléctrico	69

Índice de figuras

1.1.	Línea del tiempo de importantes hechos históricos en el desarrollo de la PDT de 1900 a 1985.	7
1.2.	Número de artículos publicados sobre la PDT de 1970 al 2007	11
1.3.	Proceso fotofísico en la terapia fotodinámica.	13
1.4.	Laser KTP	16
1.5.	Diodo láser	17
1.6.	(a)Example of operating diode laser (Diomed 630); (b) example of operating tungsten filament lamp (Photocure);(c) example of metal halide lamp (Waldmann PDT 1200).	19
1.7.	LED´s de alta potencia	20
1.8.	Fuentes comerciales para la PDT, a) Omnilux, b)Stocker Yale Inc. c) Photocure	20
1.9.	Espectro de absorción del agua [1]	22
1.10.	Ventana terapéutica para el tratamiento del cáncer [2]	22
2.1.	Diagrama a bloques del sistema desarrollado	23
2.2.	Espectro de absorción del tejido [1]	24
2.3.	Espectro de absorción del la PpIX [3]	25
2.4.	Potencia relativa contra corriente Luxeon Star LED 1W	27
2.5.	Potencia relativa contra corriente Pro light LED 5W	27
2.6.	Espectro de emisión del LED Pro light Opto	27
2.7.	<i>LM317</i> configuración regulador de corriente	28
2.8.	Respuesta de la corriente en el tiempo del <i>LM317</i> en configuración regulador de corriente	29
2.9.	Imagen <i>Buckplus 7021 D-E 1000</i> de LUXDRIVE	29
2.10.	Eficiencia <i>Buckplus 7021 D-E 1000</i>	30
2.11.	Respuesta de corriente respecto al voltaje de alimentación del <i>Buckplus 7021 D-E 1000</i>	30
2.12.	Configuración <i>Buck Plus</i> con control externo mediante potenciómetro	31
2.13.	Configuración <i>Buck Plus</i> con control externo mediante un microcontrolador	31
2.14.	Señal de salida PWM	32
2.15.	555 en su configuración multivibrador monoestable	33
2.16.	Diagrama a bloques <i>XR-2240</i>	34

VIII ÍNDICE DE FIGURAS

2.17. XR-2240 en su configuración multivibrador monoestable.	34
2.18. Diafragma	35
2.19. Lente biconvexa	36
2.20. Lente bicóncava	36
2.21. Medición de la potencia óptica con termopila Lexer Laser 510	37
2.22. Respuesta en potencia respecto a la corriente que circula por el LED con el sistema de lentes	38
2.23. Cabezal propuesto con cilindro de acrílico de 1 <i>cm</i> de diámetro	38
2.24. Potencias ópticas obtenidas con la termopila Lexer Laser 510	39
2.25. Polarización de fototransistor y la mesa (X,Y)	39
2.26. Homogeneidad relativa del área de irradiación con cilindro de acrílico	40
2.27. Principio de funcionamiento del termopar	41
2.28. Respuesta del termopar tipo K respecto a la temperatura	41
2.29. Diagrama del AD595	42
2.30. Diagrama de flujo del software implementado en el microcontrolador .	43
3.1. Imagen del prototipo construido	45
3.2. Interfaz desarrollada en <i>Labview</i> [®]	46
3.3. Arreglo de bytes para el envío de datos	47
3.4. Irradiación de ratones atómicos nu/nu.	48
3.5. Observaciones macroscópicas de los tumores al aplicar la PDT	49
3.6. Temperaturas censadas durante la aplicación de la PDT	50
3.7. Incremento porcentual de la temperatura de los ratones con respecto a T_0 y T_b	50
3.8. Incrementos de temperaturas en cultivos de células irradiados con 15, 25 y $50mW/cm^2$	52
C.1. Diagrama eléctrico del circuito del sistema	69

Índice de tablas

2.1. Densidades de potencias requeridas para obtener densidades de energía de $250 J/cm^2$ y $150 J/cm^2$	26
3.1. Valores de temperatura censadas durante la aplicación de PDT en ratones atómicos nu/nu	51

Acrónimos y abreviaturas

ADN	–	Ácido desoxirribonucleico
ADC	–	Convertidor Analógico - Digital
FDA	–	Food and Drug Administration
UV	–	Ultravioleta
UVA	–	Ultravioleta A (400nm–315nm)
UVB	–	Ultravioleta B (315nm–280nm)
UVC	–	Ultravioleta C (280nm–100nm)
PUVA	–	Psoralen + Ultravioleta A
PDT	–	Photodynamic Therapy (Terapia fotodinámica)
PS	–	Photosensitizer (Fotosensibilizador)
LED	–	Light-Emitting Diode (Diodo Emisor de Luz)
HP	–	Hematoporfirina
HpD	–	Hematoporfirina Derivativa
ALA	–	Ácido Aminolevulinico
PpIX	–	Protoporfirina IX
CNV	–	No Vascularización Coroidal
EMA	–	European Medicines Agency (Agencia Europea de Medicamentos)
NIST	–	National Institute of Standards and Technology
ISC	–	Intersystem crossing (cruce de intersistemas)
CCP	–	Capture/Compare/PWM
O_2	–	Oxígeno
1O_2	–	Oxígeno en estado singlete
3O_2	–	Oxígeno en estado triplete
S_0	–	Estado electrónico basal
S_1	–	Estado electrónico singlete
3S	–	Estado electrónico triplete
<i>mW</i>	–	Miliwatts
<i>nm</i>	–	Nanómetros
<i>cm</i>	–	centímetro
<i>cm²</i>	–	centímetro cuadrado
<i>mm</i>	–	Milímetro
<i>mg</i>	–	Miligramo
<i>Kg</i>	–	Kilogramo

Objetivo general

Desarrollar un sistema de irradiación óptica de tejidos externos y cultivos de células para la aplicación de la terapia fotodinámica, con control de potencia y tiempo, así como un control automático de temperatura.

Objetivos particulares

- Incorporar un temporizador al sistema para el control del tiempo.
- Desarrollar el cabezal de irradiación con LED´s de alta potencia e incorporar un sistema óptico que permita al sistema irradiar en un área de 1 a 2 cm de diámetro.
- Incorporar un modulo de medición de temperatura, con termopares tipo K.
- Controlar la temperatura en el área de irradiación modificando los parámetros de potencia y tiempo en el sistema para la aplicación de una dosis determinada.
- Caracterizar el sistema en cuanto a densidad de potencia y patrón de irradiación.

Justificación

La medicina se ha basado en técnicas para diagnosticar y tratar problemas de la salud, que en la mayoría de los casos dañan el tejido sano. Las terapias que se utilizan actualmente para el tratamiento de diversos tipos de cáncer son parcialmente efectivas (70 %) [4] y los efectos secundarios que presentan en ocasiones llevan a la muerte de los pacientes, ejemplos de ello son la radioterapia y la quimioterapia que no respetan tejidos, destruyen genes, cromosomas y células sanas. Debido a esto, es necesario buscar nuevas terapias con alto grado de especificidad y con efectos secundarios mínimos o sin ellos. La terapia fotodinámica es una herramienta poco invasiva y altamente selectiva que permite destruir tejidos tumorales, minimizando en lo posible el daño al tejido sano.

Por otro lado, actualmente la mayoría de los sistemas para aplicaciones en la terapia fotodinámica están desarrollados utilizando láseres y lámparas incandescentes de alta potencia. Sin embargo, están limitadas en el área de irradiación y su costo es elevado. La tecnología actual de los LED's de alta potencia permite desarrollar sistemas de irradiación para la terapia fotodinámica con los cuales se puede generar las densidades de energía adecuadas para la terapia fotodinámica y su costo de implementación es menor. Además, los sistemas actuales no consideran los efectos fototérmicos que se generan durante la aplicación de la terapia fotodinámica, los cuales pueden generar efectos de hipertermia.

Por estas razones se desarrolló un sistema de irradiación de luz para aplicaciones en la terapia fotodinámica con control de temperatura mediante el uso de LED's de alta potencia. El sistema podrá ser aplicado en animales (*in vivo*) y en cultivos de células (*in vitro*). Este trabajo ha sido posible gracias a la estrecha colaboración que existe entre el Laboratorio de Láseres y Optoelectrónica de la ESIME y el de Citopatología Ambiental de la ENCB del Instituto Politécnico Nacional, quienes en conjunto desarrollan experimentos implementando la terapia fotodinámica *in vitro* e *in vivo*.

Capítulo 1

Introducción

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades en las cuales el organismo produce un exceso de células malignas (conocidas como cancerígenas o cancerosas), lo que produce una invasión del tejido circundante o la metástasis que pueden terminar con la vida del paciente. Se han identificado alrededor de 100 tipos de cáncer [5].

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Se le atribuyen 7,9 millones de defunciones (o aproximadamente el 13 % de las defunciones mundiales) ocurridas en 2007. Aproximadamente el 72 % de las defunciones por cáncer ocurridas en 2007 se registraron en países de ingresos bajos y medianos. Se prevé que el número de defunciones anuales mundiales por cáncer seguirá aumentando y llegará a unos 12 millones en 2030. La mayor parte de la mortalidad anual por cáncer obedece a cáncer de pulmón, estómago, hígado, colon y mama [6].

1.1. Tipos de tratamiento del cáncer

El tratamiento del cáncer se fundamenta en tres pilares: cirugía, quimioterapia y radioterapia. Sin embargo, existe un cuarto pilar llamado terapia biológica que incluiría la hormonoterapia, la terapia dirigida, la inmunoterapia, y nuevas dianas terapéuticas no citotóxicas como la fotoquimioterapia y la terapia fotodinámica [7].

La cirugía es la práctica que implica la manipulación mecánica de las estructuras anatómicas con un fin médico. Es el método más empleado para aquellos tumores pequeños y localizados en un lugar concreto. Para que sea completamente eficaz se precisa extirpar parte del tejido que rodea el tumor para asegurar que todas las células cancerosas hayan sido extirpadas. Si el cáncer se ha extendido a otras zonas, a través de la sangre o de la linfa, habrá que realizar otros tratamientos, bien sean añadidos a la cirugía o únicos y distintos a ella [8].

La radioterapia utiliza radiación electromagnética, como los rayos X, rayos gamma, o partículas como electrones o protones, para eliminar o dañar las células cancerosas. Puede aplicarse sola o en conjunto con otros tratamientos como la cirugía o la quimioterapia [9]. El efecto destructivo de la radiación resulta de eventos directos e indirectos propios de la radiación que conducen a la súper oxidación de las

macromoléculas, principalmente los lípidos de las membranas, aunado a esto, el daño a proteínas esenciales para la viabilidad de la célula y mucho peor, el daño generado al ADN. Posteriormente el daño se traduce en la ausencia o disfunción de proteínas vitales, esto tanto en células cancerosas como en células sanas [10].

La radioterapia puede causar efectos secundarios tempranos y tardíos. Entre los efectos secundarios tempranos más comunes se incluyen: cansancio, cambios en la piel, pérdida del apetito, otros efectos secundarios tempranos por lo general se relacionan con el área bajo tratamiento, como la pérdida del cabello que se da tras recibir tratamiento en la cabeza. En el caso de los efectos secundarios tardíos, estos dependerán del tiempo del tratamiento y de la ubicación anatómica en donde se realizó la radiación. Por ejemplo, la radiación en el área del pecho puede afectar a los pulmones o al corazón. En algunas personas esto puede causar cicatrización, lo cual puede afectar la capacidad de la persona para realizar actividades físicas. La radiación al abdomen o pelvis puede originar problemas de vejiga, intestinos o sexuales en algunas personas (infertilidad o malformación de embriones). La radiación en ciertas áreas también puede originar acumulación de líquido e inflamación de un brazo o pierna, una condición conocida como linfedema, y en casos más severos el desarrollo de un nuevo cáncer, debido a las mutaciones que generó la radiación a células normales [9].

La quimioterapia es el uso de medicamentos para tratar una enfermedad. Contrario a la cirugía y la radioterapia que remueven, destruyen o dañan las células del cáncer en cierta área, la quimioterapia tiene efecto sistémico. Puede destruir las células cancerosas que han hecho metástasis o se han propagado a otras partes del cuerpo alejadas del tumor primario. El efecto de los medicamentos administrados es muy diverso, algunos intervienen deteniendo la progresión del ciclo celular, otros como la doxorrubicina se intercalan en el ADN inhibiendo la síntesis del mismo evitando así la proliferación. Los efectos secundarios más comunes de la quimioterapia incluyen: náusea, vómito, caída del cabello, cansancio (fatiga), riesgo de hematomas, hemorragias, anemia (recuentos bajos de glóbulos rojos), e infecciones. La quimioterapia puede afectar partes del cuerpo de la siguiente forma: problemas intestinales y estomacales, cambios en el apetito y peso, llagas en la boca, encías y garganta, problemas en los nervios y músculos, piel seca y/o decoloración de la piel, irritación de los riñones y la vejiga y problemas con la sexualidad y la fertilidad debido a los efectos en los órganos reproductores [9].

La terapia hormonal intenta tratar el cáncer de mama usando drogas que bloquean el efecto del estrógeno o disminuyen sus niveles. Algunos tumores necesitan estrógeno y/o progesterona para crecer y tienen receptores para estas hormonas. Cuando estos receptores están presentes en el tumor se les denomina receptor estrógeno positivo o receptor progesterona positivo.

El tamoxifeno funciona contra el cáncer de mama, en parte, al interferir con la actividad del estrógeno. En octubre de 1998, la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos aprobó el uso de tamoxifeno para reducir la incidencia de cáncer de mama en mujeres con alto riesgo de padecer la enfermedad. Aunque existen muchos avances en cuanto a la terapia hormonal y su eficacia como tratamiento para el cáncer

de mama, el 50 % de los cánceres de mama que son receptores de estrógenos positivos son eliminados, por lo que se siguen buscando nuevos tratamientos más efectivos cuyos efectos secundarios sean nulos o mínimos [11].

La Terapia dirigida es un tipo de tratamiento que usa medicamentos y otras sustancias, como anticuerpos monoclonales, para identificar y atacar células cancerosas específicas [12]. A medida que los investigadores aprenden más sobre los cambios genéticos en células que causan cáncer, se han podido desarrollar medicamentos para combatir estos cambios de manera específica. Estos medicamentos dirigidos funcionan de manera distinta que los que se usan comúnmente en la quimioterapia. Generalmente originan diferentes efectos secundarios y suelen ser menos severos. Actualmente se usan a menudo en conjunto con la quimioterapia [13]. Algunos de los efectos secundarios pueden ser: fiebre y escalofríos, debilidad, náusea, vómito, tos, diarrea y dolor de cabeza. La diarrea es un efecto secundario común y puede ser grave, mientras que un efecto secundario potencialmente grave consiste en daño al corazón, lo que origina un problema llamado insuficiencia cardíaca congestiva.

La continua búsqueda de abordajes terapéuticos que mejoren los tratamientos convencionales de las enfermedades neoplásicas junto con el mejor conocimiento del sistema inmunológico ha llevado en los últimos años al desarrollo de la inmunoterapia. Básicamente se pueden distinguir dos formas de inmunoterapia: la inmunoterapia pasiva, que consiste en la transferencia de anticuerpos o células previamente generados *in vitro* que se dirigen hacia el tumor, y la inmunoterapia activa, que pretende activar *in vivo* el sistema inmunológico e inducirlo a elaborar una respuesta específica contra los antígenos tumorales. Las neoplasias hematológicas, concretamente algunos linfomas B, expresan en su membrana una inmunoglobulina que se considera un verdadero antígeno específico de tumor; por eso estas enfermedades se han convertido en la diana ideal de los tratamientos de inmunoterapia. Las alternativas son muchas, desde las vacunas proteicas que ya han demostrado beneficios clínicos, hasta las de segunda generación, que aprovechan las nuevas técnicas de la biología molecular para aumentar la eficacia de las vacunas y conseguir su producción de forma más rápida y menos costosa, pero con las que todavía no hay resultados clínicos definitivos.

El objetivo de la inmunoterapia es establecer, reparar o aumentar la respuesta inmune frente a una enfermedad, en este caso las enfermedades oncológicas. De esta forma, se pretende conseguir una destrucción selectiva de las células tumorales, eliminando así los efectos que sobre células normales tienen la radioterapia y la quimioterapia. Aunque este objetivo se ha buscado desde principios del siglo XX, realmente todavía son pocas las indicaciones en las que la inmunoterapia ha demostrado ser realmente útil [14].

1.2. Fototerapia

Desde los comienzos de la humanidad, la luz ha jugado un papel importante en la medicina. En tiempos prehistóricos los poderes curativos de la luz, fueron atribuidos a los poderes mitológicos religiosos y supernaturales. La historia de la terapia mediante

el uso de luz, data desde antiguas civilizaciones como la Egipcia, Hindú, Romana China y Griega, todas creadoras de templos donde utilizaban la terapia con luz, especialmente la luz solar, utilizadas para sanar el cuerpo, el alma y la mente.

La fototerapia se puede definir como el uso de la luz sólo con fines terapéuticos. Sin embargo, los sensibilizadores endógenos están a menudo involucrados, por lo que la fototerapia depende de los procesos fotodinámicos. La luz solar se ha utilizado para tratar una serie de trastornos tales como el vitíligo, la psoriasis, el raquitismo, el cáncer de piel e incluso la psicosis [15].

En el siglo *XVIII* el efecto de la luz solar sobre el raquitismo era conocido. En 1815, Carvin escribió que la luz solar tiene efectos curativos en el raquitismo, el reumatismo, el escorbuto, la parálisis y la debilidad muscular [16].

El físico polaco Sniadecki documentó en 1822, la importancia de la exposición al sol para la prevención del raquitismo [17]. Más tarde, en 1903, el danés, Niels Finsen, fue galardonado con el Premio Nobel por su trabajo sobre el uso de la luz del arco de carbono en el tratamiento del lupus vulgar y fue reconocido como el fundador de la fototerapia moderna. También trató la viruela con luz roja y descubrió que este tratamiento impide la supuración de las pústulas. En la década de 1950 Richard Cremer en Essex, Inglaterra, presentó la fototerapia como un tratamiento de la *ictericia* (coloración amarillenta de la piel) en los recién nacidos. Sin embargo, la luz como un agente terapéutico de la depresión y para el mantenimiento de los ritmos biológicos pueden tener en el futuro una gran importancia [18, 19].

1.2.1. Fotoquimioterapia

La fotoquimioterapia, es decir, la combinación de sustancias químicas y luz, ha sido una práctica habitual en el tratamiento de diversas enfermedades.

La fotoquimioterapia, es una modalidad especial de los tratamientos que utilizan los rayos ultravioleta asociados a sustancias farmacológicas fotoactivas. Este tratamiento ha mostrado su eficacia en la terapia contra la psoriasis. A esta terapia también se le conoce como baño PUVA (la P designa psoraleno, sustancia vegetal que es sensible a la luz) [20].

El tratamiento consiste en la aplicación de rayos ultravioletas UVA de una longitud de onda no tan peligrosa como los de los rayos UVB o UVC. La exposición prolongada de éstos últimos se ha relacionado con una incidencia elevada de lesiones graves como la aparición de melanomas, tumores epiteliales y degeneración de tejidos epiteliales. Durante cierto tiempo se buscó crear un mecanismo que permitiera la exposición de rayos UVA, menos peligrosos y más útiles. Debido a que los rayos UVA son menos penetrantes, para que se pueda ejercer un efecto terapéutico requiere un mayor tiempo de exposición lo que lo hace más peligroso, es por esa misma razón que se encontró la manera de incrementar el efecto terapéutico al emplear fármacos coadyuvantes.

La primera asociación que se conoce entre luz UV y una sustancia farmacológica, puede encontrarse en el régimen de Goeckerman. El Dr. William H. Goeckerman, de la Clínica Mayo, describió el uso de la luz ultravioleta B en combinación con el

alquitrán de hulla, que es una sustancia fotoactiva.

Los fármacos fotoactivables se pueden aplicar directamente sobre la superficie de la piel en forma de pomadas, ungüentos o administrarse por vía oral en forma de comprimidos o tabletas.

La aplicación de la terapia con rayos ultravioleta se efectúa después de la aplicación del psoraleno o dos horas después de su administración, permitiendo que tras la ingesta el fármaco llegue a la zona de la piel. Las lámparas especiales pueden destinarse a irradiar toda la superficie cutánea o solo un área específica. En virtud de la estrecha relación entre dosis aplicada y efecto, la radiación siempre debe estar bajo control especial por medio de fotómetros. Para aumentar posteriormente el efecto terapéutico de la fotoquimioterapia, se han sugerido asociaciones con otros fármacos, de los cuales se conoce que potencian los efectos deseables durante el tratamiento. Entre estos fármacos se pueden mencionar los retinoides y el metotrexato; sin embargo, su empleo puede generar el aumento en el riesgo de efectos colaterales indeseables.

Los efectos negativos que se presentan en esta terapia, están atribuidos a la alta energía que se requiere para ionizar el agua del núcleo de la célula, lo que provoca la deformación de la cadena del ADN. [21].

1.3. Terapia fotodinámica

Una modalidad de la fotoquimioterapia que presenta menos efectos negativos es la terapia fotodinámica; **PDT** (por sus siglas en inglés *Photodynamic Therapy*), la cual, es una modalidad terapéutica basada en la foto-oxidación de materiales biológicos inducida por un fotosensibilizante [22].

La terapia fotodinámica, consiste en la administración de un fármaco o colorante no tóxico conocido como fotosensibilizador (*PS* por sus siglas en inglés photosensitizer), el cual puede ser administrado de forma sistémica, local o tópica a un paciente con una lesión tumoral. Tras transcurrir un tiempo para que el fotosensibilizador se concentre en la lesión, mediante la irradiación de luz visible en la lesión y con la presencia de oxígeno el fotosensibilizador lleva a la generación de especies citotóxicas y consecuentemente a la muerte celular y a la destrucción de tejido[3].

1.3.1. Breve reseña histórica de la terapia fotodinámica

La observación de que la combinación de colorantes no tóxicos y luz visible puede matar células, fue hecha por primera vez por Oscar Raab, estudiante de medicina que trabajaba con el profesor Herman Von Tappeiner en Munich, Alemania. Mientras investigaba los efectos de los colorantes de acridina en los protozoarios que causaban la malaria, el hizo el descubrimiento casual durante una tormenta donde observó que la combinación de acridina roja y la luz mataba infusorios, una especie de paramecios [23]. Oscar Raab continuó con la investigación para mostrar que este efecto citotóxico era mejor que la acridina roja sola o la luz sola y asoció esta propiedad a los colorantes con la propiedad óptica de la fluorescencia. Él postuló que el efecto fue causado por la

transferencia de energía de la luz al químico, similar al proceso de la fotosíntesis vista en las plantas después de la absorción de la luz por los cloroplastos. En una segunda publicación, von Tappeiner discutió el futuro potencial de las aplicaciones de sustancias fluorescentes en la medicina [24]. El primer reporte de la aplicación sistemática de un fotosensibilizador en humanos fue en 1900 por *Prime*, neurólogo francés, quien utilizó el eosin (derivado de la fluoresceína) por vía oral en el tratamiento de epilepsia, pero descubrió que este tratamiento producía dermatitis en las áreas de la piel expuestas al sol [25]. Este descubrimiento llevo a la primera aplicación terapéutica médica de una interacción entre un fotosensibilizador y luz, en la cual, von Tappeiner junto con el dermatólogo Jesionek, utilizaron la combinación de aplicar eosin de forma tópica y luz blanca para tratar tumores en la piel [26]. Von Tappeiner junto con Jodlbaeur, continuaron la investigación para demostrar el requerimiento de la presencia de oxígeno en esta reacción de fotosensibilización y en 1907 introdujeron el termino de acción fotodinámica para describir este fenómeno [27].

1.3.2. Estudios con hematoporfirina

Scherer descubrió en 1841 la hematoporfirina (*HP*) después de tratar la sangre seca con concentrados de ácido sulfúrico, al lavar el precipitado libre de hierro y después tratarlo con alcohol [28]. Sin embargo, las propiedades de fluorescencia de la HP no fueron descritas si no hasta 1867 [29] y el componente fue nombrado hematoporfirina por el renombrado físico-químico alemán Felix Hoppe-Seyler en 1871 [30]. La HP fue el primer compuesto usado como fotosensibilizador por Hausmann en 1911 en Vienna , quien realizó estudios *in vitro* con HP y luz en paramecios y glóbulos rojos. También describió la reacción fototóxica en la piel , en ratones expuestos a luz después de la administración sistémica de HP [31]. Los primeros casos de humanos sometidos a fotosensibilización con porfirinas fue durante una auto experimentación llevada a cabo en 1913 por el alemán Friedrich Meyer-Betz. Para determinar si los mismos efectos fototóxicos podían ser inducidos en humanos como en los ratones. Inyectándose a si mismo 200 *mg* de HP y subsecuentemente sufriendo un prolongado dolor e hinchazón en las áreas expuestas a la luz [32].

El primer reporte de localización de porfirinas fluorescentes en un tumor maligno apareció en 1924 cuando, Policard de Lyons, Francia, observó fluorescencia roja en porfirinas en el sarcoma de una rata iluminada con luz ultravioleta [33]. En 1942, Auler y Banzer de Berlín describen la localización y fluorescencia de porfirinas administradas de forma exógena en tumores malignos experimentales. Estos descubrimientos inspiraron a Figge y Weiland en 1948 a investigar más a fondo las propiedades de localización de las porfirinas en tumores, en un intento por desarrollar un método para el diagnostico y tratamiento de tumores, Figge y Weiland administraron un grupo de porfirinas , incluyendo la HP, la coproporfirina y Zinc-Hp a ratones, en los cuales se indujeron y trasplantaron tumores, y encontraron que la fluorescencia localizada en el tumor aparecía dentro de 24 a 48 horas después de administración de las porfirinas y persistía de 10 a 14 días [34].

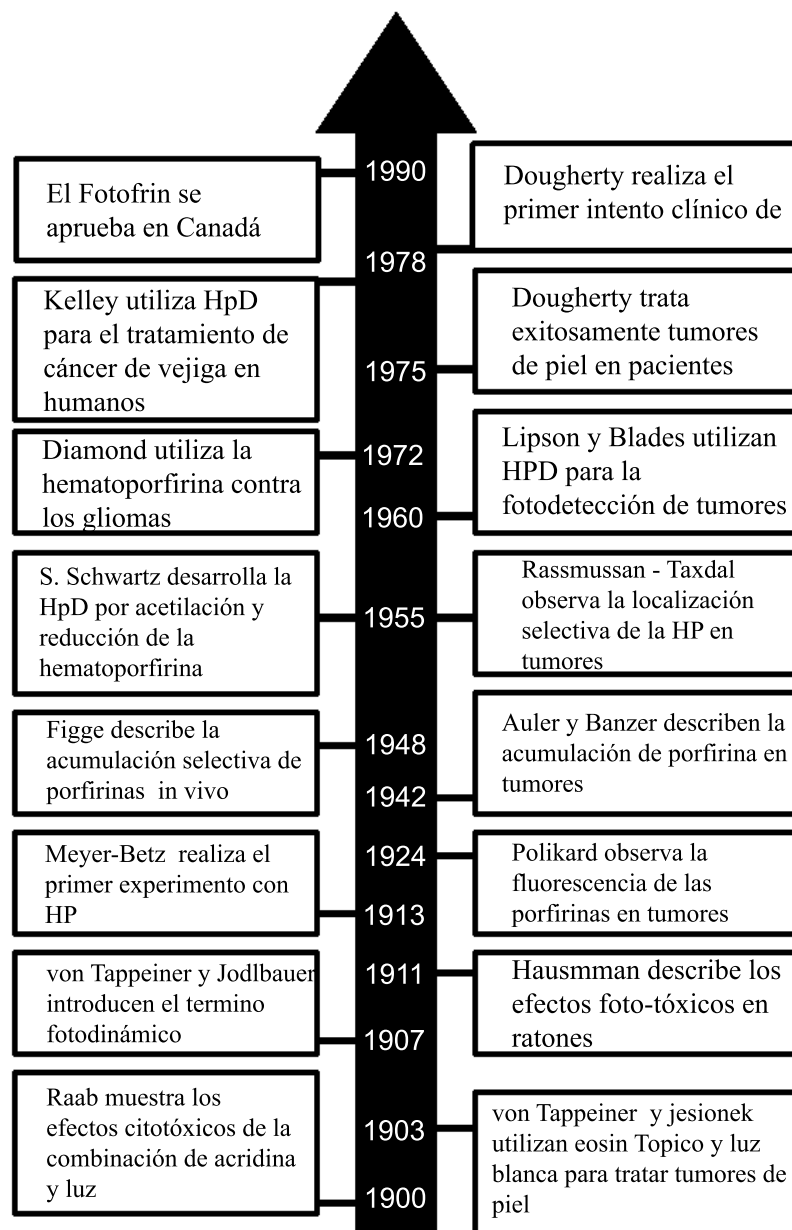


Figura 1.1: Línea del tiempo de importantes hechos históricos en el desarrollo de la PDT de 1900 a 1985.

En 1951, Magniello y Figgie investigaron los efectos de la HP inyectada en tres pacientes con neoplasias malignas de cabeza y cuello, pero la fluorescencia no fue detectada. Esta falla fue atribuida a las bajas dosis proporcionadas de HP a los humanos (30 – 120 mg) en comparación con las dosis empleadas previamente en experimentos con animales [35]. En 1955 Rassmussen-Taxdal et al. [36] administraron por vía intravenosa HP hidroclicídico a pacientes después de la escisión de una variedad de lesiones malignas y benignas, donde se observó una típica fluorescencia roja, en siete u

ocho tumores malignos pero solo en una de cada tres lesiones benignas. La intensidad de fluorescencia en el tumor incrementaba acorde a la dosis de HP administrada, y con dosis mayores fue posible detectar cáncer de seno a través de piel intacta y adenocarcinoma de colon a través de la pared de Bowell. En 1955, Peck et al. [37] inyectaron HP en animales y humanos para evaluar el potencial de inducir fluorescencia en la vesícula biliar y en el tracto biliar, como una potencial ayuda en la cirugía biliar. En todos los animales estudiados, se observó fluorescencia roja en la vesícula biliar y en el árbol biliar. En tres de cada cinco seres humanos no se observaron tumores con una administración de dosis bajas de HP (30 – 120 mg). Sin embargo, con altas dosis un paciente mostró una intensa fluorescencia roja de un carcinoma cervical asociado a los ganglios linfáticos.

1.3.3. Descubrimiento de la hematoporfirina derivativa

Los estudios previos mostraron el potencial de la HP como un agente para diagnóstico e incluso con un fin terapéutico para el cáncer. Sin embargo, la mayor desventaja de este compuesto es la necesidad de grandes dosis para producir una apreciable fluorescencia en el tumor, lo que llevó a una fototoxicidad en la piel no aceptable. En 1955 Schwartz et al. [38] demostraron que la preparación de HP utilizada en previos estudios era realmente una mezcla impura de varias porfirinas diferentes, cada una con propiedades diferentes. Schwartz continuó sus experimentos en un intento por mejorar la localización tumoral de la mezcla impura de HP. Entre otros procedimientos probó con el tratamiento de Hp crudo mezclado con ácido acético y sulfúrico, filtrando el resultado de la mezcla y neutralizándolo con acetato de sodio. Al redissolver el precipitado en una solución salina se produjo lo que se conoce como hematoporfirina derivativa (*HpD*). Esta preparación resultó ser el doble de fototóxica que la HP cruda, teniendo un efecto potencialmente letal en ratones inyectados con la sustancia y posteriormente expuestos a la luz [31], presentando una irritación en la piel, edema y eritema llevando así a la necrosis y muerte de la piel. Los animales que se mantuvieron en oscuridad no presentaron efectos de daño. La gravedad de la reacción depende de tres factores, la dosis del fármaco, el tiempo de exposición a la luz, y el intervalo de tiempo entre la administración de fármaco y la exposición a la luz. Posteriormente Schwartz persuadió a Lipson, para discontinuar su trabajo en HP y concentrarse en estudios de HpD. Junto con Baldes, Lipson demostró las propiedades de localización tumoral utilizando HpD, y cercanos a los años 60's se vieron interesados en el uso potencial de la HpD para la detección de tumores. Utilizando tumores desarrollados en animales demostraron que la HpD a menores dosis era mucho más efectiva que la Hp cruda en la localización de tumores y en la distinción entre tejido maligno y sano [39].

1.3.4. Fotodetección en estudios clínicos con HpD

Lipson, Baldes y Grey en 1967 fueron los primeros en estudiar el potencial de la localización de fluorescencia de la HpD en tumores, sometiendo a pacientes a una

broncoscopia o esofagoscopia en los que se sospechaba tenían una enfermedad maligna [40]. Utilizando luz a una longitud de onda apropiada activaron la fluorescencia de la HpD (400 nm), la cual fue producida por una lámpara de arco de mercurio filtrada, la luz fue transmitida con una fibra óptica a través de un endoscopio hasta donde se sospechaba la presencia de una lesión. La fluorescencia del tejido fue observada a través de un filtro, el cual excluía la reflexión de la luz de excitación de la lámpara de arco de mercurio. En 1968, Gregorio et al. reportaron el uso de fluorescencia de HpD en una serie de 226 pacientes, incluyendo 173 tumores malignos y 53 lesiones benignas. La fluorescencia fue detectada en el 84 % de los adenocarcinomas, 77 % en los carcinomas espino celulares y en un 62.5 % de los sarcomas. Únicamente un 22 % de las lesiones benignas presentaron niveles relativamente bajos de fluorescencia.

En 1971, Leonard y Beck reportaron el estudio de la detección de tumores usando HpD en 40 pacientes con sospecha de tumores de cabeza y cuello [41]. Lipson y sus colaboradores continuaron produciendo resultados alentadores usando fluorescencia de HpD en la detección de cáncer y cambios displásicos en cuello uterino. Trabajadores de la clínica Mayo, evaluaron la localización de HpD en casos de cáncer de pulmón en fase temprana [42, 43]. Exitosamente se describió la detección de un carcinoma *in situ*, utilizando la luz ultravioleta filtrada de una lámpara de mercurio alternando con luz blanca, permitiendo ver al tumor de forma normal y su fluorescencia durante los exámenes endoscópicos. De forma similar, en 1979, en un sistema de detección de fluorescencia se empleó un láser de iones de kriptón de una longitud de onda de 405 nm para excitar la porfirina durante la endoscopia [44]. Utilizando HpD y una lámpara de arco de mercurio filtrada para estudiar los tumores de vejiga, en 1983 Denson et al. demostraron una correlación positiva entre la fluorescencia de especímenes resecados y la presencia tumoral en exámenes histológicos [45, 46].

La primera sugerencia de que se podían combinar las propiedades de localización tumoral y fototoxicidad de las porfirinas como la HP y la HpD para producir un tratamiento efectivo para el cáncer fue hecha en 1972 en el *Lancet* por Diamond y sus colaboradores de San Francisco. El efecto de la luz para activar el HP fue estudiado en células de glioma, las cuales fueron expuestas a luz blanca durante un periodo de 50 minutos en presencia de HP [47].

En 1975, Dogherty y sus colaboradores en el instituto de cancerología Roswell Park en Buffalo, reportaron el primer caso de cura exitoso administrando HpD y activando el sensibilizador con luz roja. Los tumores fueron expuestos a luz roja de una lámpara de Xenón de arco en periodos de una a tres horas durante cinco días [48].

En 1976, Kelly y Snell procedieron al primer estudio de los efectos de la PDT en humanos, utilizando HpD en cinco pacientes con cáncer de vejiga, y en específico en un paciente con un carcinoma de vejiga recurrente, una vara de cuarzo se conectó a una lámpara de vapor de mercurio para fotoactivar el HpD e inducir la destrucción tumoral, donde la necrosis tumoral fue vista en el área iluminada mientras que el área no iluminada no se vio afectada [49].

1.3.5. Explosión en el interés de la PDT

En la figura 1.2 se muestra el total de artículos publicados sobre la PDT cada año desde 1970 hasta el año 2007 [3], donde se puede ver que a partir de 1985 se presenta un crecimiento exponencial en el número de publicaciones anuales referentes a la PDT. Este periodo cubre el descubrimiento del *ALA* (por sus siglas en inglés *Aminolevulinic Acid*) precursor de la *PpIX* (*Protoporphyrin IX*) como fotosensibilizador para la PDT en 1990, la primera aprobación normativa para el fotofrin como un tratamiento para el cáncer de vejiga en 1993, sucesivamente Estados Unidos aprueba el fotofrin como un tratamiento paliativo para pacientes con obstrucción de cáncer de esófago en 1995, y la aprobación del Fotofrin para la aplicación de una gran variedad de síntomas en pacientes con obstrucción endobronquial y en cáncer de pulmón. En 1999, la administración de alimentos y medicinas (FDA por sus siglas en inglés *Food and Drug Administration*), anuncio la aprobación del *Levulan Kerastic* (ácido aminolevulinico HCl) para ser usado en conjunto con la terapia fotodinámica para el tratamiento de queratosis actínica (lesiones precancerígenas en la piel) en la cara y cuero cabelludo.

En el año 2000 el VisudyneTM recibió la aprobación para el tratamiento de la degeneración macular (AMD), la principal causa de ceguera en personas mayores de 50 años en el mundo occidental. En el 2001, la FDA también aprobó la terapia con Visudyne para el tratamiento de neovascularización coroidal (CNV). En agosto del 2002, se concedió la autorización de comercialización en países europeos (por parte de la EMEA) para tratamientos en la degeneración macular oculta. En octubre del 2004, *QLT Inc.* reportó que el Visudyne había sido aprobado en más de 50 países. A finales del 2001 el Fosca[®] fue aprobado bajo las condiciones de la EMEA para tratamientos paliativos en pacientes con cáncer avanzado de cuello y cabeza. En el 2003, el fotofrin fue aprobado en los Estados Unidos para la ablación de displasia de alto grado asociada con el esófago de Barrett en pacientes que no fueron sometidos a esofagectomía (cirugía para extirpar parte o todo el esófago).

La combinación de muchos mecanismos innovadores en el estudio de la terapia fotodinámica como los son los nuevos estudios en animales en donde la PDT es aplicada a enfermedades no probadas hasta ahora y el incremento de intentos clínicos para establecer nuevos fotosensibilizadores, sugiere que el nivel de interés en la terapia fotodinámica seguirá manteniéndose en incremento en un futuro previsible [3].

1.4. Acción fotodinámica

El termino de acción fotodinámica (*photodynamische Wirkung*) fue introducido por primera vez en 1904, por Hermann von Tappeiner [50]. No está claro por qué lo llamo proceso dinámico, podría haber sido para distinguir este fenómeno biológico de las reacciones que tienen lugar en la fotografía, proceso que se había descubierto unos años antes. De hecho, von Tappeiner no estaba completamente satisfecho con su término, sin embargo, lo dejó a discreción de sus colegas [51].

Al sentir la necesidad de un término más correcto y descriptivo se trató de sustituir

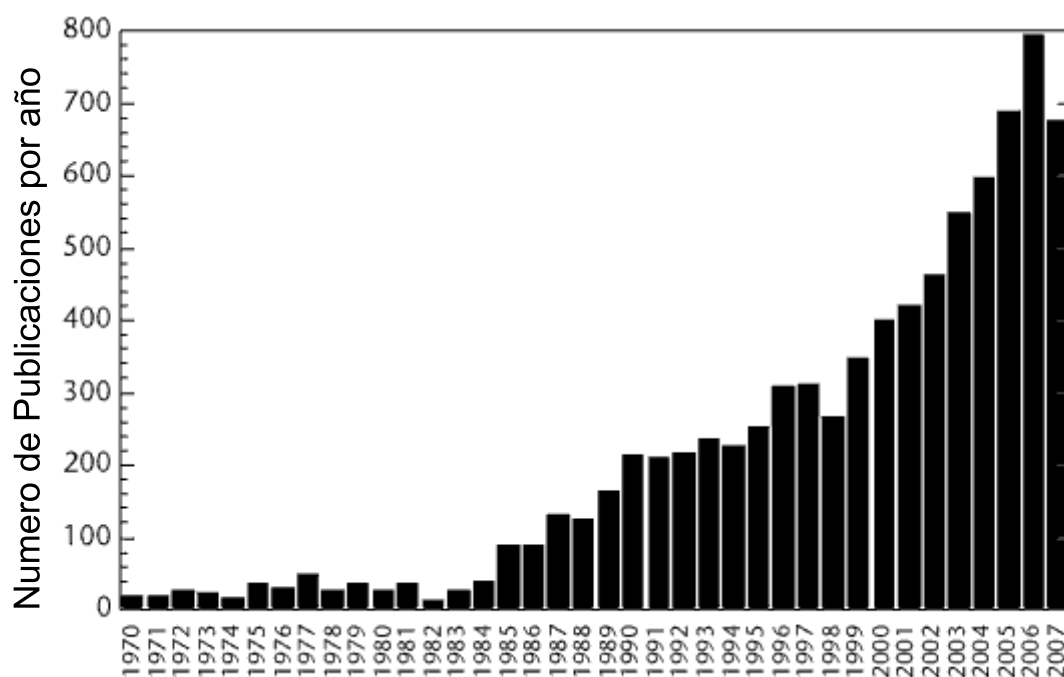


Figura 1.2: Número de artículos publicados sobre la PDT de 1970 al 2007

el término de terapia fotodinámica (PDT) por fotoquimioterapia (FCT) lo cual no se logró [52, 53]. Pudo haber varias razones para ello, sin embargo, fotoquimioterapia tiene una definición más amplia, ya que incluye procesos que no requieren oxígeno, Además, el prefijo PCT es una abreviatura de *porphyria cutanea tarda*, una enfermedad que implica fotosensibilidad. Sin embargo, el nombre de *fotoquimioterapia* habría allanado el camino para las aplicaciones clínicas, mejor que el nombre de *terapia fotodinámica*, ya que todos los oncólogos están familiarizados con la quimioterapia, mientras que el término de *fotodinámica* se pueden dar asociaciones a la *biodinámica*. Según la definición original, y de acuerdo a la recomendación que hace Harold Francis Blum (1899–1990), profesor de biología en la universidad de Princeton, el término acción fotodinámica debe ser únicamente utilizado para las reacciones fotosensibilizadas que requieren oxígeno [54].

También, cabe destacar que el oxígeno es el único implicado en la fotosensibilización de Tipo II, pero también suelen participar en la fotosensibilización de Tipo I. Una reacción de tipo I es una reacción de radicales o de redox (del acrónimo en inglés *reduction-oxidation reaction*) en el que un fotosensibilizante, excitado al estado triplete 3S , interactúa con moléculas vecinas (A) mediante el intercambio de un electrón o un átomo de hidrógeno [55]:



Dada por:



Ó



En ambos casos la oxidación está dada por A_{ox} , y una alternativa para la reacción de tipo I puede ser:



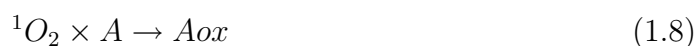
Dado por:



La reacción de la ecuación 1.4 puede seguir después de la reacción de la ecuación 1.5 y la reacción de la ecuación 1.2 puede seguir después de la reacción de la ecuación 1.6.

Las reacciones de tipo I también pueden ser independientes de oxígeno, un ejemplo de ello son las reacciones de psoraleno (Sustancia vegetal sensible a la luz UV) con el ADN.

Un proceso de fotosensibilización de tipo II es por definición un proceso de transferencia de energía. El proceso más común de Tipo II, es la oxidación a través de la formación de oxígeno singlete (1O_2) [55]:



Muchos autores utilizan la expresión de *acción fotodinámica* y de *terapia fotodinámica* como sinónimos con reacciones que implican 1O_2 e incluso con reacciones de tipo II, pero de acuerdo con las definiciones que se dan anteriormente esto no es estrictamente correcto. Sin embargo, en la mayoría de los casos prácticos, es aceptable ya que en la mayoría de los sensibilizadores para la *PDT* actúan a través del 1O_2 , el cual forma un proceso de intercambio electrónico [56].

1.5. Efecto fotodinámico.

Como se mencionó anteriormente la reacción fotoquímica que resulta del proceso fotodinámico puede ser caracterizada como reacción de tipo I o tipo II, sin embargo la mayoría de los fotosensibilizadores disponibles para la *PDT* utilizan procesos fo-

todinámicos de tipo II. El diagrama de los niveles de energía del proceso fotofísico en la terapia fotodinámica [57] se muestran en la figura 1.3.

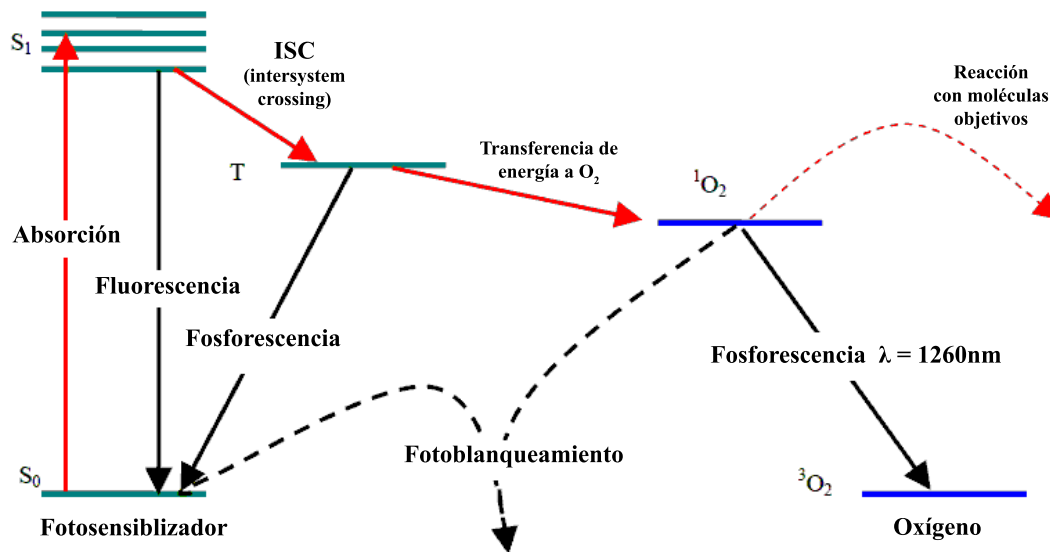


Figura 1.3: Proceso fotofísico en la terapia fotodinámica.

El proceso comienza con la absorción de un fotón por el fotosensibilizador en su estado basal (S_0) el cual pasa a un estado excitado (S_1 o estado singlete). Esta molécula sensibilizada puede regresar a su estado basal mediante la emisión de un fotón (*fluorescencia*) o alternativamente la molécula puede pasar a un estado triplete (T) mediante un proceso conocido como *ISC* (por sus siglas en inglés *intersystem crossing*), el cual representa la probabilidad de transición de un estado excitado singlete (S_1) a otro estado excitado triplete (T), por lo que una característica esencial para un buen fotosensibilizador es un alta eficiencia en la producción de *ISC* [58]. Una vez que la molécula del fotosensibilizador se encuentra en estado triplete (T) puede reaccionar directamente tanto con un sustrato por transferencia de un átomo de H como con un electrón para formar radicales libres (reacción tipo I) o, puede transferir energía a una molécula de oxígeno, excitándolo a su estado singlete altamente reactivo 1O_2 (reacción tipo II). El fotosensibilizador regresa a su estado basal, y el oxígeno cambia de su estado basal (estado triplete) a un estado excitado (estado singlete). Una vez que el oxígeno se encuentra en estado singlete reacciona de manera casi inmediata con las células diana (células tumorales). La mayoría de estas reacciones son irreversibles y lleva al consumo de oxígeno, este consumo de oxígeno es lo suficientemente eficaz para producir una disminución en la oxigenación del tejido cuando la intensidad de luz incidente es la adecuada. Además de estas reacciones con el tejido diana, el oxígeno en estado singlete puede reaccionar con el sensibilizador en sí, lo que puede llevar a una destrucción irreversible conocida como *fotoblanqueamiento*. El fotoblanqueamiento puede disminuir la eficiencia de la PDT ya que reduce la concentración del fotosensibilizador, sin embargo, también puede ser útil para la dosimetría de la

terapia. Debido a la alta reactividad el oxígeno en estado singlete tiene un tiempo de vida muy corto en el tejido, sin embargo, una fracción pequeña de oxígeno en estado singlete regresa a su estado basal mediante la emisión de fotones (fosforescencia) lo cual puede ser detectado ópticamente [57, 59, 60].

La eficiencia de la PDT en el tratamiento de cáncer depende del tipo de fotosensibilizador, la concentración del mismo, la localización intracelular, la dosis y tiempo de irradiación así como la disponibilidad del oxígeno [61].

1.6. Fotosensibilizadores

La hematoporfirina derivativa (HpD) y su versión purificada Photofrin[®] fueron los primeros fotosensibilizadores investigados clínicamente para ser usados en la terapia fotodinámica. Sin embargo, estos componentes son producto de una gran mezcla de monómeros, dímeros y oligómeros mayores, los cuales mostraban una sensibilidad cutánea a largo plazo y mostraban una pobre absorción. Para superar estos problemas, un conjunto de fotosensibilizadores de segunda generación como clorinas, bacterioclorinas y ftalocianinas se han estado desarrollando por diferentes laboratorios. Algunos de los compuestos a base de porfirinas son : Levulan[®] Radachlorin[®], Visudyne[®], Fosca[®], entre otros, los cuales han sido aprobados por varias organizaciones de la salud para indicaciones cancerígenas y no cancerígenas.

Los fotosensibilizadores son uno de los elementos clave en la terapia fotodinámica. Después de la aprobación del photofrin[®] para tratamientos en la terapia fotodinámica, investigadores de todas partes del mundo se han dedicado al desarrollo de fotosensibilizadores más eficientes. Un fotosensibilizador ideal deberá cumplir los siguientes requisitos [3]:

1. Este debe ser capaz de producir el singlete de oxígeno de una forma eficiente, ya que el singlete de oxígeno y la reacción fotoquímica provocan la mayoría de la lesiones durante el proceso de la terapia fotodinámica.
2. Este deberá tener un alto coeficiente de absorción en un ancho de banda de 600 a 800 *nm*.
3. Este no deberá presentar toxicidad en la oscuridad.
4. Debe presentar una acumulación selectiva en el tejido tumoral, preferentemente la retención debe ser en el tumor y la acumulación y la eliminación deben ser rápidas, con el fin de minimizar la fototoxicidad de la piel.
5. La distribución del fotosensibilizador es importante en el proceso de la terapia fotodinámica, la cual está influenciada por su estructura química. Es particularmente útil si las moléculas del fotosensibilizador son anfífilas, es decir solubles en agua, lo cual facilita el cruce de las membranas celulares.
6. Este debe ser estable y fácil de disolver en soluciones inyectables.

De forma general el fotosensibilizador ideal debe ser un fármaco o pro-fármaco químicamente puro, biológicamente estable, con retención selectiva en el tejido blanco y no así en tejidos sanos o bien que en estos últimos su toxicidad sea menor [61, 62].

Entre los fotosensibilizadores existentes, es de particular interés el ácido 5 - aminolevulínico (*ALA*), un precursor de la síntesis del grupo hemo, también conocido como ácido delta aminolevulínico o ácido 5-amino-4-oxo-pentanoico, es un pro-fármaco que administrado exógenamente induce la acumulación rápida de la protoporfirina IX (*PpIX*), el ALA ha sido usado tanto experimentalmente como clínicamente en la PDT [63].

La formación del ALA es el primer paso identificado en la biosíntesis de tetrapirroles o porfirinas, las porfirinas son un grupo de moléculas esenciales en la vida de las células, tales como: la clorofila que cataliza la conversión de energía solar a energía química en el proceso de fotosíntesis, la hemoglobina para la respiración fisiológica o los citocromos que involucran el transporte de electrones [64].

1.7. Fuentes de luz

Históricamente los requerimientos de las fuentes de luz para la PDT clínica solo fueron cubiertos por láseres KTP y de argón (figura 1.4), los cuales generaban una irradiación dentro de la banda de absorción del fármaco y entregaban una energía suficiente en tiempos de tratamiento razonables. Los láseres permitieron estudiar diversos fotosensibilizadores sin la necesidad de incurrir en los costos exorbitantes de diversos dispositivos para el estudio de cada fármaco. El ancho de banda típico de estos láseres es menor a $<1\text{nm}$ y si la emisión del láser es alineada correctamente con el centro del ancho de banda de absorción del fotosensibilizador esto resulta en una activación óptima del fotosensibilizador. Para aplicaciones de la PDT intersticial o en cavidades, una ventaja significativa de los láseres, es la facilidad de acoplamiento óptico a fibras ópticas con pérdidas aceptables. [65, 66].

1.7.1. Láseres de Argón

Los láseres de argón se encuentra entre las fuentes de luz más populares en aplicaciones de la PDT, pueden irradiar en 13 longitudes de onda distintas, entre las que se encuentran 488 y 514 *nm* [67]. Estos láseres requieren de un alto nivel de mantenimiento técnico, ya que su alineamiento es crítico necesitan una constante alineación. Pueden irradiar con una densidad de potencia poco mayor a 1 W/cm^2 , su espectro de emisión tiene un ancho de banda de 5 a 10 *nm*. Los láseres de argón acoplados a fibras ópticas han sido utilizados principalmente para el tratamiento de cáncer de pulmón, esófago y vejiga [68, 69, 70]. El haz directo y expandido de los láseres de argón ha sido utilizado para la PDT en tratamiento de cáncer de piel y neoplasia de vulva [71]. Los láseres de argón son especialmente indicados para la PDT endoscópica debido a que su haz de salida tiene una sección transversal muy pequeña ($< 1\text{ mm}$) y puede ser fácilmente acoplada a fibras ópticas [72].



Figura 1.4: Laser KTP

1.7.2. Láseres de colorante bombeados por láser vapor metálico

Estos láseres son una elección popular para la PDT, principalmente entre investigadores europeos. Los láseres de vapor metálico bombeados por láseres de colorante normalmente son de emisión pulsada, con anchos de pulsos de 10 a 50 ns en una frecuencia de 1 KHz , lo cual hace que la emisión de la fuente sea casi continua. El láser de bombeo proporciona una haz de salida de gran potencia que sirve para excitar un láser de colorante sintonizado en la región espectral donde la absorción de los fotosensibilizadores es mayor. Los láseres de vapor metálico bombeados por láseres de colorante son capaces de irradiar con una densidades de potencia de unos cientos de mW/cm^2 . Estos láseres pueden ser acoplados a fibras ópticas para la PDT intersticial y debido a que emiten con una sección transversal larga ($1-3\text{ cm}^2$) puede ser utilizado para lesiones en la piel sin necesidad de expandir el haz [73, 74].

1.7.3. Láseres de estado sólido

Los láseres de estado sólido como el láser de Nd:YAG son implementados de forma similar a los láseres de argón y de vapor metálico bombeados por láser de colorante. Sin embargo ofrecen un diseño más compacto lo cual es una gran ventaja para uso clínico y de laboratorio. Normalmente su emisión de salida es pulsada en el orden de MHz con anchos de pulso de sub-nanosegundos. La frecuencia doblada de un láser de Nd:YAG ($532,266\text{ nm}$) puede ser usada para bombear un láser de colorante y obtener un haz en el ancho de banda donde la absorción de los fotosensibilizadores es mayor. Los láseres de Oscilador paramétrico óptico **OPO** (por sus siglas en inglés Optical Parametric Oscillators Lasers), son láseres de emisión pulsada y pueden irradiar con densidades

de potencias de varios cientos de mW/cm^2 . Mediante dobladores de frecuencia y mezcladores de ondas se puede tener acceso a un gran número de longitudes de ondas monocromáticas diferentes desde el ultravioleta hasta el infrarrojo cercano. Los láseres de estado sólido han sido utilizados en la PDT para el tratamiento de lesiones en piel, cáncer de esófago, precáncer bucal, y cáncer de pulmón y vejiga.

1.7.4. Diodo láser

La introducción del diodo láser redujo de forma significativa el rol de los láseres KTP y de argón en la PDT clínica, hoy día el diodo láser tiene un uso preferencial debido a su bajo costo, a su operación con circuitos eléctricos estandarizados y a su eficiencia en el acoplamiento con fibras ópticas de diámetros pequeños. Los diodos láser para aplicaciones en la PDT están hechos de AlGaIn/GaAs (635 – 700 nm) o de AlInAsP/GaAs (780 – 1000 nm) [75]. Los láseres de semiconductores son extremadamente compactos sin perder su alto rendimiento, además pueden ser usados en modo continuo y pulsado.

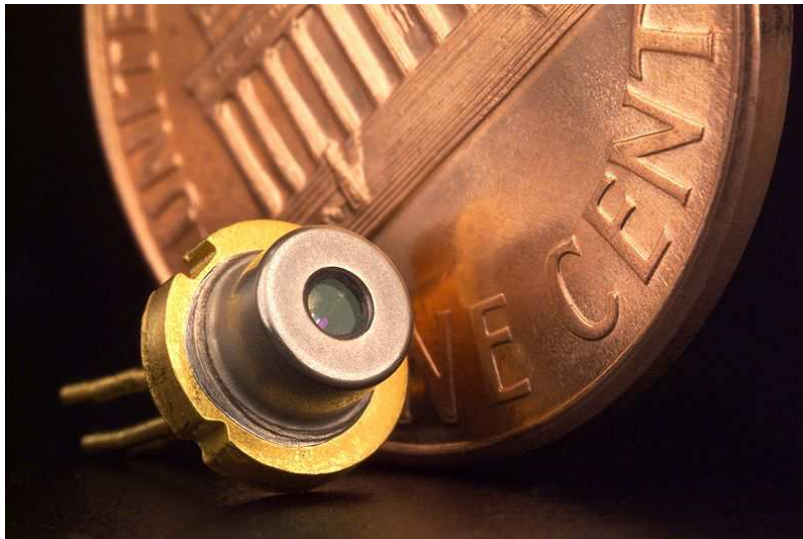


Figura 1.5: Diodo láser

1.7.5. Lámparas

Los láseres no son la única opción para la PDT. En varios entornos clínicos, utilizan lámparas de alta potencia con filtros como fuentes de luz para la PDT. Generalmente su mantenimiento es fácil y barato. En comparación con los láseres las lámparas emiten con un espectro de luz más ancho por lo que se requiere una combinación de filtros. Con filtros de banda estrecha se selecciona dentro de 10 nm la longitud de onda de irradiación, además se utilizan filtros para reducir el paso de la radiación UV, asociada con la salida de la lámpara, y filtros para reducir la emisión de la radiación

infrarroja asociada con el filamento de la lámpara. El uso de lámparas en la PDT se limita a lesiones en la piel [76].

Lámparas de tungsteno

Estas son esencialmente fuentes incandescentes, donde se eleva la temperatura en filamento de tungsteno aproximadamente a $3000^{\circ}K$. A esta temperatura hay una cantidad considerable de radiación óptica emitida desde el ultravioleta hasta el infrarrojo. El uso de estas lámparas en la PDT fue presentado por Pottier y Kennedy, realizando experimentos en animales utilizando la salida filtrada de un proyector de diapositivas [77]. Estas lámparas pueden entregar densidades de potencias ópticas mayores a 250 mW/cm^2 en un amplio espectro ($350\text{-}850\text{ nm}$). Una única longitud de onda puede ser seleccionada utilizando combinaciones de filtros. Las lámparas de tungsteno han sido utilizadas principalmente en PDT tópica con ALA [72].

Lámparas de arco de Xenón

En estas lámparas, la radiación es proporcionada por un arco eléctrico que se forma entre los electrodos en la presencia de vapor de xenón. Las lámparas de arco de Xenón son otra posible fuente de luz para la PDT. Se caracterizan por un amplio espectro de emisión ($300\text{ - }1200\text{ nm}$) y por su alto rendimiento (hasta $8W$ para la exposición directa) entregando densidades de potencias de de varios cientos de mW/cm^2 de igual forma utilizan combinaciones de filtros para seleccionar la longitud de onda con la que se desea irradiar. Estas fuentes se han utilizado principalmente para la PDT en el tratamiento de cáncer de piel de tipo no melanoma y otros trastornos de piel [78, 79].

Lámparas de halogenuros metálicos

Estas lámparas se componen de una mezcla de vapor de mercurio y halogenuros metálicos que se encienden por una descarga eléctrica. Esto produce un espectro de emisión amplio donde la emisión depende del gas utilizado para llenar el bulbo. Estas fuentes de luz son otro ejemplo de las lámparas de banda ancha que se pueden utilizar para la PDT. La selección de la banda de frecuencias a la que emiten se puede lograr con filtros, con los que se obtiene una salida en un ancho de banda espectral en un intervalo de $590\text{ a }720\text{ nm}$. Las lámparas de halogenuros metálicos pueden lograr densidades de potencias entre $10\text{ y }250\text{ mW/cm}^2$ y se pueden tratar áreas potencialmente grandes (mayores a 20 cm de diámetro). Estas fuentes se han utilizado principalmente para la PDT en el tratamiento de lesiones superficiales [74].

Lámpara de sodio con recubrimiento de fósforo

El principio de funcionamiento de estas lámparas es similar a las lámparas de halogenuro metálico donde se produce una descarga eléctrica en presencia de vapor de sodio. Emiten una radiación óptica en un ancho de banda entre $590\text{ y }670\text{ nm}$ y

logran densidades de potencia de hasta 100 mW/cm^2 , y pueden ser usadas en la PDT para tratar áreas mayores a 100 cm^2 [72].

Lámparas fluorescentes

Las lámparas fluorescentes para la PDT tiene un ancho de banda de 30 nm y su emisión máxima se encuentra cerca de 417 nm . La potencia de salida de las lámparas fluorescentes es de sólo 10 mW/cm^2 , pero su facilidad de uso puede ser atractivo para los entornos clínicos. Sus características espectrales coinciden con la absorción de la protoporfirina IX y su uso se ha limitado a PDT con ALA aplicado de forma tópica. Sin embargo, el tratamiento con estas lámparas se limita a las lesiones de piel muy superficial ya que la penetración de la luz entre 400 y 450 nm es aproximadamente de 300 a $400 \mu\text{m}$ [80].

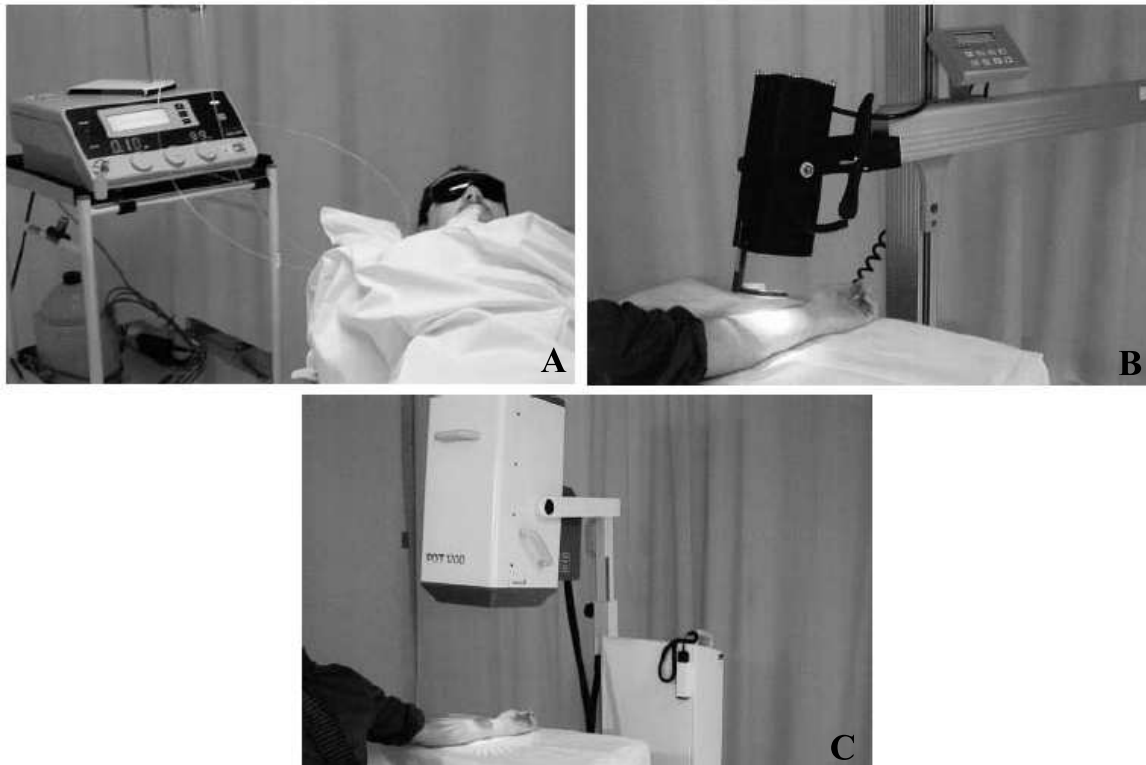


Figura 1.6: (a) Example of operating diode laser (Diomed 630); (b) example of operating tungsten filament lamp (Photocure); (c) example of metal halide lamp (Waldmann PDT 1200).

1.7.6. LED´s

En muchas aplicaciones los diodos emisores de luz (LED´s) ofrecen una alternativa más barata y versátil que los láseres o diodos laser, ya que existen en un rango de

emisión desde el ultravioleta hasta el infrarrojo con un ancho de banda de $5 - 10 \text{ nm}$ y una potencia de salida de hasta 10 W . Actualmente existen varios distribuidores de dispositivos con LED's para la terapia fotodinámica como; Omnilux Light Therapy, Stocker Yale Inc., Light Science Oncology, Biospec, Photocure entre otros (véase la figura 1.8). Sin embargo, actualmente no existen estándares para los fabricantes para poder validar las dosis o la distribución espacial de la irradiación [81]. Además, cabe señalar que ninguno de los dispositivos reportados en la literatura contemplan los efectos fototérmicos que se inducen durante la terapia.

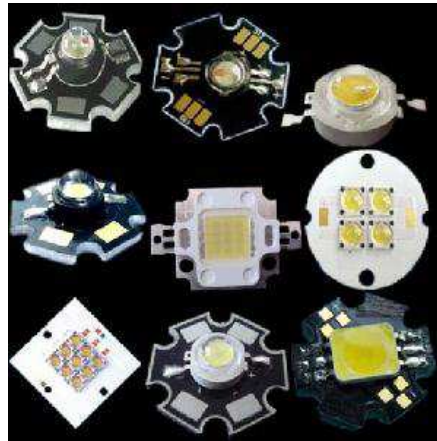


Figura 1.7: LED's de alta potencia

Los LED's ante todo se han usado clínicamente para el tratamiento de enfermedades malignas y no malignas de la piel y mucosa oral. En el caso de tumores malignos, la terapia solo se considera para tumores menores a 3 mm de espesor, empleando intensidades de irradiación en un rango de 30 a 100 mW/cm^2 [82].

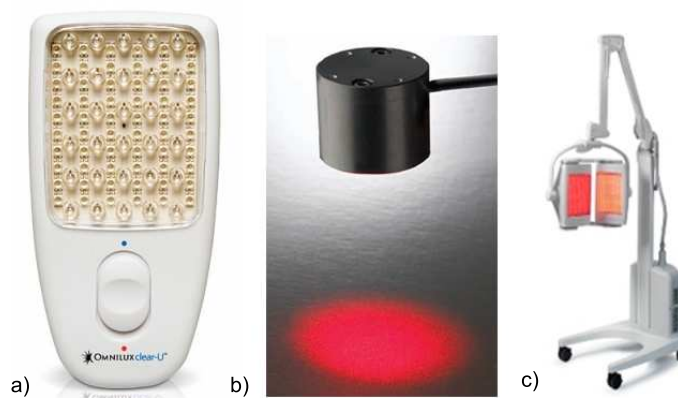
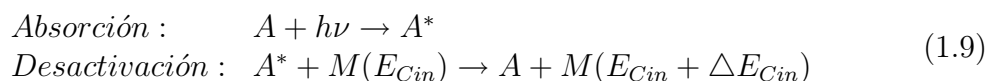


Figura 1.8: Fuentes comerciales para la PDT, a) Omnilux, b) Stocker Yale Inc. c) Photocure

1.8. Efecto fototérmico

Los efectos térmicos en la piel se consideran con el incremento de la temperatura, los cuales pueden ser inducidos tanto con radiación continua como pulsada. Mientras los procesos fotoquímicos como la PDT son comúnmente gobernados por una reacción específica, los efectos térmicos tienden a ser procesos no específicos de acuerdo con Parrish y Deutsch. Sin embargo, dependen de la duración y el valor máximo de la temperatura lograda en el tejido [83].

Los efectos térmicos tienen su origen en la absorción que ocurre en las bandas rotacionales de las moléculas seguido de un decaimiento no radiativo. La reacción en una molécula objetivo A puede ser considerada como un proceso de dos pasos. Primero, la molécula absorbe un fotón de energía $h\nu$ llevando a la molécula a un estado excitado A^* , y segundo, se generan colisiones inelásticas con moléculas circundantes M llevando simultáneamente a la desactivación de A^* y al incremento de la energía cinética. Por lo tanto, el aumento de la temperatura se origina por la transferencia de energía del fotón a energía cinética. Dicho proceso puede ser escrito como:



La extensión espacial y el grado de daño tisular dependen principalmente de la magnitud, el tiempo de exposición y el lugar de colocación del calor. Sin embargo, la cantidad de energía del fotón transferida a las moléculas del tejido, no solo depende de los parámetros de la fuente de irradiación como longitud de onda, densidad de potencia, tiempo de exposición y tamaño del spot. También, tiene una alta dependencia con las propiedades del tejido como los coeficientes de absorción y esparcimiento del mismo [83].

En tejido biológico, la absorción se presenta principalmente por las moléculas libres del agua, proteínas, pigmentos y otras macromoléculas como la melanina y la hemoglobina. El coeficiente de absorción tiene una gran dependencia con la longitud de onda de la irradiación incidente. En las interacciones térmicas, la absorción por las moléculas de agua juega un rol importante ya que es un constituyente importante en el tejido. El espectro de absorción del agua se muestra en la figura 1.9.

En los seres humanos, el incremento de la temperatura corporal $<41.8^\circ\text{C}$ se define como la fiebre y es reconocida como una función fisiológica básica que contribuye a la supervivencia. La temperatura corporal por encima de 44°C por períodos >60 minutos conduce a la desnaturalización de proteínas, que culmina en la muerte celular. Sin embargo los efectos de hipertermia se producen cuando la temperatura corporal es $>41^\circ\text{C}$ por períodos >60 minutos.

El intervalo de temperatura entre la fiebre beneficiosa y la hipertermia nociva $41^\circ\text{C} - 44^\circ\text{C}$, es el rango de temperatura donde la terapia de hipertermia clínica puede ejercer un papel terapéutico (véase la figura 1.10) para la destrucción de tejido maligno [2].

Tomado en cuenta la ventana terapéutica térmica para el tratamiento del cáncer el

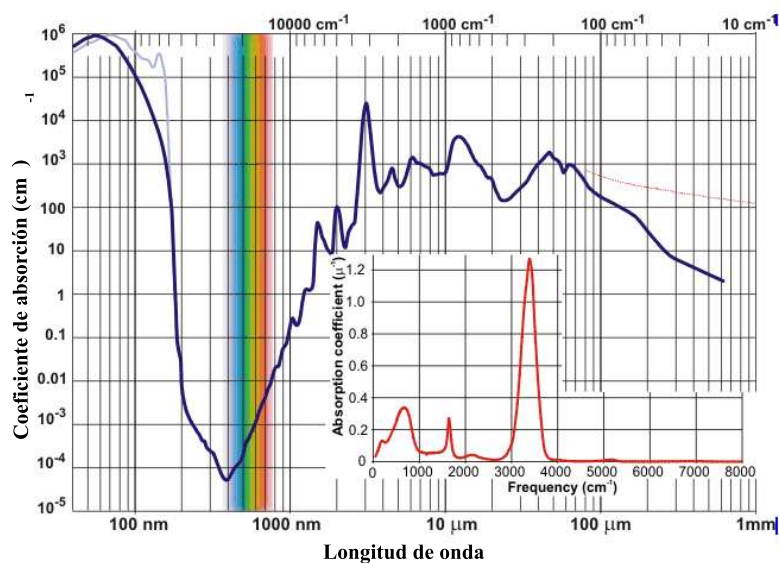


Figura 1.9: Espectro de absorción del agua [1]

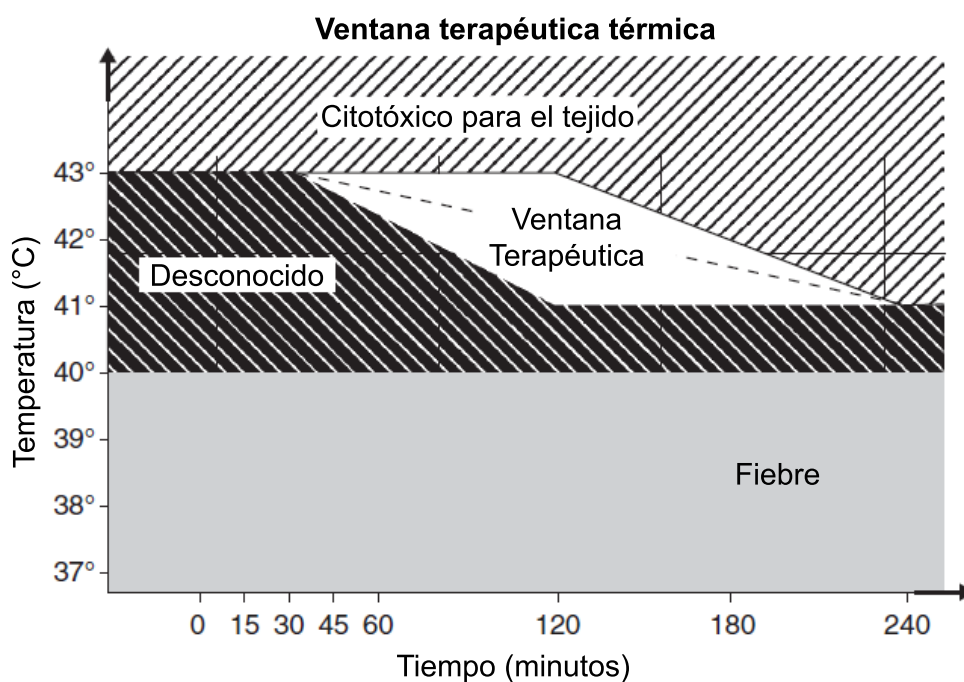


Figura 1.10: Ventana terapéutica para el tratamiento del cáncer [2]

tener un control de la temperatura en la muestra o tejido irradiado se vuelve un factor importante para determinar si la eficiencia de la terapia está determinada únicamente por los efectos fotodinámicos, los efectos de hipertermia o la sinergia entre ambos.

Capítulo 2

Sistema desarrollado

En la figura 2.1 se muestra el diagrama de bloques del sistema desarrollado. El sistema está formado por un LED de 5 W de potencia, una fuente de excitación, un regulador de voltaje *LM7805*, un regulador de corriente (*BP7021*), un microcontrolador, un teclado matricial, un amplificador de instrumentación para termopares y un display de 16 segmentos.

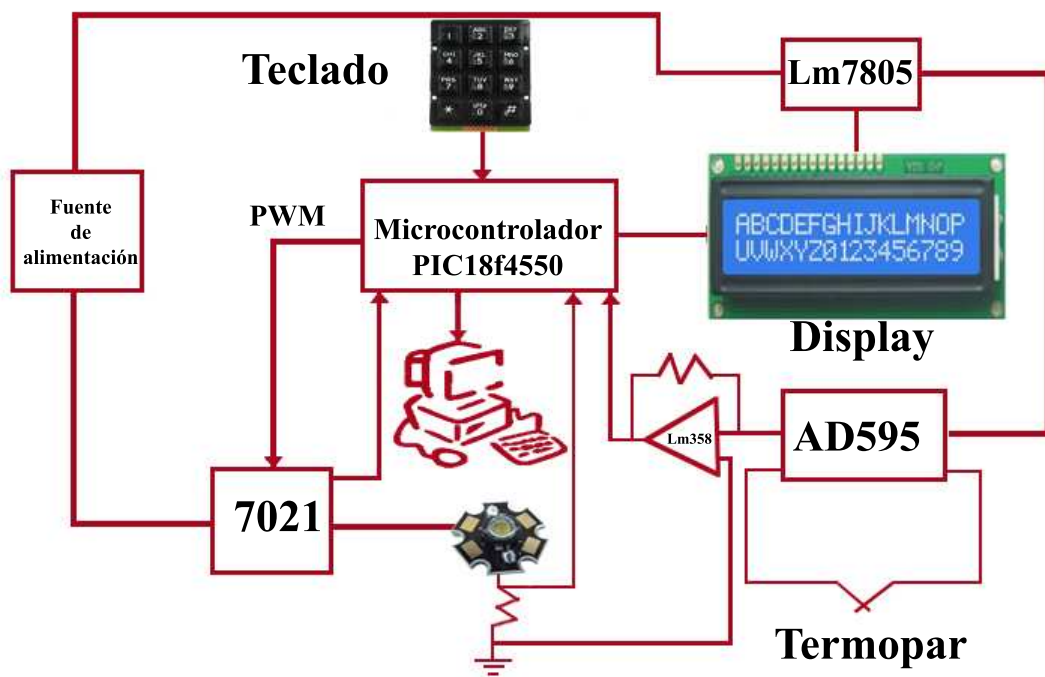


Figura 2.1: Diagrama a bloques del sistema desarrollado

Para la construcción del sistema es necesario considerar diversos parámetros que se ven involucrados en la PDT como son: el espectro de absorción del tejido, el espectro de absorción del fármaco, las densidades de potencia a las que se desea irradiar, el área a irradiar, los tiempos de irradiación y que al irradiar el tejido con una densidad de energía superior a $100mW/cm^2$ pueden producirse efectos de hipertermia. Tomando en cuenta estos parámetros y para un mejor entendimiento del desarrollo del sistema se ha separado en los siguientes módulos:

- Consideraciones previas
- Fuente de luz (*LED*).
- Fuente de alimentación regulable (adecuada para el LED).
- Control de tiempo de irradiación.
- Sistema óptico.
- Control de temperatura.

2.1. Consideraciones previas

En el tejido Biológico, la absorción se debe a las moléculas de agua y a las macromoléculas como las proteínas y los pigmentos. Mientras que en la región del infrarrojo la absorción se atribuye principalmente a las moléculas del agua, las proteínas y los pigmentos absorben en el rango del espectro electromagnético del ultravioleta y el visible. Las proteínas en particular tienen un pico de absorción aproximadamente de $280nm$, de acuerdo con *Boulnois (1968)*.

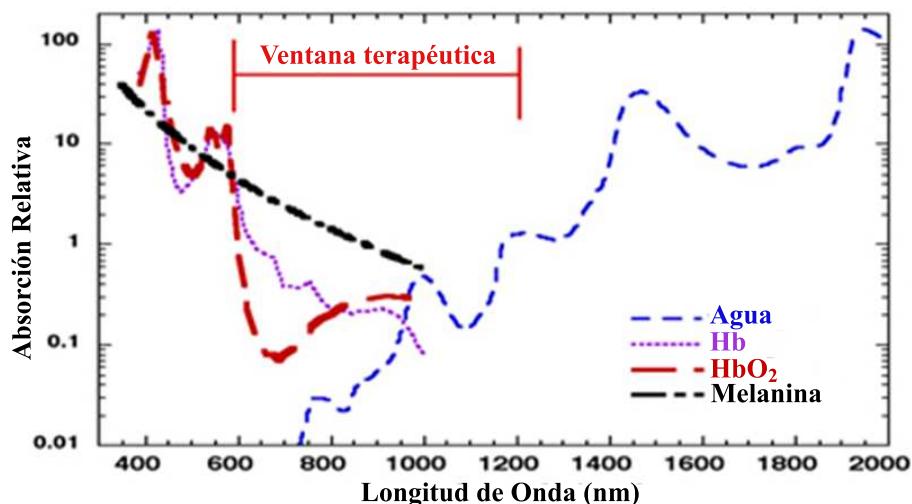


Figura 2.2: Espectro de absorción del tejido [1]

En la figura 2.2 se muestra el espectro de absorción de los principales componentes del tejido biológico [1]. La melanina es el pigmento básico de la piel y es por mucho el cromóforo epidérmico más importante, su espectro de absorción incrementa a través del visible hasta el espectro ultravioleta. La hemoglobina predomina en el tejido vascularizado y tiene picos de absorción relativos alrededor de 280 nm , 420 nm , 540 nm y 600 nm . Debido a que ni las macromoléculas ni el agua tienen una fuerte absorción en el infrarrojo cercano se delimita una *ventana terapéutica* entre 600 nm y 1200 nm . En este intervalo espectral la radiación penetra el tejido biológico con menos pérdidas, esto permite tratamientos a mayor profundidad tisular [83].

El sistema será utilizado para aplicar la PDT utilizando como fármaco el ALA (*ácido 5 - aminolevulínico*), precursor de la *PpIX* que es el fotosensibilizador, y cuyo espectro de absorción se muestra en la figura 2.3, donde se puede observar que presenta varias bandas de absorción una en la zona del ultravioleta conocida como *Banda de Soret* o banda *B* y cuatro bandas más en la región del visible (Banda Q). Aunque la absorción es mayor en la banda de *Soret* la profundidad de penetración en el tejido es mayor en 630 nm ya que se encuentra dentro de la ventana terapéutica del tejido [3].

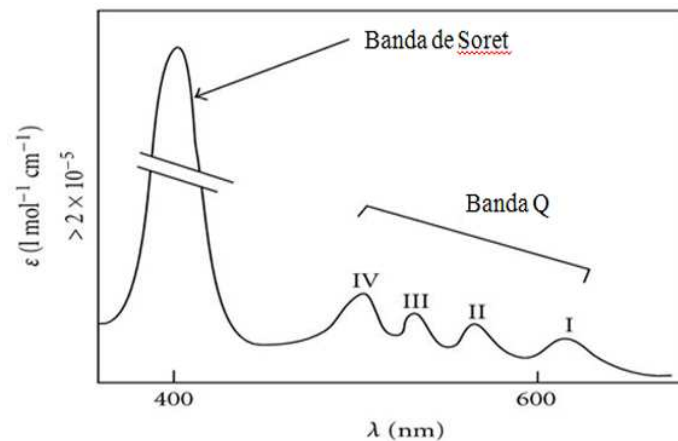


Figura 2.3: Espectro de absorción del la PpIX [3]

La densidad de energía es producto de la densidad de potencia incidente sobre el tejido por el tiempo (J/cm^2). Se debe considerar que con dosis de energía demasiado bajas se produce un daño tisular subletal que puede ser reparado, mientras que a dosis demasiado altas se produce un agotamiento de oxígeno que disminuye la eficacia terapéutica. Por tanto, es necesario ajustar la dosis de energía de la luz para cada fuente utilizada y para cada tipo de patología. La densidad de energía máxima requerida es de 250 J/cm^2 en tiempos de irradiación de 10 a 15 minutos y en una área circular de aproximadamente 1 cm de diámetro.

Tomando en cuenta que:

$$D = \frac{W \times T}{A} \quad (2.1)$$

Donde:

D = Densidad de energía
W = Densidad de potencia
T = Tiempo en segundos
A = Área de la superficie

Se obtienen los valores de las potencias necesarias para lograr densidades de energía de $250 J/cm^2$ y $150 J/cm^2$ en tiempos de 10 a 25 minutos. En la tabla 2.1 se puede ver que la densidad de potencia óptica máxima requerida es de $416 mW/cm^2$.

Tiempo (min)	$D = 150 J/cm^2$	$D = 250 J/cm^2$
10	$250 mW/cm^2$	$416 mW/cm^2$
15	$166 mW/cm^2$	$277 mW/cm^2$
20	$125 mW/cm^2$	$208 mW/cm^2$
25	$100 mW/cm^2$	$166 mW/cm^2$

Tabla 2.1: Densidades de potencias requeridas para obtener densidades de energía de $250 J/cm^2$ y $150 J/cm^2$

2.2. Fuente de luz (*LED*)

Para la construcción del sistema se utilizaron dos LED's *Luxeon Star LED* y *Pro light Opto LED* de 1 y 5 watts de potencia óptica respectivamente, los cuales fueron probados y comparados.

El fabricante del LED *Luxeon Star* especifica que el dispositivo opera con una corriente máxima de $385 mA$, alcanza una potencia máxima de $1W$ y emite a una longitud de onda de $625 nm$. Su respuesta en potencia respecto a la corriente de alimentación se puede ver en la figura 2.4.

EL fabricante del LED *Prolight Opto* especifica que el dispositivo opera con una corriente máxima de $1000mA$, alcanza una potencia máxima de $5W$ y emite en un ancho de banda 620 a $640nm$. Su respuesta en potencia respecto a la corriente de alimentación se puede ver en la figura 2.5.

Debido a que se necesita ya la mayor potencia óptica, es fácil elegir como fuente de luz para el sistema el LED *Prolight Opto*. Su espectro de emisión se midió con el espectrómetro *HR4000CG* de *Ocean Optics* el cual tiene un rango de medición de $200 nm$ a $1100 nm$ y cuenta con una resolución de $0.5 nm$. Este se puede observar en la figura 2.6, el pico máximo de emisión se encuentra en $624 nm$.

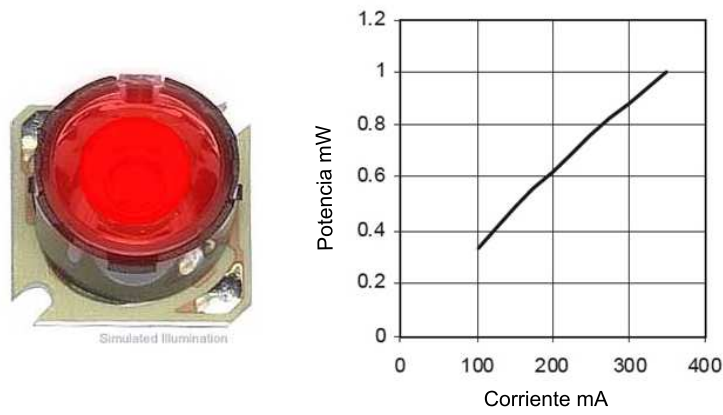


Figura 2.4: Potencia relativa contra corriente Luxeon Star LED 1W

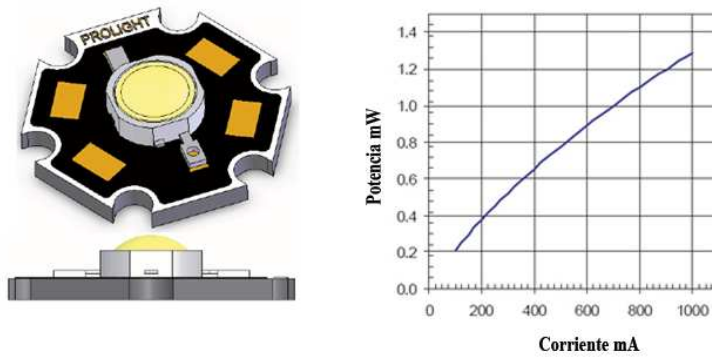


Figura 2.5: Potencia relativa contra corriente Pro light LED 5W

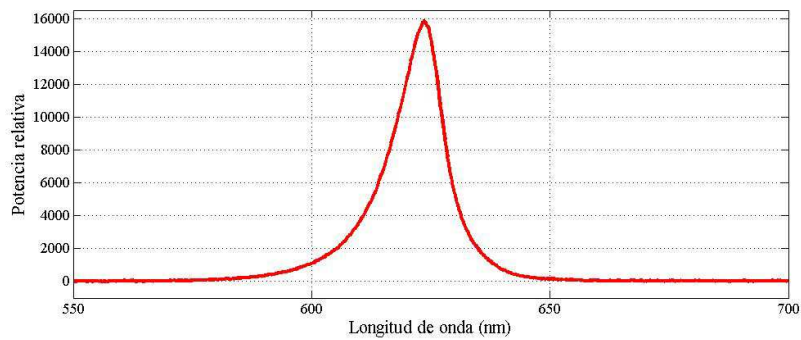


Figura 2.6: Espectro de emisión del LED Pro light Opto

2.3. Fuente de alimentación

Para controlar la potencia con la que emite el LED es necesario controlar la corriente que circula a través de este, por lo cual, para polarizar el LED se construyó una fuente de corriente variable. Se utilizó el regulador *LM317* en su configuración regulador de corriente (Figura 2.7).

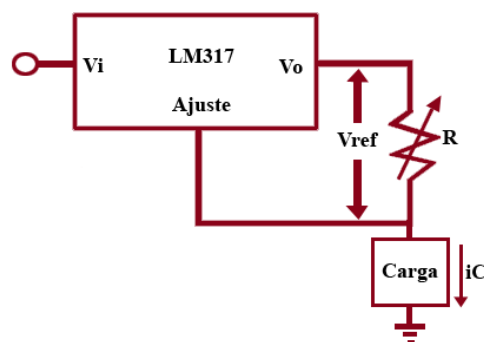


Figura 2.7: *LM317* configuración regulador de corriente

En esta configuración el regulador genera un voltaje de referencia (V_{ref}) de $1.25V$ entre la terminal de salida (V_o) y la terminal de ajuste. Debido a que la terminal de ajuste se encuentra en el orden de μA , esta se puede considerar despreciable. Así, la corriente que circula por la carga está dada por:

$$I_C = \frac{V_{ref}}{R} = \frac{1.25}{R} \quad (2.2)$$

Donde el valor de la resistencia R , permite controlar la magnitud de la corriente que circula a través del LED. Su estabilidad en el tiempo se puede observar en la figura 2.8, donde se puede ver que se obtiene una corriente máxima de 900 mA y presenta pequeñas variaciones de hasta 5 mA .

2.3.1. Regulador de corriente *Buckplus 7021 D-E 1000*

Una opción más viable es utilizar reguladores de corriente de uso específico para LED's. Tomando en cuenta las características del LED Prolight Opto, se utiliza el driver *Buckplus 7021 D-E 1000* de LUXDRIVE (véase la figura 2.9), el cual es un regulador lineal de corriente para LED's de alta potencia y nos permite regular la corriente de 0 a 1100 mA .

La eficiencia del driver *Buckplus 7021 D-E 1000* se muestra en la figura 2.10 la cual es proporcionada por el fabricante, sin embargo para conocer el voltaje óptimo de operación, el driver se somete a una prueba donde es alimentado con una fuente variable de voltaje entre $0V$ y $10V$, debido a que no se requiere de un mayor voltaje

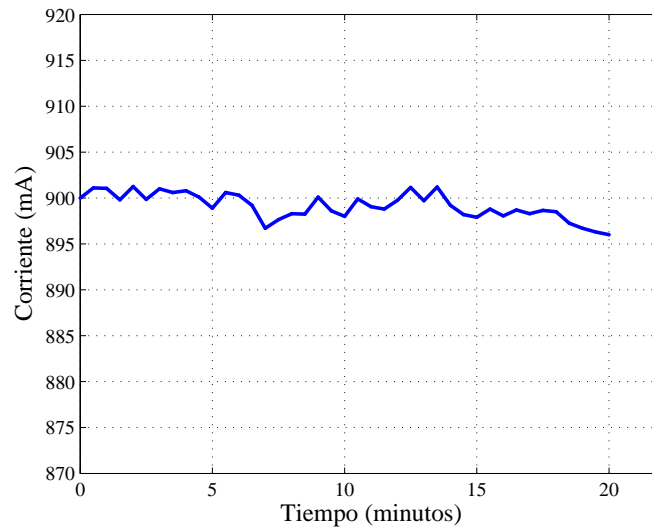


Figura 2.8: Respuesta de la corriente en el tiempo del *LM317* en configuración regulador de corriente

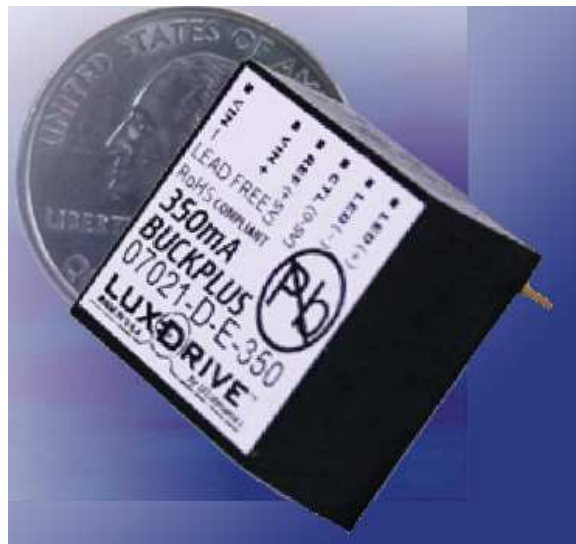


Figura 2.9: Imagen *Buckplus 7021 D-E 1000* de LUXDRIVE

para alimentar el LED. La respuesta de la corriente de salida respecto al voltaje de alimentación en el driver Buckplus 7021 D-E 1000 se muestran en la figura 2.11, donde se puede observar que presenta una buena estabilidad en la corriente de salida con un voltaje de alimentación entre 6.8V a 10V. Tomando en cuenta el rango de estabilidad en el que opera el driver Buckplus 7021 D-E 1000 este es alimentado con 8.5V

El driver Buckplus 7021 D-E 1000 de Luxdrive permite diferentes configuraciones para regular la corriente de salida que circulará por el LED, sin embargo, conforme a las necesidades del sistema se prueban 2 configuraciones diferentes.

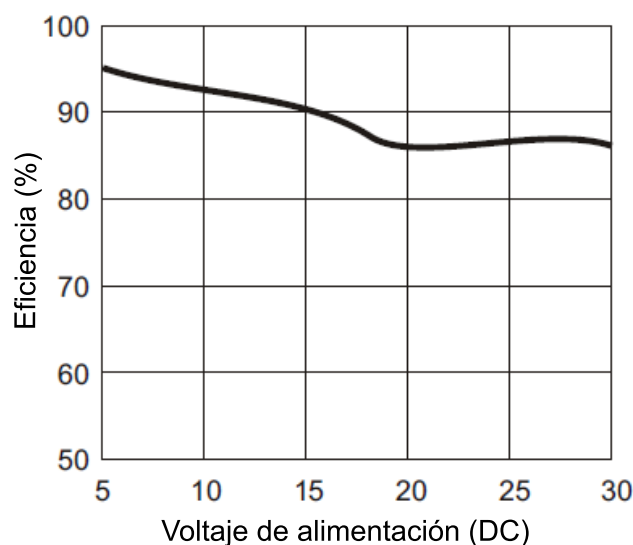


Figura 2.10: Eficiencia Buckplus 7021 D-E 1000

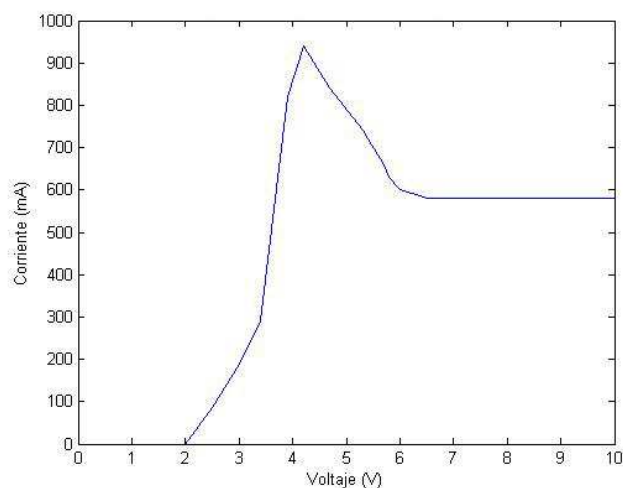


Figura 2.11: Respuesta de corriente respecto al voltaje de alimentación del Buckplus 7021 D-E 1000

Control externo mediante un potenciómetro

En la figura 2.12 se muestra la configuración externa del Buckplus 7021 D-E 1000 de Luxdrive el cual usa un potenciómetro lineal de $5K\Omega$. El potenciómetro es conectado entre la salida de la referencia interna de $5V_{DC}$ y la entrada de control del driver. Esta configuración presenta la desventaja de no tener una buena resolución en el control de la corriente, ya que la resolución está dada por la precisión que tenga el potenciómetro, por otro lado ya que se desea tener un control de potencia, tiempo y temperatura, es necesario controlar la corriente de forma digital.

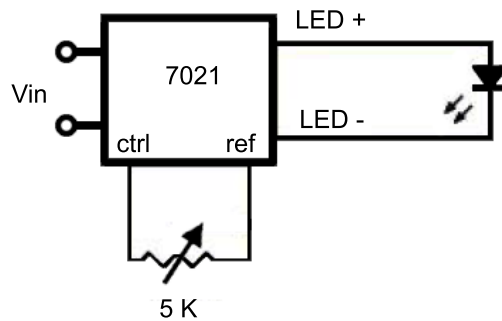


Figura 2.12: Configuración Buck Plus con control externo mediante potenciómetro

Control externo mediante un microcontrolador

Para controlar de forma digital y más precisa la corriente que circula por el LED se utiliza la configuración del Buckplus 7021 D-E 1000 de Luxdrive mostrada en la figura 2.13, en la cual se utiliza un microcontrolador (Pic18F4550), cuya utilización brinda gran facilidad y flexibilidad en la programación, fiabilidad, sencillez circuital y bajo costo.

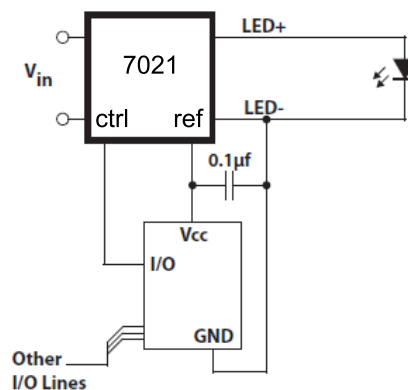


Figura 2.13: Configuración Buck Plus con control externo mediante un microcontrolador

El microcontrolador permite controlar la corriente que circula por el LED mediante la implementación del modulo *CPP* en su configuración de modulación de ancho de pulso *PWM* (por sus siglas en inglés *Pulse Width Modulation*), la cual permite obtener una señal periódica en la que se puede modificar su ciclo de trabajo. Es decir puede variarse el tiempo en la cual la señal esta en nivel alto (T_{ON}) frente al tiempo que está en nivel bajo (T_{OFF}). De esta forma la tensión promedio en la carga es proporcional al ciclo de trabajo, lo cual nos permite controlar la potencia óptica que genera el LED con una resolución de hasta 10 bits.

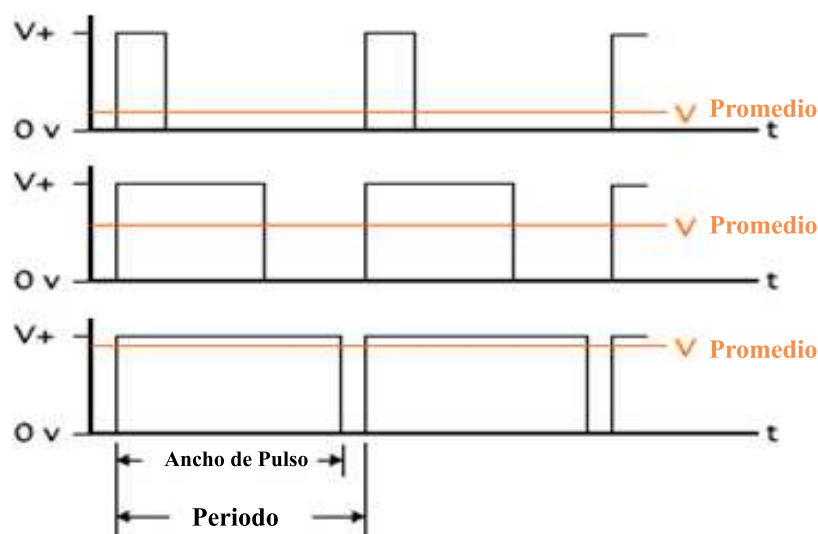


Figura 2.14: Señal de salida PWM

2.4. Control del tiempo de irradiación

Como las dosis de energía con las que se irradia el tejido dependen del tiempo de irradiación, se hace necesario que el sistema cuente con un temporizador para poder controlar estos tiempos. Para realizar el temporizador se plantean 3 soluciones, las cuales serán mostradas a continuación, donde se podrá apreciar que la más factible es desarrollar el temporizador con el mismo microcontrolador que se utiliza para controlar el driver Buckplus 7021 y que además nos permitirá realizar el control de temperatura el cual se explicará posteriormente.

2.4.1. Control de tiempo con el integrado NE 555

El NE555 es un circuito integrado de bajo costo y de grandes prestaciones. El temporizador 555 se puede conectar para que funcione de diferentes maneras, sin embargo, para las necesidades del sistema la más factible es en modo multivibrador monoestable. En este caso el circuito entrega a su salida un solo pulso de un ancho establecido por valores de la resistencia y capacitancia, donde el tiempo de duración esta dado por:

$$\begin{aligned} T &= \ln(3) \cdot R \cdot C(\text{segundos}) \\ T &\approx 1,1 \cdot R \cdot C(\text{segundos}) \end{aligned} \quad (2.3)$$

A partir de la ecuación anterior se puede observar que el tiempo de duración está en dependencia de los valores del capacitor y del resistor del circuito que se muestra en la figura 2.15 y dado que los tiempos que se requieren para el temporizador son relativamente grandes (~ 10 a 20 minutos) los valores para el capacitor y resistor deben

de ser muy altos, por lo que el integrado *NE555* en su configuración multivibrador monoestable se vuelve una opción no óptima para el temporizador del sistema.

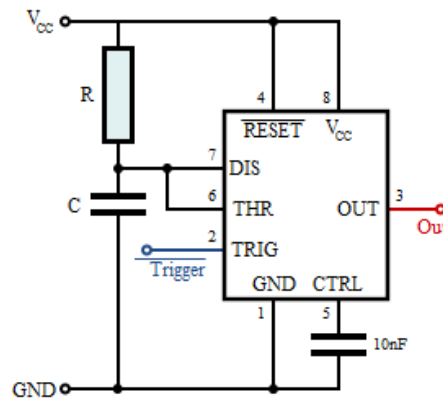


Figura 2.15: 555 en su configuración multivibrador monoestable

2.4.2. Control de tiempo con el integrado XR-2240

El integrado XR-2240 es básicamente un 555 con un contador binario programable de 8 bits el cual permite alargar las características de control en el temporizador del circuito. Además, admite la opción de conectar varios XR-2240 en cascada para obtener señales temporales de hasta varios meses de duración.

Mediante un pulso positivo de disparo aplicado a la entrada 11 se activa el oscilador de base de tiempo del 555. Con un pulso positivo en la terminal 10 de reinicio se detiene el oscilador de base de tiempo del 555. El voltaje de umbral de las terminales de disparo y de reinicio es aproximadamente de $1.4V$. El periodo de la base de tiempo (T) de un ciclo del oscilador se define mediante un circuito RC externo conectado a la terminal 13 de temporización donde T está dado por:

$$T = R \cdot C \quad (2.4)$$

En donde R está expresada en ohms, C en faradios y T en segundos. Dado que el circuito integrado cuenta con un contador binario se pueden obtener 8 pulsos con diferentes intervalos. Las salidas pueden utilizarse solas o bien se pueden conectar juntas. El ciclo de temporización del canal de salida se obtiene calculando el valor de T_s el cual está dado por la suma de las terminales que estén conectadas mediante un conductor común con una resistencia de elevación de voltaje como se muestra en la figura 2.16, es decir si todas las terminales están conectadas t_s estará dado por:

$$T_s = 1T + 2T + 4T + 8T + 16T + 32T + 64T + 128T \quad (2.5)$$

Por lo tanto el valor de T_s se podrá cambiar o programar para cualquier ciclo de temporización comprendido entre T y $255T$.

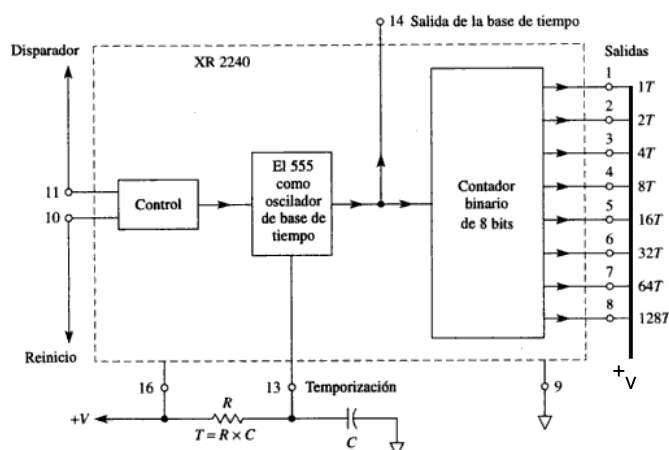


Figura 2.16: Diagrama a bloques XR-2240

De igual manera que el integrado 555 el XR-2240 puede funcionar como multivibrador monoestable (véase la figura 2.17) con la ventaja de poder hacer un temporizador de tiempos más largos. Sin embargo, en el desarrollo del sistema se presenta la necesidad de tener un control en el temporizador de forma digital, para que este pueda reajustarse de forma automática en caso de ser necesario durante la irradiación.

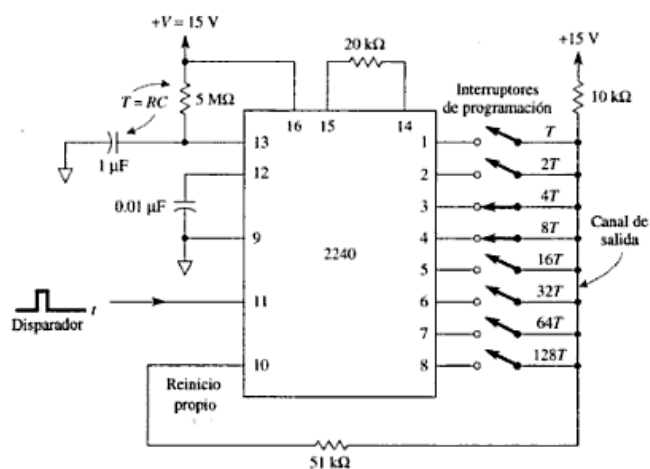


Figura 2.17: XR-2240 en su configuración multivibrador monoestable.

2.4.3. Microcontrolador

El elemento fundamental del temporizador en un microcontrolador es un contador binario, encargado de contar los pulsos suministrados por un circuito oscilador (señal de reloj), con una base de tiempo estable y conocida. Para el desarrollo del temporizador se utilizó el módulo TIMER1 del microcontrolador *PIC18F4550*, el cual trabaja con 2 registros de 8 bits. Para medir el tiempo se carga un registro con un

valor adecuado el cual se va disminuyendo al ritmo de los pulsos de la señal de reloj o de algún múltiplo de esta, hasta que se desborde y llegue a 0, momento en el que se produce un aviso en el microcontrolador. La ecuación de desbordamiento está dada por:

$$T = T_{CM} \cdot Prescalar \cdot (256 - CargaTIMER1) \quad (2.6)$$

Donde T_{CM} es el ciclo maquina y se puede calcular mediante la ecuación:

$$T_{CM} = 4/F_{osc} \quad (2.7)$$

Donde F_{osc} es la frecuencia de oscilación o señal de reloj. Así, con un cristal de 4 MHz para generar la señal de reloj del microcontrolador, cada instrucción se ejecuta a una velocidad de 1 μs . Por lo tanto se genera una interrupción interna por desbordamiento del temporizador TIMER1 cada 4 ms que crea una base de tiempo de 1 segundo utilizada por todos los procesos de temporización.

2.5. Sistema óptico

El área de irradiación del tejido requerida es aproximadamente de un área circular de 1 cm de diámetro. El ángulo de apertura del LED utilizado es de 140°, por lo que se hace necesario incorporar un sistema óptico que permita concentrar la luz en el área deseada. Para concentrar la luz se plantean 3 soluciones, las cuales serán mostradas a continuación. Se podrá apreciar que la de mejor resultado es utilizando un cilindro de acrílico de 1 cm de diámetro.

2.5.1. Diafragma

Se utilizó un diafragma para restringir de forma ajustable el paso de la luz (figura 2.18), sin embargo, esto genera pérdidas significativas en la densidad de potencia irradiada, por lo que es una opción no viable para el sistema.



Figura 2.18: Diafragma

2.5.2. Sistema de lentes condensadoras

Una lente es un sistema óptico formado por dos o más interfaces refractoras donde al menos una de éstas está curvada. Las lentes convexas (positivas, figura 2.19) son más gruesas en el centro y así tienden a disminuir el radio de curvatura de los frentes de onda, es decir la onda se hace más convergente conforme atraviesa la lente. Por otro lado, las lentes cóncavas (negativas, figura 2.20) son más delgadas en el centro y tienden a hacer más divergente el frente de onda.

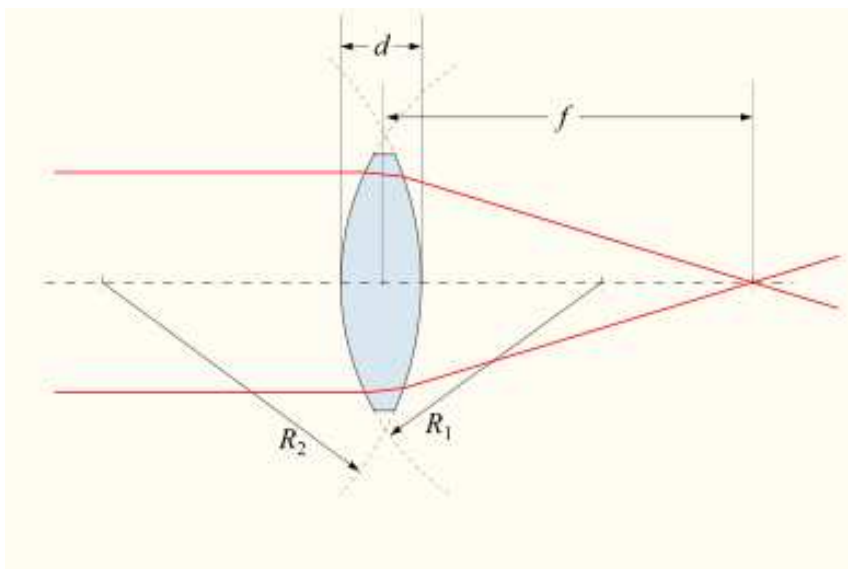


Figura 2.19: Lente biconvexa

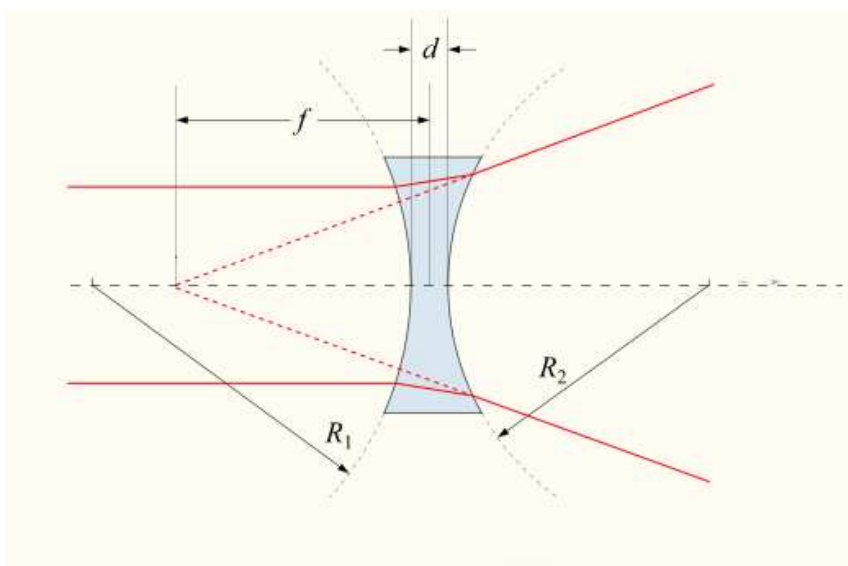


Figura 2.20: Lente bicóncava

Esto sugiere poder implementar un sistema de lentes condensadoras con un zoom integrado para concentrar la luz en un diámetro de alrededor de 1cm de diámetro. Considerando que la distancia focal de una lente delgada está dada por:

$$\frac{1}{s_o} + \frac{1}{s_i} = \frac{1}{f} \approx (n - 1) \left[\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right] \quad (2.8)$$

Donde:

f = La distancia focal de la lente

S_o = Distancia objeto

S_i = Distancia imagen

n = Índice de refracción de la lente

R_1 y R_2 = Radios de curvatura de la superficie de la lente

El aumento lateral o transversal M_T esta dado por la razón de las dimensiones transversales de la imagen final formada en el sistema óptico a la de la dimensión correspondiente del objeto:

$$M_T = -\frac{S_i}{S_o} \quad (2.9)$$

Por lo tanto, para lograr el diámetro requerido, la fuente de luz debe estar a una distancia $\geq 2f$ de la lente, lo cual hace que el tamaño del sistema óptico se vuelva más grande y la potencia óptica sea menor. Otra opción es incorporar un mayor número de lentes(figura 2.21) para reducir la distancia focal entre la fuente de luz y la lente. En la figura 2.22 se muestra la potencia óptica obtenida con la termopila Lexer Laser 510, implementando el sistema de lentes, donde se puede ver que la potencia máxima obtenida no cumple con las necesidades del sistema, lo que hace que el sistema de lentes condensadoras se vuelva una opción no viable.

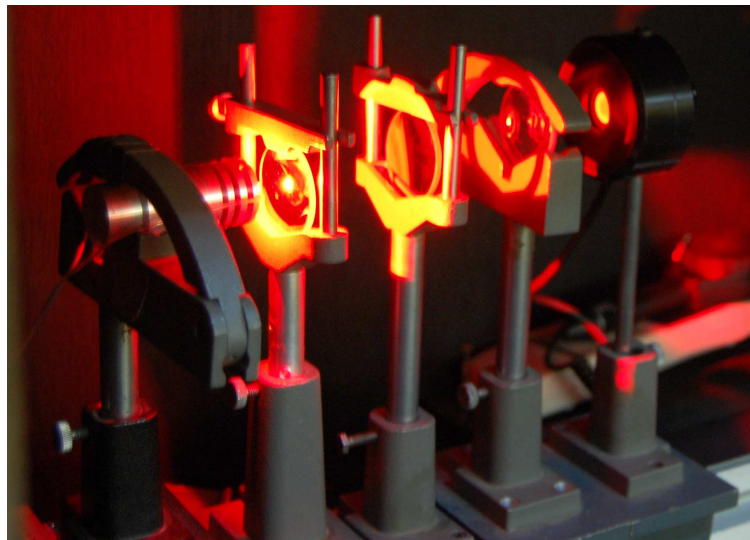


Figura 2.21: Medición de la potencia óptica con termopila Lexer Laser 510

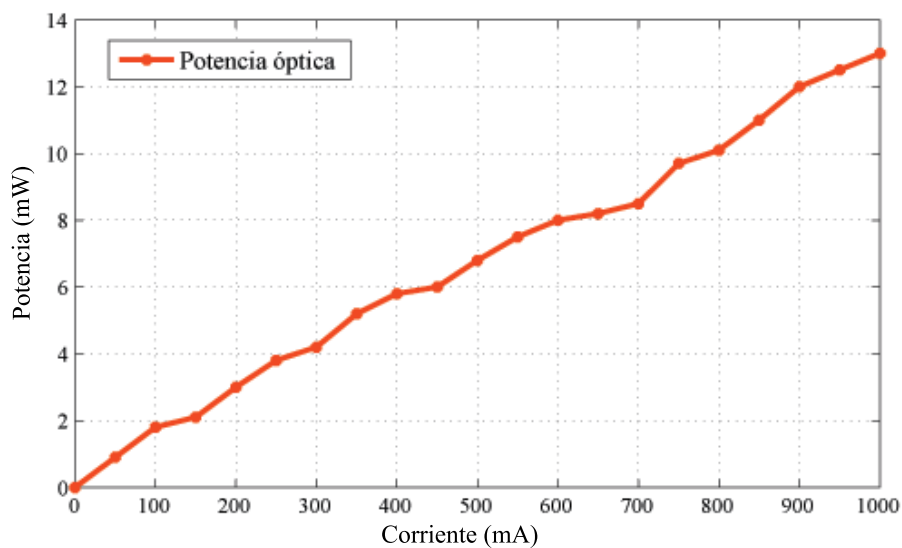


Figura 2.22: Respuesta en potencia respecto a la corriente que circula por el LED con el sistema de lentes

2.5.3. Cabezal con un cilindro

Basándose en el principio de la reflexión total interna, para transportar la luz que genera el LED a la zona de irradiación, se construyó un cabezal con un cilindro de acrílico y uno de vidrio de 1 *cm* de diámetro con un índice de refracción de 1.49 y 1.46 respectivamente (figura 2.23). La respuesta de la potencia respecto a la corriente medidas con la termopila Lexer Laser 510 se muestran en la figura 2.24, donde se puede ver que el vidrio presenta una mayor pérdida y por tanto el acrílico es la opción más viable para transportar la luz al área de irradiación.



Figura 2.23: Cabezal propuesto con cilindro de acrílico de 1 *cm* de diámetro

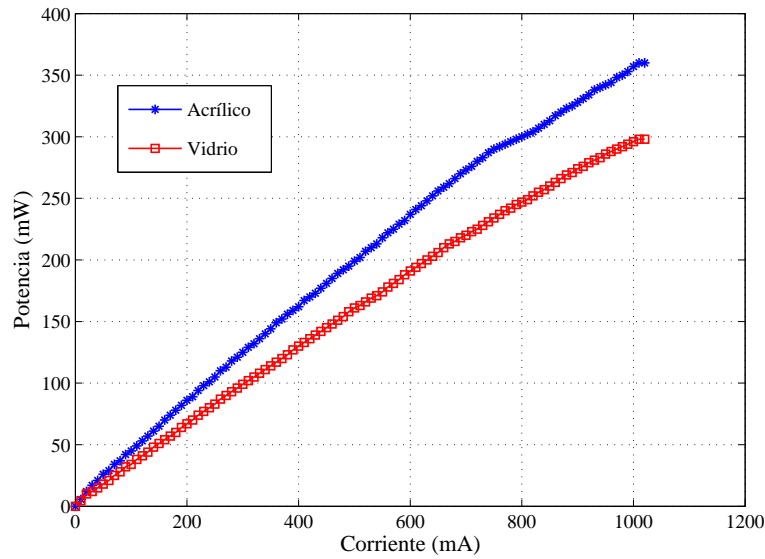


Figura 2.24: Potencias ópticas obtenidas con la termopila Lexer Laser 510

Para caracterizar el patrón de radiación del sistema, se construyó una mesa (X , Y) con un fototransistor (véase figura 2.25), con el cual se hace un barrido del área de irradiación a $2mm$ de distancia de la superficie del acrílico, con el cual se obtuvo una potencia relativa en diferentes puntos del área de irradiación. En la figura 2.26, se muestra la homogeneidad (78%) que se obtuvo en el área de irradiación utilizando el cilindro de acrílico de $1cm$ de diámetro. Cabe mencionar que la intensidad de la potencia óptica varía respecto a la distancia a la que se coloque el cabezal del fototransistor.

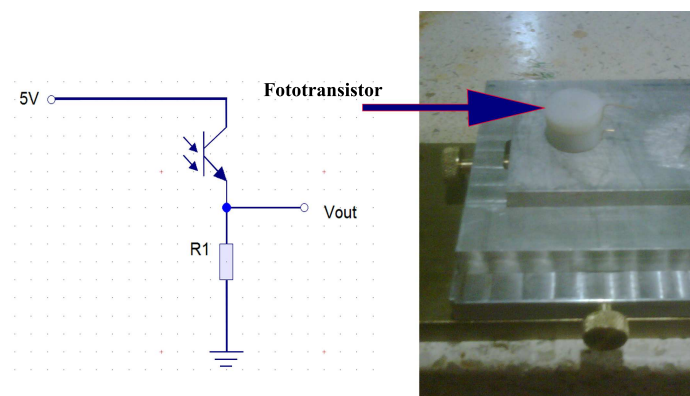


Figura 2.25: Polarización de fototransistor y la mesa (X,Y)

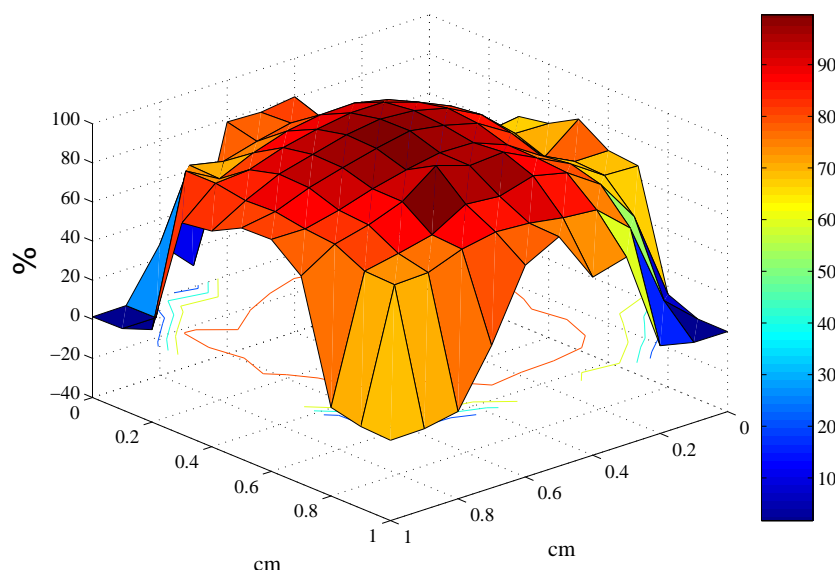


Figura 2.26: Homogeneidad relativa del área de irradiación con cilindro de acrílico

2.6. Control de temperatura

El aumento de la temperatura en el tejido o muestra irradiada se debe a los procesos de absorción de la luz. Por lo tanto, el aumento de la temperatura está correlacionado con la densidad de potencia óptica de irradiación. El control de la temperatura en la zona irradiada se lleva a cabo mediante la variación de los parámetros de tiempo y potencia óptica de irradiación (véase la ecuación 2.1), logrando así la densidad de energía requerida por el usuario.

Para lograr esto es necesario estar monitoreando de manera constante la temperatura en el área de irradiación, para lo cual se utiliza un termopar tipo K . El termopar es un sensor formado por la unión de dos metales distintos que produce un voltaje (efecto Seebeck), que es función de la diferencia de temperatura entre uno de los extremos denominado punto caliente o unión caliente o de medida y el otro denominado punto frío o unión de referencia (figura 2.27).

El termopar tipo K se utilizó debido a que presenta una respuesta lineal en el rango de medición a utilizar (véase figura 2.28). El termopar es acoplado al circuito integrado $AD595$ (véase figura), un amplificador de instrumentación para termopares tipo K , el cual cuenta con compensación de punto frío. El $AD595$ entrega 503 mV a una temperatura de $50\text{ }^\circ\text{C}$ en el termopar, por lo cual la señal de salida es amplificada con el amplificador operacional $LM358$ con una ganancia de 10 para ser acoplada a la entrada del ADC del microcontrolador, el cual tiene una referencia de 5 V . La resolución del ADC está dada por:

$$resolucion = \frac{V_i}{2^{N-1}} \quad (2.10)$$

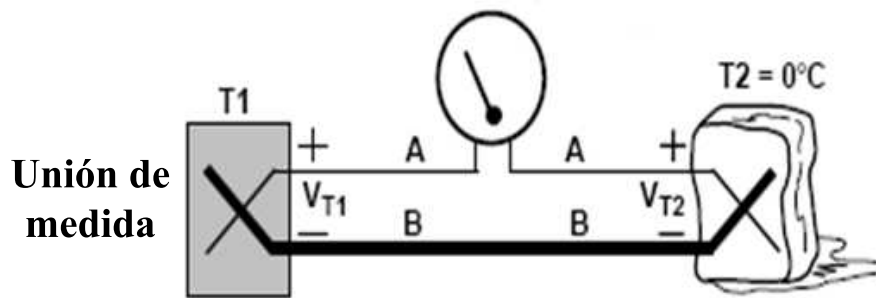


Figura 2.27: Principio de funcionamiento del termopar

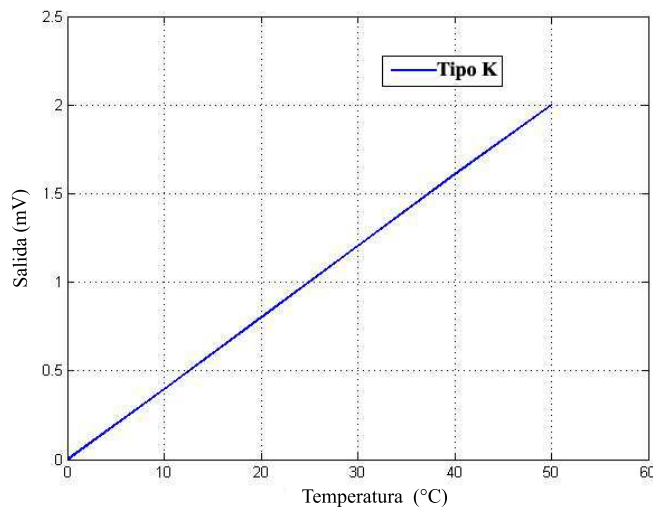


Figura 2.28: Respuesta del termopar tipo K respecto a la temperatura

Donde:

V_i = voltaje de referencia (5V)

N = número de bits (10)

Con lo que se obtiene una resolución de $4.8mV$ para el ADC del microcontrolador y una resolución de $0.04^{\circ}C$ para el termómetro del sistema.

Una vez que se tiene el monitoreo continuo de la temperatura, el control de la misma se lleva a cabo mediante la programación del microcontrolador, el cual cuenta con 2 modos de operación. En la figura 2.30 se muestra el diagrama de flujo del software desarrollado en el microcontrolador.

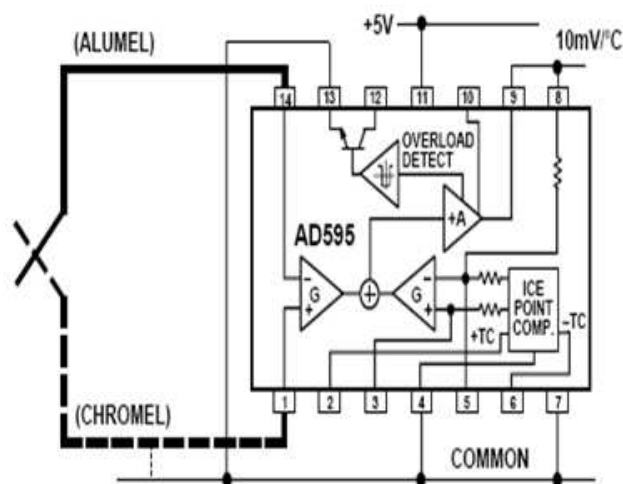


Figura 2.29: Diagrama del AD595

Modo 1

El usuario podrá introducir al sistema los parámetros de densidad de energía que desea administrar y el tiempo en que desea que se administre la dosis de energía, si la temperatura incrementa más de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ el sistema hará el cálculo de la dosis entregada hasta ese momento, y disminuirá la potencia modificando el ciclo de trabajo del PWM en un 5% hasta que la temperatura sea menor a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ e incrementará el tiempo de irradiación para así entregar la dosis de energía inicial requerida por el usuario.

Modo 2

El usuario podrá introducir al sistema los parámetros de densidad de energía que desea administrar, el tiempo y la temperatura promedio en que desea que sea administrada la dosis, por lo tanto si la temperatura está por debajo de la que el usuario requiere el sistema incrementará la densidad de potencia modificando el ciclo de trabajo del PWM en un 5% hasta alcanzar la temperatura deseada y disminuirá el tiempo de irradiación, para así entregar la dosis de energía inicial requerida por el usuario. Si la temperatura es mayor a la indicada por el usuario el sistema disminuirá la densidad de potencia modificando el ciclo de trabajo del PWM en un 5% e incrementará el tiempo de irradiación para así entregar la dosis de energía requerida por el usuario.

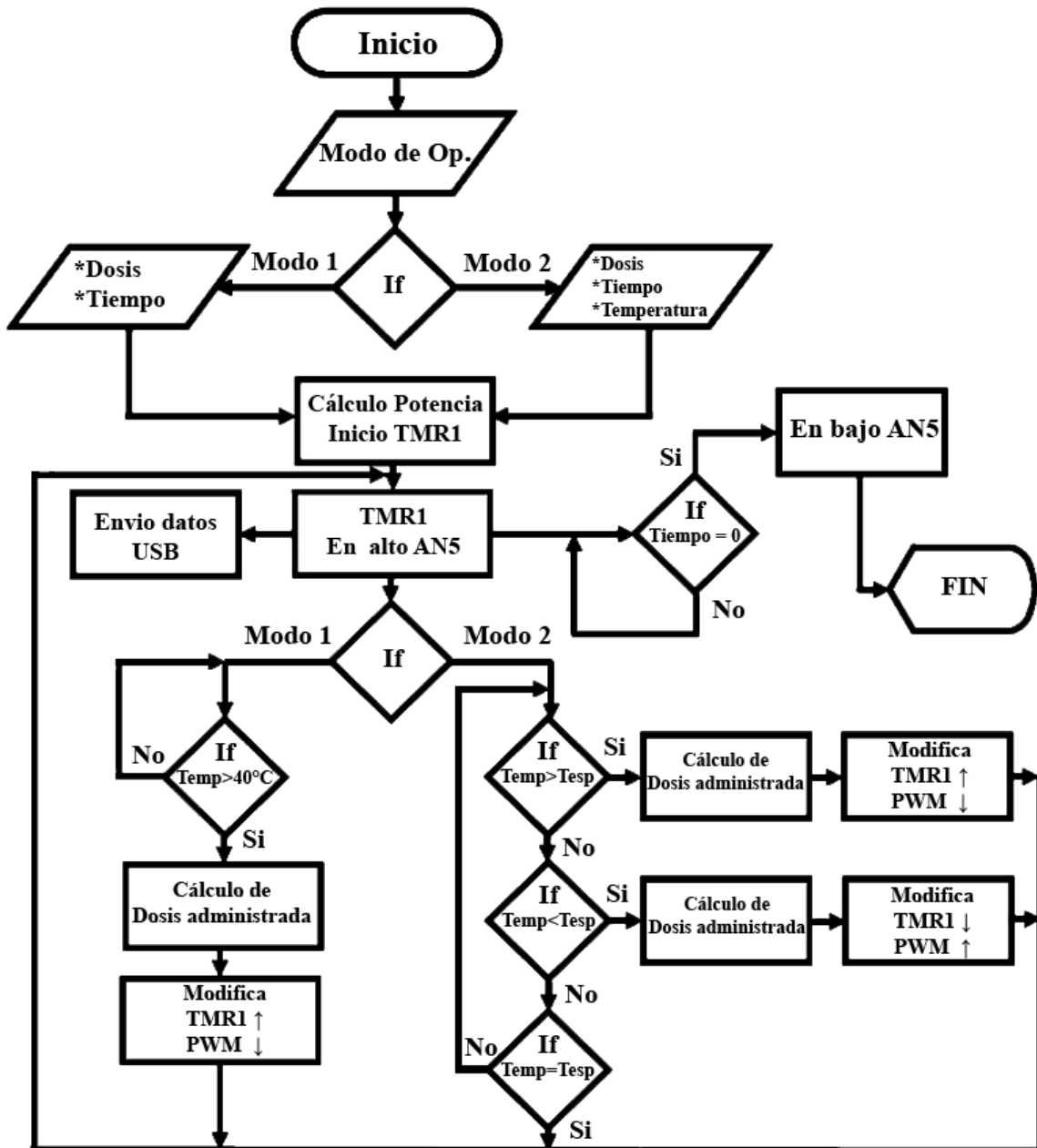


Figura 2.30: Diagrama de flujo del software implementado en el microcontrolador

Capítulo 3

Resultados

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos del sistema construido y su aplicación en la terapia fotodinámica en ratones atómicos nu/nu (*in vivo*) y en cultivos de células (*in vitro*).

3.1. Sistema prototipo

Se diseñó y construyó un sistema para la irradiación óptica, para ser aplicado en estudios de la terapia fotodinámica, en la figura 3.1 se muestra una imagen del prototipo construido. El cual puede irradiar tejidos *in vivo*, con una densidad de potencia variable entre 0 y 360 mW en un área circular de 1 cm de diámetro. Con el cual se puede obtener densidades de energía de 150 J/cm^2 y 250 J/cm^2 para tiempos mínimos de irradiación de 7 y 11.6 minutos, respectivamente. Además, el sistema puede controlar la temperatura en el área de irradiación, modificando de forma automática los parámetros de tiempo y densidad de potencia durante la irradiación.

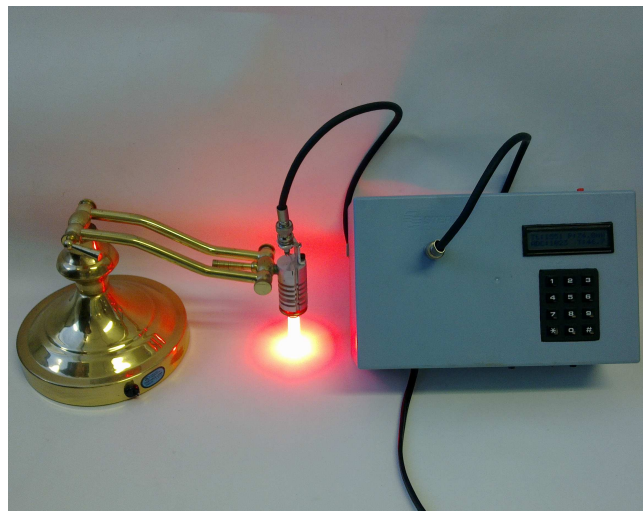


Figura 3.1: Imagen del prototipo construido

3.1.1. Interfaz con Labview

El sistema desarrollado cuenta con una interfaz gráfica desarrollada en *Labview*[®] de *National Instruments*, con la cual, durante la irradiación se puede monitorear los parámetros de tiempo, densidad de potencia y temperatura del sistema desde una PC o laptop que cuente con *Windows XP/Vista/7* como sistema operativo. La interfaz gráfica desarrollada en *Labview*[®] se muestra en la figura 3.2A.

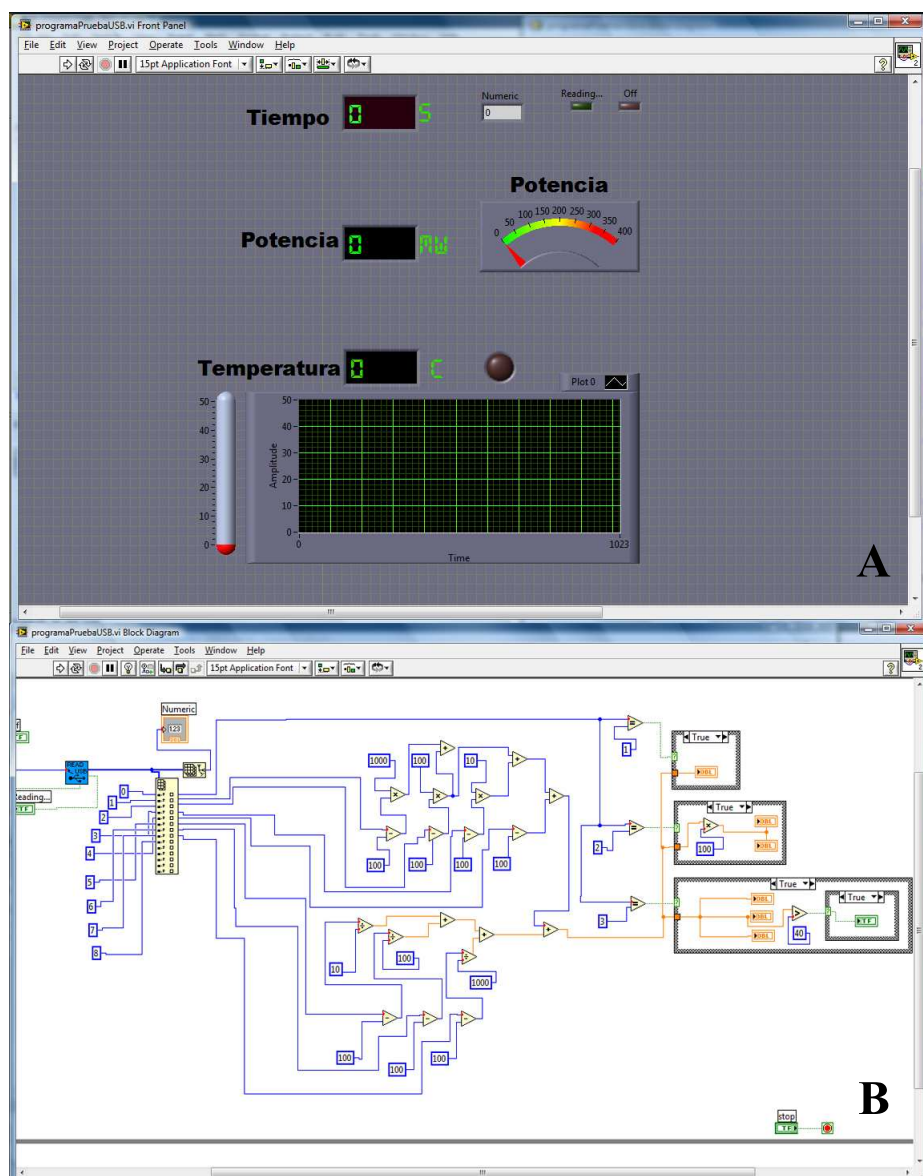


Figura 3.2: Interfaz desarrollada en *Labview*[®]

El envío de datos del sistema con la PC se lleva a cabo mediante el periférico de interfaz serial USB del microcontrolador *PIC18f4550* utilizando su transceptor

interno. La rutina para el envío de los datos del microcontrolador a la PC consiste en enviar 8 paquetes de 8 *bytes*, donde el primer paquete contiene el número identificador del dato (tiempo, potencia y temperatura), los cuatro siguientes corresponden a los números enteros y los 3 subsiguientes a los números decimales del dato (figura 3.3). El programa desarrollado en el *Labview*[®] reconstruye los datos y de acuerdo al número identificador despliega el número en la casilla correspondiente (figura 3.2B).

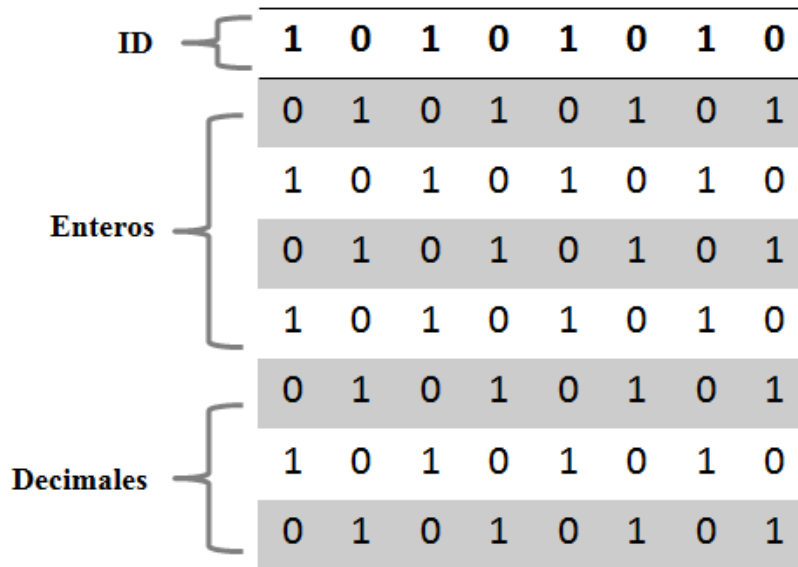


Figura 3.3: Arreglo de bytes para el envío de datos

3.1.2. Limitaciones del sistema

La limitación fundamental del sistema es el poder irradiar sólo tejidos externos ya que al ser acoplado a sistemas de fibras ópticas para tratamiento intersticial, la eficiencia en el acoplamiento sería muy poca debido al ángulo de apertura de LED.

Tomando en cuenta que: $D_E = W_d \cdot \text{Tiempo}$, donde: W_d es la densidad de potencia y D_E la dosis de energía. Se obtiene que 250 J/cm^2 , que es la dosis de energía máxima requerida, con una densidad de potencia máxima obtenida de 360 mW/cm^2 , se puede administrar en un tiempo mínimo de 11.6 min (696 s).

Otra limitación que presenta el sistema, son los intervalos máximos y mínimos que puede lograr el sistema en el control de temperatura, la temperatura mínima que se puede lograr con el sistema está limitada por la temperatura ambiente y la temperatura corporal del tejido o muestra a irradiar, mientras que la temperatura máxima que se puede lograr está limitada por la densidad de potencia máxima de 360 mW/cm^2 del sistema, la perfusividad del tejido y la temperatura ambiente entre otros parámetros.

3.2. Aplicación de la PDT *in vivo*

Con la colaboración de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (*ENCB*) del Instituto Politécnico Nacional (*IPN*), se irradiaron ratones atímicos *nu/nu* (figura 3.4), a los cuales se les implantaron células cancerosas de mama *MDA-MB-231* en las extremidades posteriores. Los ratones fueron tratados con dosis de 20 y 40 *mg* de *ALA* por *Kg* de peso, administrada por vía oral. Con un primer prototipo se administraron densidades de energía de $150\text{J}/\text{cm}^2$ y $250\text{J}/\text{cm}^2$ en tiempos de irradiación de 9 y 15 minutos respectivamente con una densidad de potencia de $218\text{mW}/\text{cm}^2$. La terapia se aplicó con 3 y 5 irradiaciones a $150\text{J}/\text{cm}^2$ y $250\text{J}/\text{cm}^2$.

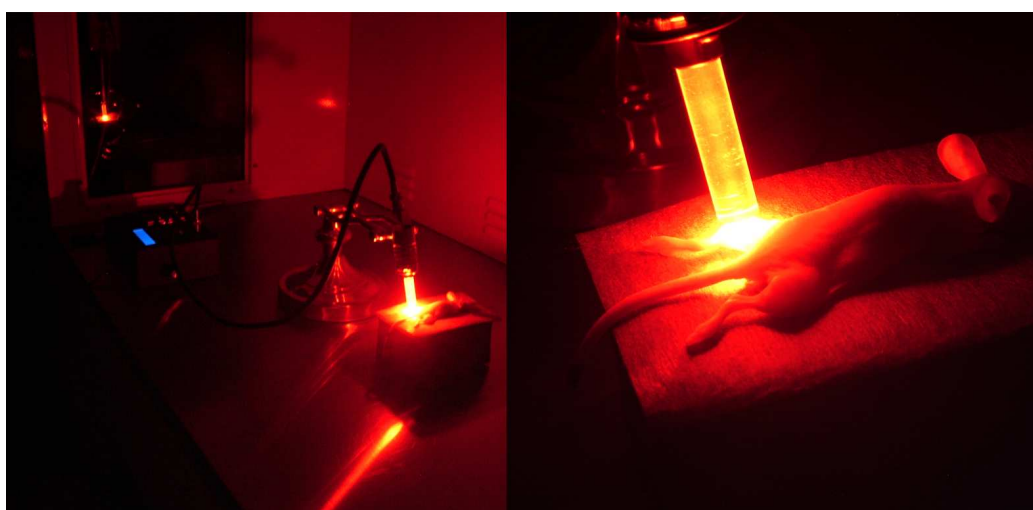


Figura 3.4: Irradiación de ratones atímicos *nu/nu*.

3.2.1. Descripción macroscópica del efecto de la PDT

Veinticuatro horas después de la segunda irradiación se observaron lesiones pequeñas de color púrpura (petequias) menores a 1mm en la piel (figura 3.5 A). Después de la tercera irradiación los tumores perdían la apariencia de eritema, es decir, disminuía el proceso inflamatorio y los tumores eran de aspecto blanquecino y de bordes bien definidos (figura 3.5 B). Después de la cuarta irradiación, se vio que las lesiones eran de una mayor extensión y presentaron depresiones al centro del tejido (figura 3.5 C), las lesiones cicatrizaron paulatinamente siendo de aspecto seco y consistencia rígida, similar a la lesión producida por quemaduras (figura 3.5 D) Ocho días después de la última irradiación el aspecto del tejido irradiado era liso, de color blanquecino y con alto grado de descamación del estrato corneo (figura 3.5 E).

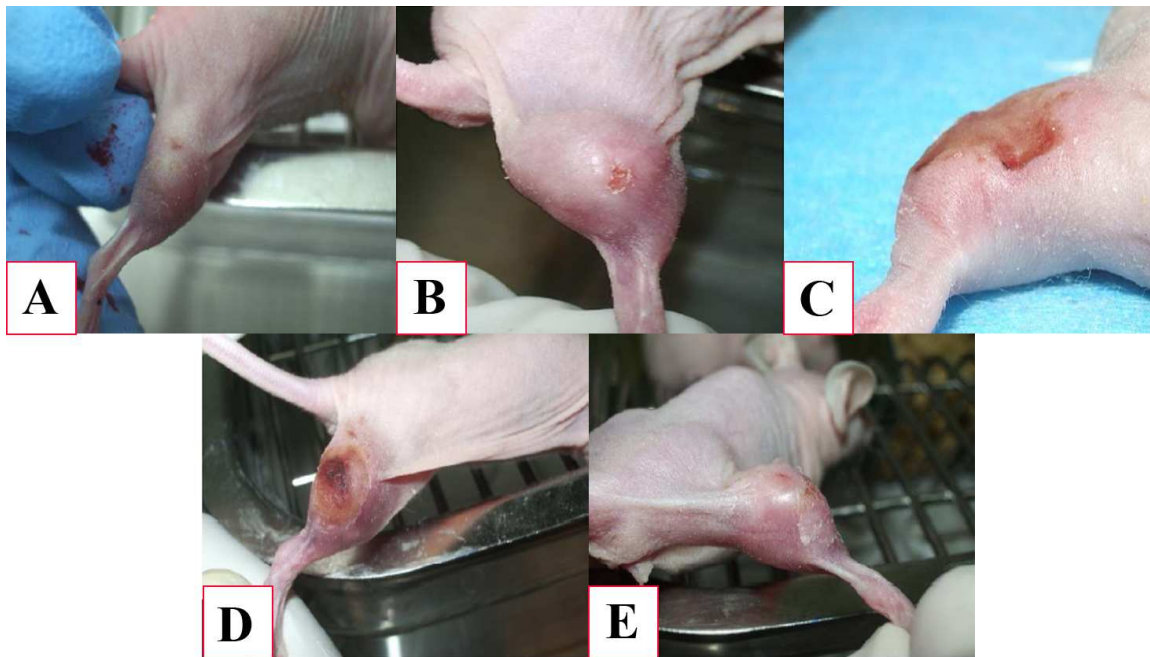


Figura 3.5: Observaciones macroscópicas de los tumores al aplicar la PDT

3.2.2. Monitoreo de la temperatura

Para poder determinar si existen factores de hipertermia fotoinducida en la terapia fotodinámica y validar la necesidad de un control de temperatura en el sistema desarrollado, durante el experimento de la aplicación de la terapia fotodinámica se monitoreó la temperatura (T_i) en el centro de la superficie de los tumores, con un sistema de termopares tipo K (*TES1327*) el cual trabaja en un rango de -35 a 500°C , con una resolución de 0.1°C . Es importante mencionar que la temperatura basal (T_b) fue medida cuando el ratón no estaba anestesiado y después de la administración del anestésico (T_0) donde la temperatura en algunos casos disminuyó de forma significativa. Las temperaturas (T_0 , T_b y T_i) de los ratones atómicos nu/nu durante la aplicación de la terapia fotodinámica se muestran en la figura 3.6.

La temperatura mínima censada T_0 fue de 32.3°C , donde la temperatura bajo un 12% con respecto a la T_b . En promedio la temperatura disminuyó a 34.2°C , es decir, $\overline{T_0}$ es 7.3% menor con respecto $\overline{T_b}$. La temperatura máxima censada durante las irradiaciones T_i fue de 41.3°C , donde incrementó un 10% respecto T_b y 13.8% respecto a T_0 . En promedio la temperatura incremento a 39.7°C , es decir $\overline{T_i}$ incremento 7.06% respecto a $\overline{T_b}$ y 13.86% respecto a $\overline{T_0}$. El mayor incremento de T_i respecto T_0 fue de 8.1°C es decir un 19.76% (figura 3.7), lo cual es un aumento significativo y se puede esperar que existen efectos de hipertermia presentes en la terapia fotodinámica *in vivo*, por lo que se necesita realizar más experimentos para comprobar la existencia o no de sinergia entre la terapia fotodinámica y este incremento de temperatura.

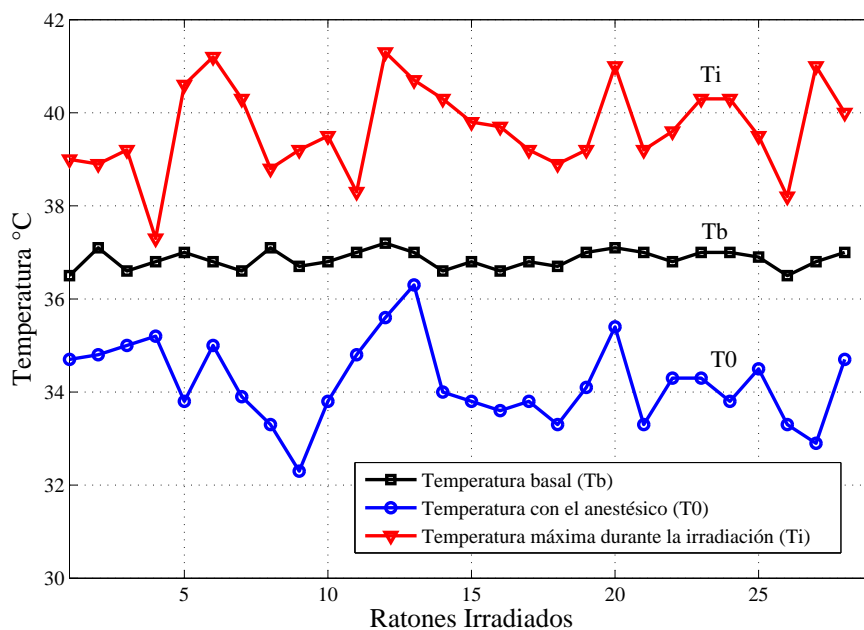


Figura 3.6: Temperaturas censadas durante la aplicación de la PDT

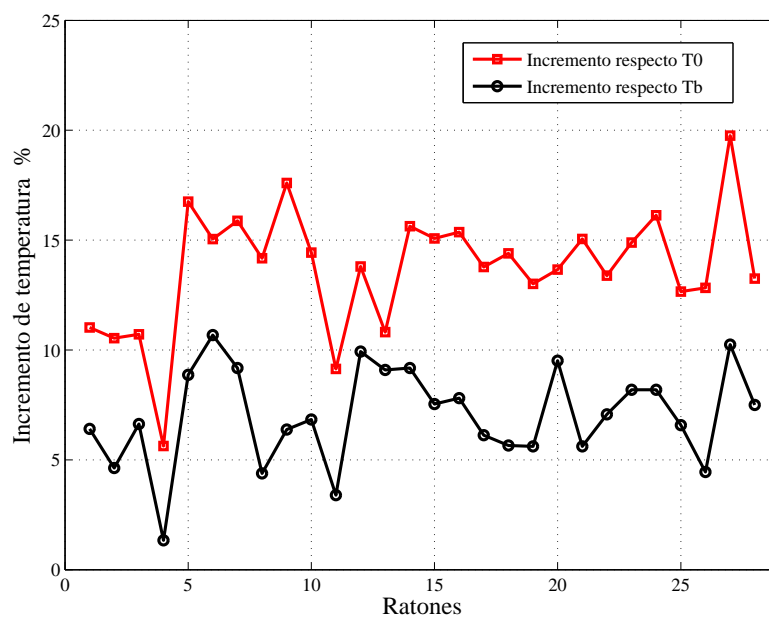


Figura 3.7: Incremento porcentual de la temperatura de los ratones con respecto a T_0 y T_b .

Ratones	. Tb .	. T0 .	. Ti .
1	36.5°C	34.7°C	39.0°C
2	37.1°C	34.8°C	38.9°C
3	36.6°C	35.0°C	39.2°C
4	36.8°C	35.2°C	37.3°C
5	37.0°C	33.8°C	40.6°C
6	36.8°C	35.0°C	41.2°C
7	36.6°C	33.9°C	40.3°C
8	37.1°C	33.3°C	38.8°C
9	36.7°C	32.3°C	39.2°C
10	36.8°C	33.8°C	39.5°C
11	37.0°C	34.8°C	38.3°C
12	37.2°C	35.6°C	41.3°C
13	37.0°C	37.3°C	40.7°C
14	36.6°C	34.0°C	40.3°C
15	36.8°C	33.8°C	39.8°C
16	36.6°C	33.6°C	39.7°C
17	36.8°C	33.8°C	39.2°C
18	36.7°C	33.3°C	38.9°C
19	37.0°C	34.1°C	39.2°C
20	37.1°C	35.4°C	41.0°C
21	37.0°C	33.3°C	39.2°C
22	36.8°C	34.3°C	39.6°C
23	37.0°C	34.3°C	40.3°C
24	37.0°C	33.8°C	40.3°C
25	36.9°C	34.5°C	39.5°C
26	36.5°C	33.3°C	38.2°C
27	36.8°C	32.9°C	41.0°C
28	37.0°C	34.7°C	40.0°C
<i>Promedio</i>	36.85°C	34.23°C	39.7°C
<i>Varianza</i>	0.1972°C	0.9893°C	0.9697°C

Tabla 3.1: Valores de temperatura censadas durante la aplicación de PDT en ratones atómicos nu/nu

3.3. Aplicación de la PDT *in vitro*

Para la aplicación de la PDT *in vitro*, se irradiaron cultivos de células con una matriz de LED´s la cual irradia con una densidad de potencia variable de 0 a 55 mW/cm^2 , las irradiaciones se hicieron con densidades de potencias de 15, 25 y 50 mW/cm^2 en tiempos de irradiación de 10 minutos para observar los incrementos de temperatura que se presentan con las diferentes potencias ópticas de irradiación. Las temperaturas

medidas se muestran en la figura 3.8, donde se puede observar que la temperatura tiene una dependencia de la potencia óptica de irradiación. Con 50 mW/cm^2 se obtiene un incremento en la temperatura de 8.5°C en un tiempo de irradiación de 10 minutos, el cual es un 26.2% de incremento en la temperatura respecto a la temperatura basal del cultivo de células, este es un aumento significativo por lo tanto se puede decir que existen efectos de hipertermia presentes en la terapia fotodinámica *in vitro*.

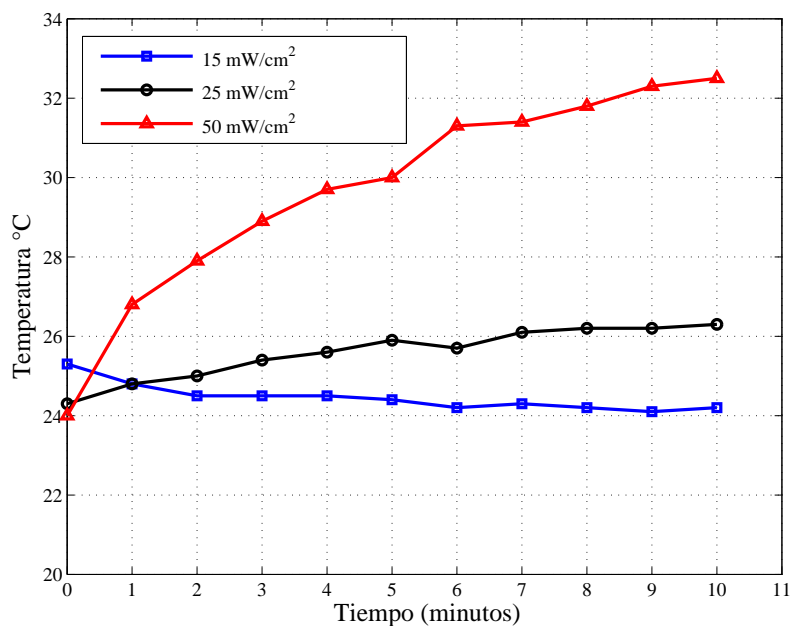


Figura 3.8: Incrementos de temperaturas en cultivos de células irradiados con 15, 25 y 50 mW/cm^2

Capítulo 4

Conclusiones y trabajo a futuro

4.1. Introducción

En este trabajo se describe el diseño y construcción de un sistema de irradiación que permite realizar estudios de la sinergia entre la terapia fotodinámica y los efectos fototérmicos en el tejido. Con esto se cumplió el objetivo general del trabajo. Además, se presentan resultados de experimentos realizados en ratones atómicos nu/nu (*in vivo*) y en cultivos de células (*in vitro*), gracias a la colaboración de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional (IPN). En este capítulo se presentan las conclusiones del sistema desarrollado y del experimento realizado en ratones, así como el trabajo a futuro.

4.2. Conclusiones del sistema desarrollado

Del sistema desarrollado se puede concluir lo siguiente:

- El sistema, puede irradiar con una densidad de potencia máxima de $360\text{mW}/\text{cm}^2$ y entregar dosis de energía de $250\text{ J}/\text{cm}^2$ en un tiempo mínimo de 11.6 min .
- El sistema controla la corriente que circula en el LED con una resolución de 0.107 mA .
- El sensor de temperatura del sistema cuenta con una resolución de $0.04\text{ }^\circ\text{C}$ y mide una temperatura máxima de $50\text{ }^\circ\text{C}$.
- Durante la irradiación, el sistema puede controlar la temperatura dentro de un intervalo sin afectar la dosis de energía requerida por el usuario.
- El sistema cuenta con una interfaz gráfica (Labview Versión 8.2) amigable y de fácil uso para el usuario.
- La eficiencia de irradiación del tejido respecto a la potencia de irradiación emitida por el LED *Pro light Opto* de 5 W de potencia es aproximadamente del

37 %, esto se debe principalmente al acoplamiento entre el cilindro de acrílico y el LED.

- El patrón de irradiación del sistema con el cilindro de acrílico tiene hasta un 22 % de pérdidas en algunas zonas del área circular de irradiación. Sin embargo, los tejidos dañados no tienen una homogeneidad.
- El pico máximo de emisión del LED *Pro light Opto* de 5 W de potencia es de 624 nm, esto es 8 nm por debajo del pico máximo de absorción de la *PpIX*, lo que sugiere una variación en la eficiencia en la PDT. Sin embargo, para determinar dicha variación es necesario realizar una comparación del sistema desarrollado con un sistema de luz monocromática sintonizada en el pico de absorción de la *PPIX*.
- El sistema se encuentra dentro de las normas establecidas por el NIST (por sus siglas en inglés *National Institute of Standards and Technology*), ya que las variaciones en la radiación óptica del sistema desarrollado son de $\pm 2.0\%$, de acuerdo con el NIST las variaciones máximas permisibles en las fuentes de irradiación óptica son de $\pm 10\%$. El temporizador generado por el sistema para el tiempo de la irradiación óptica tiene un error de -0.34% del tiempo establecido por el usuario. De acuerdo al NIST el tiempo prescrito para un tratamiento, debe tener un error máximo del 1 % o 5 segundos [84].

Del sistema desarrollado respecto a otros sistemas utilizados anteriormente para aplicaciones en la PDT se puede concluir que:

- Respecto a los sistemas que utilizan como fuente de irradiación láseres o diodos láser el sistema desarrollado presenta las ventajas de poder irradiar áreas más grandes y un costo de producción e implementación más bajo. Sin embargo, el sistema desarrollado solo puede ser utilizado en lesiones superficiales, ya que su eficiencia en el acoplamiento con fibras ópticas es muy poca, esto debido a que el ángulo de apertura de emisión del LED es muy grande (140°).
- Respecto a los sistemas que utilizan como fuente de irradiación las lámparas incandescentes el sistema desarrollado presenta las ventajas de no necesitar filtros para irradiar en la longitud de onda requerida lo que reduce su costo. Además, el tamaño de construcción del sistema es menor haciendo que el sistema sea portable, y presenta una mayor versatilidad para poder ser adaptado a diferentes geometrías.
- El control de la temperatura incorporado en el sistema, representa una gran aportación debido a que ningún sistema de irradiación óptica para aplicaciones en la PDT reportado en la literatura, consideran los efectos fototérmicos que se generan durante la terapia.

4.3. Conclusiones del experimento en ratones

Del los experimentos realizados en ratones atómicos nu/nu en colaboración con la ENCB del IPN se puede concluir que:

- La necrosis no sólo es inducida por la terapia fotodinámica misma, si no también puede estar dada por la hipertermia inducida con radiación óptica.
- El implementar un control de temperatura en el sistema desarrollado, permitirá realizar estudios de la PDT en sinergia con la terapia fototérmica.
- La terapia fotodinámica tiene potencial antitumoral contra el Cáncer de mama,
- El grupo ratones irradiados que obtuvo un porcentaje menor de función antitumoral fue bajo las condiciones de $40mg$ de ALA por Kg de peso del ratón con 5 irradiaciones a $150 J/cm^2$, donde la función antitumoral fue de 34%

4.4. Recomendaciones para el trabajo a futuro

Existen varias mejoras que se podrían implementar en el sistema desarrollado:

- Desarrollar sistemas de irradiación de áreas extensas utilizando matrices de LED's
- En el sistema físico para el transporte de luz (acrílico) mejorar el patrón de irradiación.
- Realizar experimentos de irradiaciones en phantoms, *in vivo* e *in vitro*, para caracterizar el control de temperatura del sistema y determinar los límites de temperatura que el sistema puede controlar.
- Ya que la interfaz desarrollada en Labview sólo es para monitoreo, esta puede ser mejorada añadiendo rutinas para el control del sistema desde la PC, sin que este deje de ser autónomo y para el almacenamiento de datos para un estudio posterior.

Por otro lado, en colaboración con la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional se podría:

- Realizar irradiaciones para obtener dosis del fármaco y energía óptimas para la terapia fotodinámica.
- Realizar irradiaciones para obtener un método óptimo para el control de la temperatura.
- Una vez verificados los resultados proponer un protocolo para el tratamiento de enfermedades específicas.

Apéndice A

Difusión del trabajo

Participación en congresos

- F. Y. López Silva, S. Stolik Isakina, J.M. de la Rosa V. Design and construction of irradiation system for photodynamic therapy with temperature control, *Circuits and Systems for medical and environmental applications 2nd Workshop*, Merida, Yucatan. Diciembre 2010.
- F. Y. López Silva, S. Stolik Isakina, J.M. de la Rosa V. Sistema de irradiación para la terapia fotodinámica con control de temperatura, *VIII Congreso Internacional sobre Innovación y Desarrollo Tecnológico (IEEE)* Cuernavaca, Morelos. Noviembre 2010.
- F. Y. López Silva, S. Stolik Isakina, J.M. de la Rosa V. Sistema de irradiación para la terapia fotodinámica, *XIV Reunión Nacional Académica de Matemáticas (ESFM)*, México, DF. Noviembre 2009.
- F. Y. López Silva, S. Stolik Isakina, J.M. de la Rosa V. Sistema de irradiación para la terapia fotodinámica con monitoreo de temperatura, *VII encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia (CIO)* León, Guanajuato. Mayo 2010.

Apéndice B

Código fuente del programa desarrollado

```
#include <18F4550.h>
#device adc=10
#fuses XTPLL,NOWDT,NODEBUG,USBDIV,PLL1,CPUDIV1,VREGEN
#use delay (clock= 48000000)
#define TAM_USB 8  \\ tamaño de paquetes en el envío de datos
#define LIMITETEMPERATURA (float) 40.0      //temperatura máxima modo1
#define USB_HID_DEVICE FALSE
#define USB_EP1_TX_ENABLE USB_ENABLE_BULK   //tipo de transferencia USB
#define USB_EP1_RX_ENABLE USB_ENABLE_BULK   //tipo de transferencia USB
#define USB_EP1_TX_SIZE TAM_USB
#define USB_EP1_RX_SIZE TAM_USB
#define MODULO 3
#include <pic18_usb.h>
#include "desc_scope.h"
#include <usb.c>
#use standard_io(b)
#include <lcd.c>
#include <kbd.c>
#define TMP_VAL 3036
#define TMP_VAL_3 3036
float area = 0.7854;
int32 iTiempo, tiempoTotal, iImprimeOtroValor,iADC1 = 0;
int32 iEnergia = 1023;
int32 iTemperatura=0;
int32 iDensidadPotencia=0;
int iIsPar, iIsInit, iIsChangeTiempo, iTempPar, iTempInit, modoDeOperacion ;
float potRelA1, potRelA2, potRel, temp,tempReal,tempRelA1, tempRelA2;
```

```
float decremento, iPotenciaActual, DensidadDeEnergia;
float offset = 2;
int enviaUSB[9], sendUSB;

//rutina para modificar parametros de potencia PWM
void ModificaValorPwmPotencia()
{
    iDensidadPotencia = 1023 - (iPotenciaActual*(2.841)*1000);
    set_pwm2_duty(iDensidadPotencia);
}
//rutina para el calculo de dosis administrada
void CalculoDensidadEnergiaAcumuladayActualizar()
{
    float densidadActual, tiempoTranscurrido;
    tiempoTranscurrido = tiempoTotal - iTiempo;
    densidadActual = (iPotenciaActual * tiempoTranscurrido)/area;
    densidadDeEnergia = densidadDeEnergia - densidadActual;
}
//rutina para modificar tiempo y potencia del modo2 T por encima
void ModificaTiempoPotencia()
{
    decremento = iPotenciaActual * 0.05;
    iPotenciaActual = iPotenciaActual - decremento;
    tiempoTotal = (densidadDeEnergia*area)/iPotenciaActual;
    iTiempo = tiempoTotal;
}
//rutina para modificar tiempo y potencia del modo2 T por abajo
void ModificaTiempoPotencia2()
{
    decremento = iPotenciaActual * 0.05;
    iPotenciaActual = iPotenciaActual + decremento;
    tiempoTotal = (densidadDeEnergia*area)/iPotenciaActual;
    iTiempo = tiempoTotal;
}
// evalua si T esta por encima de la establecida
int32 arribaLimiteSuperiorTemp()
{
    if(tempReal > (iTemperatura + offset) )
    {
        return 1;
    }
    return 0;
}
```

```
}
// evalua si T esta por debajo de la establecida
int32 abajoLimiteSuperiorTemp()
{
    if(tempReal < (iTemperatura - offset) )
        {
            return 1;
        }
    return 0;
}
//evalua si T paso el 40°C modo1
int32 pasaLimiteTemperatura()
{
    if(tempReal >=LIMITETEMPERATURA )
        {
            return 1;
        }
    return 0;
}
//arreglo para el envio de datos mediante USB
void arregloEnvio(int32 iType, double dTemporal)
{
    double fBackup;
    int32 iVal;
    int iPos;
    fBackup = dTemporal;
    enviaUSB[0]= iType;
    for(iPos = 4; iPos!=0; iPos--)
    {
        iVal = (int32)dTemporal%10;
        dTemporal = (dTemporal < 0.0009) ? 0 : dTemporal/10;
        enviaUSB[iPos]= iVal+100;
    }
    dTemporal = fBackup;
    dTemporal = (dTemporal-(int32)dTemporal)*1000;
    for(iPos = 7; iPos!=4; iPos--)
    {
        iVal = (int32)dTemporal%10;
        dTemporal = (dTemporal < 0.0009) ? 0 : dTemporal/10;
        enviaUSB[iPos]= iVal+100;
    }
    usb_puts(1, enviaUSB, TAM_USB, 1);
}
```

```

// rutina que manda llamar subrutinas para el modo1
void modoDeOperacion1()
{
  if (iTiempo \%MODULO == 0 ){
    if (pasaLimiteTemperatura() == 1){
      CalculoDensidadEnergiaAcumuladayActualizar();
      ModificaTiempoPotencia();
      ModificavalorPwmPotencia();
      iImprimeOtroValor = 1;
      printf(lcd_putc, "\fTt:\%ld P:\%ldmW \", iTiempo, (iPotenciaActual*100));
      printf(lcd_putc, "\n ADC:\%ld T:%2.1f C ", iADC1, tempReal);
    }
  }
}

// rutina que manda llamar subrutinas para el modo2
void modoDeOperacion2()
{
  if (iTiempo \%MODULO == 0 ){
    decremento = iPotenciaActual * 0.05;
    if (arribaLimiteSuperiorTemp()==TRUE&&((iPotenciaActual-decremento)5> 0.001)){
      CalculoDensidadEnergiaAcumuladayActualizar();
      ModificaTiempoPotencia();
      ModificavalorPwmPotencia();
      iImprimeOtroValor = 1;
      printf(lcd_putc, "\fTt:\%ld P:%3.1fmW ", iTiempo, iPotenciaActual*1000);
      printf(lcd_putc, "\n Te:\%ldC - T:%2.1fC ", iTemperatura, tempReal);
    }
    else if (abajoLimiteSuperiorTemp()==TRUE&&((iPotenciaActual+decremento)< 0.36))
    {
      CalculoDensidadEnergiaAcumuladayActualizar();
      ModificaTiempoPotencia2();
      ModificavalorPwmPotencia();
      iImprimeOtroValor = 1;
      printf(lcd_putc, "\fTt:\%ld P:%3.1fmW ", iTiempo, iPotenciaActual*1000);
      printf(lcd_putc, "\n Te:\%ldC - T:%2.1fC ", iTemperatura, tempReal);
    }
  }
}

\\ rutina que manda llamar subrutinas para el envio de datos
void enviarDatos(void)
{
  arregloEnvio(1, iTiempo);
}

```

```
    arregloEnvio(2, iPotenciaActual*10);
    arregloEnvio(3, tempReal);
}
// inicializa timer
#int_TIMER1
void Temporizador(void)
{
    int32 iADC2;
    float I;
    iIsPar = iIsPar == 0 ? 1 : 0;
    if(iIsPar == 0){
        iIsChangeTiempo = iIsChangeTiempo == 0 ? 1 : 0;
        if(iIsChangeTiempo == 0)
            iTiempo--; //decremento del timer
        potRelA1 = potRel; // promedio ADC2
    }
    else{
        potRelA2 = potRel;
    }
    iTempPar = iTempPar == 0 ? 1 : 0;
    if(iTempPar == 0){
        tempRelA1 = tempReal; //promedio ADC1
    }
    else{
        tempRelA2 = tempReal;
    }
    set_adc_channel(0);
    delay_ms(65);
    iADC1 = read_adc(); //lectura ADC1
    temp = (5*iADC1)/1023.0;
    tempReal= temp * 9.3523; //calculo temperatura
    set_adc_channel(1);
    delay_ms(65);
    iADC2 = read_adc(); //lectura ADC2
    I = (5*iADC2)/1023.0;
    potRel= I; //calculo corriente
    delay_ms(65);
    if(iIsPar == 0)
    {
        if (iTiempo %MODULO==0){
            iImprimeOtroValor = 0;
        }
    }
}
```

```
    if (modoDeoperacion == 1){          //Evalua
        modoDeOperacion1(); //modo
    } // de
    else if (modoDeoperacion == 2){ //operacion
        modoDeOperacion2();
    }
}
if(iIsInit == 0){
    potRelA1 = potRelA2 = potRel; //promedio corriente
    iIsInit = 1;
}
if(iTempInit == 0){
    tempRelA1 = tempRelA2 = tempReal;//promedio temperatura
    iTempInit = 1;
}
printf(lcd_putc, "\fTt:%ld P:%.1fmW ", iTiempo, iPotenciaActual*1000);
printf(lcd_putc, "\nADC:%ld T:%.1fC ", iADC1, tempReal);
enviarDatos();
if( iTiempo == 0) //evalua timer en 0
{
    disable_interrupts(int_TIMER1);
    disable_interrupts(global);
    output_low(PIN_A5);    //apaga LED
}
else
{
    set_timer1(TMP_VAL);
}
}
// rutina para leer teclado
int32 LeerCadenaTeclado()
{
    char cValor;
    int32 iValor = 0;
    iIsPar = 0;
    do
    {
        cValor = kbd_getc();
        if(cValor == 0)
            continue;
        if(cValor != '*' && cValor != '#')
        {
            iValor = (iValor*10) + (cValor - 48);
        }
    }
}
```



```
    }
    else if(cValor != '#')
    {
        iValor = iValor / 10;
    }
    printf lcd_putc, "\nVal: %ld ", iValor);
}while(cValor != '#');
printf lcd_putc, "\nVal: %ld", iValor);
delay_ms(50);
return iValor;
}
// modo de operacion 1 pantalla principal
void Opcion1()
{
    char cOpcion;
    lcd_putc("\f(1)Time (2)Dose    \t \n(3)Start (4)Exit");
    modoDeOperacion = 1;
    while(TRUE)
    {
        cOpcion = kbd_getc();
        if(cOpcion == 0)
            continue;
        switch (cOpcion)
        {
            case '1': //ingresar tiempo
                lcd_putc("\fTiempo (seg): ");
                iTiempo = LeerCadenaTeclado();
                #ifdef DEPURAR
                lcd_putc("\fTiempo (seg): ");
                printf lcd_putc, "\T: %ld seg", iTiempo);
                delay_ms(200);
                #endif
                lcd_putc("\f(1)Time (2)Dose    \t \n(3)Start");
                break;
            case '2': //ingresar dosis
                lcd_putc("\fDose (J): ");
                iEnergia = LeerCadenaTeclado();
                #ifdef DEPURAR
                lcd_putc("\f Dose (J/cm^2): ");
                printf lcd_putc, "Dose: %ld J/cm^2", iEnergia);
                delay_ms(200);
                #endif
                lcd_putc("\f(1)Time (2)Dose    \t \n(3)Start");
```

```

        break;
    case '3': // hacer calculo de potencia e iniciar timer
        tiempoTotal=iTiempo;
        iPotenciaActual = ((iEnergia * area)/iTiempo);
        densidadDeEnergia = iEnergia;
        potRelA1 = potRelA2 = 0.0;
        iIsChangeTiempo = iIsInit = 0;
        sendUSB = 0;
        setup_timer_1 (T1_INTERNAL | T1_DIV_BY_4);
        set_timer1 (TMP_VAL);
        enable_interrupts(int_TIMER1);
        enable_interrupts(global);
        output_high(PIN_A5); //encender LED
        break;
    default:
        break;
}
if(cOpcion == '4')
    return;
lcd_putc("\f(1)Time (2)Dose    \t \n(3)Start (4)Exit");
}
}
// modo de operacion  pantalla principal
void Opcion2()
{
    char cOpcion;
    lcd_putc("\f1-Time 2-Dose \n3-Temp4-Srt5-Ext");
    modoDeOperacion=2;
    while(TRUE)
    {
        cOpcion = kbd_getc();
        if(cOpcion == 0)
            continue;
        switch (cOpcion)
        {
            case '1': //ingresar tiempo
                lcd_putc("\fTiempo (seg): ");
                iTiempo = LeerCadenaTeclado();
                #ifdef DEPURAR
                lcd_putc("\fTiempo (seg): ");
                printf(lcd_putc, "\T: %ld seg", iTiempo);
                delay_ms(200);
                #endif
        }
    }
}

```

```
        lcd_putc("\f1-Time 2-Dose \n3-Temp4-Srt5-Ext");
        break;
    case '2': //ingresar dosis de energia
        lcd_putc("\fDose (J): ");
        iEnergia = LeerCadenaTeclado();
        #ifdef DEPURAR
        lcd_putc("\fDose (J/cm^2): ");
        printf(lcd_putc,"Dose: %ld J/cm^2", iEnergia);
        delay_ms(200);
        #endif
        lcd_putc("\f1-Time 2-Dose \n3-Temp4-Srt5-Ext");
        break;
    case '3': //ingresar temperatura
        lcd_putc("\fTemperature (C): ");
        iTemperatura= LeerCadenaTeclado();
        #ifdef DEPURAR
        lcd_putc("\fTemperature (C): ");
        printf(lcd_putc,"Temperature: %f C", iTemperatura);
        delay_ms(200);
        #endif
        lcd_putc("\f1-Time 2-Dose \n3-Temp4-Srt5-Ext");
        break;
    case '4': //hacer calculo de potencia e iniciar timer
        tiempoTotal=iTiempo;
        iPotenciaActual = ((iEnergia * area)/iTiempo);
        densidadDeEnergia = iEnergia;
        sendUSB = 0;
        potRelA1 = potRelA2 = 0.0;
        iIsChangeTiempo = iIsInit = 0;
        setup_timer_1 (T1_INTERNAL | T1_DIV_BY_4);
        set_timer1 (TMP_VAL);
        enable_interrupts(int_TIMER1);
        enable_interrupts(global);
        break;
    default:
        break;
}
if(cOpcion == '5')
    return;
lcd_putc("\f1-Time 2-Dose \n3-Temp4-Srt5-Ext");
}
}
void main()
```

```
{
  char cOpcion;
  setup_timer_2(T2_DIV_BY_4,254,1); //configuracion PWM
  setup_ccp2(CCP_PWM);
  lcd_init(); //inicia LCD
  kbd_init(); // inicia teclado
  port_b_pullups(TRUE);
  set_tris_A(0x05); //configuración de puertos
  output_low(PIN_A5);
  setup_adc_ports(ANO_ANALOG);
  setup_adc(ADC_CLOCK_INTERNAL);
  usb_init();
  usb_task();
  arregloEnvio(0, 1111.111);
  lcd_putc("\f(1)Limit Temp  \n(2)Control Temp"); //menu principal
  while (TRUE)
  {
    cOpcion = kbd_getc();
    if(cOpcion == 0)
      continue;
    switch (cOpcion) // modos de operacion
    {
      case '1':
        Opcion1();
        break;
      case '2':
        Opcion2();
        break;
      default:
        break;
    }

    lcd_putc("\f(1)Reg de Temp  \n(2)Temp Fija");
  }
}
```

Apéndice C

Diagrama eléctrico

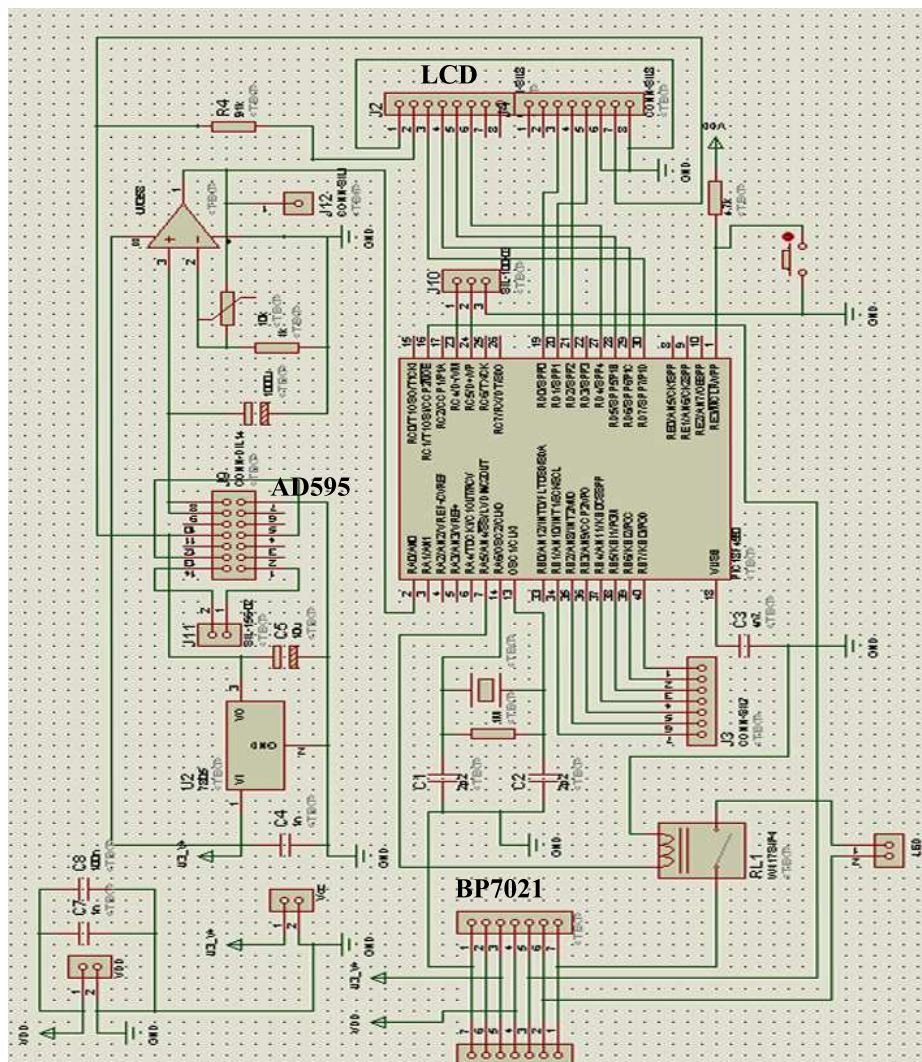


Figura C.1: Diagrama eléctrico del circuito del sistema

Bibliografía

- [1] Michael R. Hamblin. Mechanisms of low level light therapy. Department of Dermatology. Harvard Medical School.
- [2] A. Roger Vertrees, M. Jeffrey Jordan, and B. Joseph Zwischenberger. Hyperthermia and chemotherapy: The science. Current Clinical Oncology: Intraperitoneal Cancer Therapy, 2007. Humana Press Inc.
- [3] R. Michael Hamblin and M.Pawel. *Advances in Photodynamic Therapy*. Hamblin Mróz, Artech House, Engineering in Medicine and Biology, 2008.
- [4] P. B. Mullana and R. C. Millikan. Molecular subtyping of breast cancer, opportunities for new therapeutic approaches. Cell. Mol. Life Sci., 2007.
- [5] L. Pecorino. Molecular biology of cancer. Oxford university press, 2005.
- [6] Organización Mundial de la Salud. Cáncer. Centro de prensa, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>, 2010. Consultado Diciembre.
- [7] Wikipedia. Tratamientos del cáncer. http://es.wikipedia.org/wiki/tratamientos_del_Cancer, 2010. Consultado Julio.
- [8] WEB. Cáncer. <http://www.elmundo.es/elmundosalud/especiales/cancer/basicos2.html>, 2010. Consultado Agosto.
- [9] <http://www.cancer.org/docroot/home/index.asp?level=0>. Cáncer. WEB, 2009.
- [10] W. M. Przybyszewski, M. Wide, A. Szurko, and Z. Maniakowski. Dose rate-dependent cellular and molecular effects of ionizing radiation. Postepy Hig Med Dosw., 2008.
- [11] K. Sato, E. Rajendra, and T. Ohta. The ups, a promising target for breast cancer treatment. BMC Biochem., 2008.
- [12] <http://www.cancer.gov/diccionario/?CdrID=270742>. Cáncer. WEB, 2010.
- [13] <http://www.acsevents.org/docroot>. Cáncer, terapia dirigida. WEB, 2010.

- [14] S. Inogés, A. López Díaz de Cerio M. Rodríguez Calvillo, N. Zabalegui, and I. Melero. Inmunoterapia activa en el tratamiento de neoplasias hematológicas. *An. Sist. Sanit. Navar.*, 2004.
- [15] J. D. Spikes. The historical development of ideas on applications of photosensitized reactions in health sciences. In *R.V. Bergasson, G. Jori, E.J. Land, T.G. Truscott*, pages 209-227, 1985. *Primary Photoprocesses in Biology and Medicine*.
- [16] J. F. Carvin. *Des bienfaits de l insolation*, 1815.
- [17] M. F. Holick, J. A. MacLaughlin, J. A. Parrish, and R. R. Anderson. The photochemistry and photobiology of vitamin d. In J.A. Parrish J.D. Regan, editor, *The Science of Photomedicin*, pages 195-218, 1985.
- [18] N. R. Finsen. *Phototherapy*, 1901.
- [19] R. J. Cremer, P. W. Perryman, and D. H. Richards. Influence of light on the hyperbilirubinemia in infants, 1958.
- [20] WEB. Fotoquimioterapia. <http://www.cancer.gov/diccionario/?CdrID=44900>, 2010. Consultado Agosto.
- [21] Wikipedia. Fotoquimioterapia. <http://es.wikipedia.org/wiki/Fotoquimioterapia>, 2010. Consultado Agosto.
- [22] Y. Gilaberte, C. Serra Guillén, and M. Elena de las Heras. Terapia fotodinámica en dermatología. In *Revisión*, 2006.
- [23] O. Raab. Uber die wirkung fluoreszierender stoffe auf infurorien. *Z. Biol Vol 39.*, 1900.
- [24] H. von Tappeiner. Uber die wirkung fluoreszierender stoffe auf infurorien nach versuchen von o raab. *Munich Med. Wochenster Vol. 47*, 1900.
- [25] J. Prime. Les accidentes toxiques par l'éosinate de sodium. *Jouve and boyer*, 1900.
- [26] A. Jesionek and H. von Tappeiner. Therapeutische versuche mit fluoreszierenden stoffen. *Munich Med. Vol 47*, 1903.
- [27] H. von Tappeiner and A. Jodlbauer. Die seinsiblisierende wirkung fluoriezerender substanzer. *Gesammte Untersuchungen uber die photodynamische erscheinung Leipzig*, 1907.
- [28] H. Scherer. Chemisch-Physiologische untersuchungen. *Ann. Chem. Pharm Vol 40*, 1841. Part 1.
- [29] J. L. Thudichum. Tenth report of the medical officer of the privy council. *M. Stationary Office*, 1867.

-
- [30] F. Hoppe–Seyler. Eberhard–Karls universitat. Med Chem Untersuchungen, 1871.
- [31] W. Hausman. Die sensibilisierender wirkung des hematoporphyrins. Biochem Z. Vol 30, 1911. P. 276.
- [32] F. Meyer–Betz. Untersuchungen uber die biologische wirkung des hematoporphyrins und derivative des blut und galenfarbstoffs. Dtsch Arch Kiln Med Vol 11, 1913.
- [33] A. Policard. Etudes sur les aspects oferts pars des tumeurs experimentales examinees a la lumiere de wood. C. R. Soc. Biologyc Vol 91., 1924.
- [34] F. H. Figge, G. S. Weiland, and L. O. Manganiello. Afinity of neoplastic, embryonic and traumatized tissue of phorphyrins and metallophorphyrins. Proc. Soc. Exp Biol. Med. Vol 68., 1948.
- [35] L. O. Manganiello and F. H. Figge. Cancer detection and therapy ii. methods of preparation and biological effects of metallophorphyrins. Bull School Med. Univ. Vol 36., 1951.
- [36] D. S. Rasmussan–Taxdal, G. E. Ward, and F. H. Figge. Fluorescence of human lymphatic and cancer tissue following high doses of itravenous hematoporphyrin. Cancer Vol 8., 1955.
- [37] G. C. Peck, H. P. Mack, and W. A. Holbrook. Use of hematoporphyrin fluorescence bilary and cancer surgery. Ann Surg. Vol 21., 1955.
- [38] S. K. Schwartz, K. Absolon, and H. Vermund. Some relationships of phorphyrins, x–rays and tumors. Univ Minn Med. Bull Vol 27., 1955.
- [39] R. L. Lipson and E. J. Baldes. The use of derivative hematoporphyrin in tumor detection. J. Natl Cancer Inst. Vol 26., 1961.
- [40] R. L. Lipson, E. J. Baldes, and A. M. Olsen. Hematoporphyrin derivative, a new aid for endoscopic detection of malignant disease. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. Vol 42., 1961.
- [41] J. R. Leonard and W. L. Beck. Hematoporphyrin fluorescence, an aid in diagnosis of malignant neoplasms. Laryngoscope Vol 81., 1971.
- [42] J. H. Kinsey, D. A. Cortese, and D. R. Sanderson. Detection of hematoporphyrin fluorescence during fiber optic bronchoscopy to localize early bronchogenic carcinoma. Mayo clin. Proc Vol 53., 1978.
- [43] D. A. Cortese, J. H. Kinsey, and L. B. Woolner. Clinical aplication of a new endoscopic technique for detection in situ bronchial carcinoma. Mayo clin. Proc Vol 54., 1979.

- [44] A. E. Profio, D. R. Doiron, and E. J. King. Laser fluorescence bronchoscope for localizacion of of occult lung tumors. *Med. Phys* Vol 6., 1979.
- [45] R. C. Benson Jr., J. h. Kinsey, and J. R. Farrow.
- [46] R. C. Benson Jr., J. h. Kinsey, and D. A. Cortese. Treatment of transitional cell carcinoma of the bladder with hematoporphyrin derivative phototherapy. *J. Urol* Vol 130., 1983.
- [47] I. Diamond, S. G. Granelli, and A. F. McDonagh. Photodynamic therapy of malignant tumors. *Lancet* Vol 2., 1972.
- [48] T. J. Dougherty, J. B. Grindey, and R. Fiel. Photoradiation therapy ii. cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *J. Natl cancer Inst.* Vol 55., 1975.
- [49] J. F. Kelly, M. E. Snell, and M. C. Berenbaum. Photodynamic destruction of human bladder carcinoma. *Br. J. cancer* Vol 31., 1975.
- [50] H. von Tappeiner and A. Jodlbauer. Ueber die wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) stoffe auf protozoen und enzyme. In *Arch. Klin. Med.*, 1904.
- [51] H. von Tappeiner and A. Jodlbauer. Die sensibilisierende wirkung fluoreszierender substanzen. In *Vogel, Leipzig*, 1970.
- [52] H. F. Blum. *Photodynamic Action and Diseases Caused by Light*. Hafner, 1964.
- [53] J. Moan and K. Berg. Photochemotherapy of cancer, experimental research. *Photochem. Photobiol*, 1992.
- [54] F. Blum Harold. *Time's Arrow and Evolution*. 3rd ed. Princeton, 1968.
- [55] J. D. Spikes. Photosensitization, the science of photobiology. *Plenum Press*, pages 79-110, 1989.
- [56] N. J. Turro. Modern molecular photochemistry. *The Benjamin Cummings Publishing*, 1978.
- [57] C. Zhu Timothy, C. Jarod Finlay, Xiadong Zhou, and Jun Li. Modeling of singlet oxygen during photodynamic therapy using comsol multiphysics. Department of Radiation Oncology, 2006.
- [58] C. Timothy Zhua and C. Jarod Finlay. The role of photodynamic therapy (pdt) physics. In *Department of Radiation Oncology, University of Pennsylvania*, 2008.
- [59] M. J. Niedre, M. S. Patterson, A. Giles, and B. C. Wilson. photodynamically generated singlet oxygen luminescence in vivo. *Photochemistry and photobiology.*, 2005.

-
- [60] M. J. Niedre, M. S. Patterson, A. Giles, and B. C. Wilson. Direct near-infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells in vitro and tissues in vivo. *Photochemistry and photobiology.*, 2002.
- [61] M. Triesscheijn, P. Baas J. H. Schellens, and F. A. Stewart. Photodynamic therapy in oncology. *Oncologist*, 2006.
- [62] C. J. Kelty, N. J. Brown, M. W. Reed, and R. Ackroyd. The use of 5-aminolae-
vulinic acid as a photosensitiser in photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photochem Photobiol Sci.*, 2002. Review.
- [63] H. Auler and G. Banzer. Untersuchungen uber die rolle der porphyrine bei geschwulstkranken menschen und tieren. *Z. Krebsforsch*, 1942.
- [64] H. Fukuda, A. Casas, and A. Batlle. Aminolevulinic acid: from its unique biological function to its star role in photodynamic therapy. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005. February.
- [65] L. K. Lee. An interstitial assembly for photodynamic therapy in prostatic carcinoma. *BJU.bInt Vol. 84 No. 7.*, 1999.
- [66] D. A. Bellinier. Design and construction of a light delivery system for photodynamic therapy. *med Physics Vol. 26 No. 8.*, 1999.
- [67] Lexel Laser. How gasion lasers work. http://www.lexellaser.com/techinfo_gas-ion.htm, 2010. Consutado Diciembre.
- [68] Okunaka T, Harubimi K., Konaka C, Kawate N, Bonaminio A., and Yamamoto H et al. Photodynamic therapy for multiple primary bronchogenic carcinoma. *Cancer*, 1991.
- [69] Marijnissen JPA., Baas P., Beck JF., van Moll JH., van Zandwijk N., and Star WM. Pilot study on light dosimetry for endobronchial photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*, 1993.
- [70] Pope AJ and Bown SG. Photodynamic therapy. *Br J Urol*, 1991.
- [71] Edell ES and Cortese DA. Photodynamic therapy in the management of early superficial squamous cell carcinoma as an alternative to surgical resection. *Chest Journal* 102, 1992.
- [72] L. Brancalion and H. Moseley. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 17, 2002. Department of Medical Physics, The Photobiology Unit, Ninewells Hospital and Medical School, Dundee UK.
- [73] Itoh Y, Ninomiya Y, Tajima S, and Ishibash A. Photodynamic therapy for acne vulgaris with topical 5-aminolevulinic acid. *Arch Dermatol*, 2000. 136.

- [74] Soler AM, Angell-Petersen E, Warloe T, Tausio J, Steen HB, and Moan J et al. Photodynamic therapy of superficial basal cell carcinoma with 5-aminolaevulinic acid with dimethylsulfoxide and ethylenediaminetetraacetic acid: a comparison of two light sources. *Photobiol*, 2000. 71.
- [75] S. Fijan and H. Honigsman. Photodynamic therapy of epithelial skin tumors using delta aminolevulinic acid and desferrioxamine. Vol. 133 No. 2., 1995.
- [76] Moseley H. Total effective fluence: a useful concept in photodynamic therapy. *Laser Med Sci*, 1996. 11.
- [77] Kennedy JC., Marcus SL., and Pottier RH. Photodynamic therapy (pdt) and photodiagnosis (pd) using endogenous photosensitization induced by 5-aminolevulinic acid (ala): mechanisms and clinical results. *J Clin Laser Med Surg*, 1996. 14.
- [78] Morton CA., Whitehurst C., Moseley H., McColl JH., Moore JV., and MacKie RM. Comparison of photodynamic therapy with cryotherapy in the treatment of bowens disease. *Br J Dermatol*, 1996. 135.
- [79] Thissen MR., Neumann MH, and Schouten LJ. A systematic review of treatment modalities for primary basal cell carcinomas. *Arch Dermatol*, 1999. 135.
- [80] Bissonnette R., Shapiro J., Zeng H., Mclean DI., and Liu H. Topical photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid does not induce hair regrowth in patients with extensive alopecia areata. *Br J Dermatol*, 2000. 143.
- [81] Z. Luksiene, J. Astrauskas, and I. Kabbara. Led based light source for photodynamic therapy inactivation of leukemia cells in vitro. *SPIE*, Vol 4952, 2004.
- [82] P. Babilas. in vitro and in vivo comparison of two different light sources for topical photodynamic therapy. *Br.J Dermatol* Vol 154. No 4., 2006.
- [83] Markolf H. Niemz. *Laser-tissue interactions. Fundamentals and Applications*, third, Enlarged Edition, 2007. Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering.
- [84] American Association of Physicists in Medicine. Photodynamic therapy dosimetry, a task group report of the general medical physics committee of the science council. Medical Physics Publishing, July 2005. AAPM REPORT NO. 88.