



**I  
N  
A  
O  
E**

# **Desarrollo y estandarización de un sistema de irradiación para terapia fotodinámica aplicada en un modelo de cáncer de mama murino**

Por

**Maldonado Olalde Iván Betsabeel**

Presentado como requisito parcial para la obtención del grado de:

**Maestría en Ciencias y Tecnologías Biomédicas**

en el:

**Instituto Nacional De Astrofísica,  
Óptica Y Electrónica**

Abril 2022  
Tonantzintla, Puebla

Supervisado/a por:

**Teresita Spezzia Mazzocco**

©INAOE 2022

Derechos Reservados

El autor otorga al INAOE el permiso de reproducir y distribuir copias de esta tesis en su totalidad o en partes mencionando la fuente.



# Agradecimientos

---

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible este trabajo:

En primer lugar, agradezco profundamente a Dios que fue mi principal apoyo y motivador para cada día continuar sin tirar la toalla, a mi familia por su amor incondicional y el apoyo que siempre me brindan en cada una de las decisiones que he tomado.

A mis directoras de tesis, la Dra. Teresita Spezzia Mazzocco y la Dra. Guadalupe Delgado López, 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.

A Evoli y Mónica por sus consejos y por compartir sus conocimientos conmigo.

Al Centro de Investigación Biomédica de Oriente por permitirme trabajar en sus instalaciones.

Al Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica por los servicios, las facilidades y el apoyo económico que me ofrecieron para realizar la maestría.

Agradezco a mis compañeros de maestría/grupo de biofotónica por su apoyo y consejos que fueron de gran utilidad.

A mis amigos José Tlaque, Eliza Tome, Iván Romo, Ricardo Gasca, Daniel Soto y Odiceo Vázquez por sus consejos, apoyo y ánimos que me brindaron durante todo este trayecto.

Por último, les agradezco a todas las personas que invirtieron su tiempo para echarle una mirada a mi proyecto, gracias por permitir a mis experiencias, investigaciones y conocimientos, incurrir dentro de su repertorio de información mental.

# Resumen

---

La terapia fotodinámica (TFD) ha demostrado ser efectiva en el tratamiento de diversas enfermedades como el cáncer, este tratamiento consiste en la aplicación de un compuesto denominado fotosensibilizador (FS) que se combina con una fuente de luz para activarlo. En este trabajo de tesis se reporta el diseño y construcción de un sistema de irradiación desarrollado a partir de la tecnología LED que facilita la aplicación de esta terapia en tumores desarrollados en un modelo murino. Este sistema de irradiación consta de un controlador electrónico, una punta de irradiación con un área de irradiación de 1 cm<sup>2</sup> y un software de control desarrollado en LabVIEW. El principio del funcionamiento del sistema consiste en la irradiación superficial con una luz a 600 – 700 nm con un pico máximo de emisión de 650 nm, con una potencia óptica promedio de 100 mW.

A la vez se estudió el efecto citotóxico producido por la TFD mediada con azul de metileno (AM) en la línea celular de cáncer de mama murino 4T1 donde se utilizaron dosis de FS de 10 y 20 µM en combinación de una dosis de luz de 40 J/cm<sup>2</sup>, donde se observó que la TFD genera un efecto citotóxico altamente significativo al reducir la viabilidad celular en un 72.9% y un 96.7% respectivamente.

Posteriormente se estudió el efecto de la TFD sobre tumores de mama desarrollados a partir de la inoculación de células 4T1 en la glándula mamaria de ratonas Balb/c de 8 semanas de edad, las cuales fueron inoculadas con células 4T1 en una glándula mamaria del flanco derecho. La respuesta terapéutica se investigó mediante la inyección intratumoral de AM al 1% y posteriormente se irradiaron de forma superficial con una dosis de luz de 100 J/cm<sup>2</sup>. Estas condiciones generaron un retardo en el crecimiento tumoral de al menos el 63% en comparación con las ratonas control.

La investigación reportada en esta tesis es de gran importancia, debido a que se presenta el efecto que se genera al utilizar TFD - AM en el modelo de cáncer de mama generado con células 4T1, el cual se considera un modelo altamente metastásico pues emula un cáncer en

estadio IV. Es importante mencionar que las condiciones empleadas en esta investigación no se han reportado con anterioridad, Por lo que este trabajo permitió establecer las condiciones óptimas de FS y radiación para la estandarización del modelo tumoral de cáncer de mama, al igual que el desarrollo de un sistema de irradiación para la aplicación de la TFD en ratones.

# Abstract

---

Photodynamic therapy (PDT) has proven to be effective in the treatment of various diseases such as cancer, this treatment consists of the application of a compound called a photosensitizer that is combined with a light source to activate it. This thesis work reports the design and construction of an irradiation system developed from LED technology that facilitates the application of this therapy in tumors developed in a murine model. This irradiation system consists of an electronic controller, an irradiation tip with an irradiation area of  $1 \text{ cm}^2$  and a control software developed in LabVIEW. The principle of operation of the system consists of surface irradiation with a light at 600 - 700 nm with a maximum emission peak of 650 nm, with an average optical power of 100 mW.

At the same time, the cytotoxic effect produced by methylene blue (AM) PDT was studied in the murine breast cancer cell line 4T1 where photosensitizer doses of 10 and 20  $\mu\text{M}$  were used in combination with a light dose of  $40 \text{ J/cm}^2$ . where it was observed that PDT generates a highly significant cytotoxic effect by reducing cell viability by 72.9% and 96.7% respectively. Subsequently, the effect of PDT on breast tumors developed from the inoculation of 4T1 cells in the mammary gland of 8-week-old Balb / c mice, which were inoculated with 4T1 cells in a mammary gland of the right flank, was studied. The therapeutic response was investigated by intratumoral injection of 1% AM and subsequently superficially irradiated with a light dose of  $100 \text{ J/cm}^2$ .

These conditions generated a delay in tumor growth of at least 63% compared to control mice. The research reported in this thesis is of great importance, because it presents the effect generated by using PDT-AM in the model of breast cancer generated with 4T1 cells, which is considered a highly metastatic model as it emulates a cancer in stage IV. It is important to mention that the conditions used in this research have not been previously reported, so this work allowed to establish the optimal conditions for the standardization of the breast cancer tumor model, as well as the development of an irradiation system for the application of PDT in mice.

# Contenido

---

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>II</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>V</b>
<b>FIGURAS</b>	<b>IX</b>
<b>CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 ANTECEDENTES.....	3
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	6
1.3 OBJETIVOS.....	7
1.3.1 <i>General</i>	7
1.3.2 <i>Específicos</i>	7
1.4 HIPÓTESIS.....	8
<b>CAPÍTULO 2 MARCO TEÓRICO</b>	<b>9</b>
2.1. CÁNCER.....	10
2.1.1. <i>Cáncer de mama</i>	12
2.1.2. <i>Modelos de investigación en cáncer</i>	15
2.1.2.1. <i>Modelo in vitro</i>	15
2.1.2.2. <i>Modelo in vivo</i>	17
2.1.3. <i>Tratamientos anticancerígenos</i>	18
2.1.3.1. <i>Tratamientos locales</i>	18
2.1.3.2. <i>Tratamientos sistémicos</i>	19
2.2. TERAPIA FOTODINÁMICA.....	20
2.2.1. <i>Mecanismo de la TFD</i>	21
2.2.2. <i>Oxígeno molecular</i>	24
2.2.3. <i>Fotosensibilizadores</i>	24
2.2.3.1. <i>Azul de metileno</i>	25
2.2.4. <i>Fuentes de luz</i>	28
2.2.4.1. <i>Fuentes de diodo emisor de luz</i>	30
2.2.4.2. <i>Interacción de la luz con el tejido</i>	31
2.9. ESTÁNDARES Y NORMAS PARA EL DESARROLLO DE DISPOSITIVOS.....	33
<b>CAPÍTULO 3 DISEÑO Y DESARROLLO DEL DISPOSITIVO</b>	<b>35</b>
3.1. CONSIDERACIONES PREVIAS.....	37
3.2. DISEÑO ELÉCTRICO DEL SISTEMA.....	38
3.2.1. <i>Circuito control del LED</i>	39
3.2.2. <i>Circuito control de seguridad</i>	40
3.3. DESARROLLO DEL CIRCUITO IMPRESO.....	42
3.4. DESCRIPCIÓN DE LA ESTRUCTURA.....	45
3.5. DESCRIPCIÓN DEL IRRADIADOR.....	46
3.6. DISEÑO DEL SOFTWARE.....	47

3.6.1.	<i>Requerimientos del software</i>	48
3.6.2.	<i>Base de datos en Access</i>	48
3.6.3.	<i>Pantalla de acceso</i>	48
3.6.4.	<i>Menú principal</i>	49
3.6.5.	<i>Registro de nuevos usuarios</i>	50
3.6.6.	<i>Historial de usuarios</i>	50
3.6.7.	<i>Aplicación de la TFD</i>	51
3.7.	RESULTADOS DEL DISPOSITIVO PARA USO EN RATONES.....	52
3.7.1.	<i>Medición de potencia</i>	52
3.7.2.	<i>Medición del espectro de emisión</i>	55
<b>CAPÍTULO 4 METODOLOGÍA</b>		<b>57</b>
4.1.	MATERIALES .....	58
4.1.1.	<i>Línea celular</i>	58
4.1.2.	<i>Ratones</i>	58
4.1.3.	<i>Dispositivos lumínicos</i>	59
4.2.	MÉTODOS.....	60
4.2.1.	<i>Cultivo celular</i>	60
4.2.2.	<i>Captación del AM</i>	61
4.2.3.	<i>Aplicación de la TFD in vitro</i>	62
4.2.4.	<i>Evaluación del efecto de la TFD por la técnica de MTT</i>	63
4.3.	TERAPIA FOTODINÁMICA EN MODELO MURINO .....	64
4.3.1.	<i>Inoculación de ratonas</i>	64
4.3.2.	<i>Medición del tumor</i>	65
4.3.3.	<i>Aplicación de la TFD in vivo</i>	65
4.3.4.	<i>Infiltración y Captación del AM en tumores</i>	66
4.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	67
<b>CAPÍTULO 5 RESULTADOS</b>		<b>68</b>
5.1.	CAPTACIÓN DE FS.....	69
5.2.	EFFECTO DE LA TFD EN LA VIABILIDAD CELULAR .....	70
5.3.	EFFECTO DE LA TFD EN LA MORFOLOGÍA CELULAR .....	72
5.4.	GENERACIÓN DEL MODELO TUMORAL EN RATONES.....	76
5.5.	TFD EN MODELO MURINO.....	78
5.6.	ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS INVOLUCRADOS EN TFD .....	80
5.6.1.	<i>Infiltración del FS en el tumor</i>	80
5.6.2.	<i>Captación del AM por el tumor</i>	82
5.7.	RESPUESTA TERAPÉUTICA DE LA TFD CON CONDICIONES DE ADMINISTRACIÓN DE FS Y LUZ MEJORADA.....	82
<b>CAPÍTULO 6 DISCUSIÓN</b>		<b>88</b>
<b>CAPÍTULO 7 CONCLUSIONES</b>		<b>95</b>
7.1.	<i>Conclusiones</i>	96
7.2.	<i>Trabajo futuro</i>	97
<b>REFERENCIAS</b>		<b>99</b>

<b>ANEXO A. ANÁLISIS Y MODIFICACIÓN DEL DISPOSITIVO EMPLEADO EN LA TFD CON CULTIVOS CELULARES</b>	<b>106</b>
<b>ANEXO B. PROGRAMAS DESARROLLADOS EN LABVIEW PARA EL SISTEMA DE IRRADIACIÓN</b>	<b>111</b>
<b>ANEXO C. DIAGRAMAS DESARROLLADOS EN KICAD PARA EL SISTEMA DE IRRADIACIÓN</b>	<b>115</b>
<b>ANEXO D. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>1158</b>

# Figuras

---

Figura 1. Ilustración de la formación de un tumor. ....	10
Figura 2. Ilustración del proceso de metástasis. ....	12
Figura 3. Anatomía de la mama femenina. ....	12
Figura 4. Principales tipos de cáncer por país, ambos sexos, todas las edades. ....	13
Figura 5. Principales modelos experimentales. ....	15
Figura 6 . Tipos de cultivos primarios. ....	16
Figura 7. Elementos principales de la TFD. ....	20
Figura 8. Principios de la TFD. ....	22
Figura 9. Esquema del mecanismo de acción de la TFD. ....	23
Figura 10. Estructura química del AM. ....	25
Figura 11. Espectro de absorción del AM. ....	27
Figura 12. Representación de las emisiones de ondas en los diferentes tipos de luz. ....	29
Figura 13. Ejemplos de fuentes de luz utilizadas en TFD. ....	30
Figura 14. Tipos de LED's comerciales ....	31
Figura 15. Interacción de la luz con el tejido biológico. ....	32
Figura 16. Esquema del sistema de irradiación para TFD. ....	36
Figura 17. Esquema interno del diodo emisor de luz. ....	38
Figura 18. Esquema del circuito realizado para el control de la fuente de iluminación. ....	39
Figura 19. Configuración del controlador BuckPuck 3023-DE-700 para el uso con microcontroladores. ....	39
Figura 20. Ejemplo de una señal de salida de PWM. ....	40
Figura 21. Circuito de seguridad. ....	41
Figura 22. Circuito impreso diseñado en Kicad. ....	41
Figura 23. Software y hardware utilizados en el desbaste del circuito impreso. ....	42

Figura 24. Cara superior e inferior del circuito impreso.....	43
Figura 25. Aplicación de mascarilla antisoldante.....	43
Figura 26. Lavado con carbonato de potasio.....	44
Figura 27. Vista superior e inferior de la placa terminada. ....	44
Figura 28. Modelo 2D diseñado en Eplan.....	45
Figura 29. Modelo 3D diseñado en solidworks. ....	46
Figura 30. Modelo 3D del irradiador diseñado en solidworks.....	47
Figura 31. Base de datos desarrollada en el software Access.....	48
Figura 32. Pantalla de acceso del programa ejecutable para el sistema de irradiación.....	49
Figura 33. Menú del sistema de irradiación. ....	49
Figura 34. Pantalla de registro para nuevos usuarios del sistema de irradiación.....	50
Figura 35. Pantalla de historial de usuarios del sistema de irradiación.....	51
Figura 36. Pantalla principal para la aplicación de la terapia. ....	51
Figura 37. Potencia promedio del dispositivo para ratones.....	53
Figura 38. Potencia y temperatura del LED al 100% de intensidad.....	54
Figura 39. Potencia del LED con lente concentradora.....	55
Figura 40. Espectro de absorción del dispositivo para ratones.....	56
Figura 41. Dispositivo de irradiación para estudios <i>in vitro</i> .....	59
Figura 42. Dispositivo de irradiación para estudios <i>in vivo</i> .....	60
Figura 43. Configuración del cultivo celular en placas de 96 pozos.....	63
Figura 44. Calibración del dispositivo.....	66
Figura 45. Espectro de absorción de células 4T1 interactuadas con las diferentes concentraciones de AM utilizadas en los experimentos.....	69
Figura 46. Resultados de viabilidad celular a las 24 h del tratamiento. ....	70
Figura 47. Análisis comparativo del efecto citotóxico de la TFD en la viabilidad celular medido por medio del ensayo de MTT (Ctrl: Control).....	71
Figura 48. Morfología celular en grupos utilizados para TFD con AM.....	74
Figura 49. Morfología celular en grupos de TFD con AM.....	74

Figura 50. Evolución del tamaño tumoral en ratonas del bioterio de la BUAP y Centro médico inoculadas con $100 \times 10^3$ células 4T1. ....	76
Figura 51. Necrosis tumoral presentada en ratonas BALB/c inoculadas con $10 \times 10^4$ células 4T1.....	77
Figura 52. Evolución del tamaño tumoral en ratonas BALB/c obtenidas del bioterio de centro médico inoculadas con de $50 \times 10^4$ células 4T1. ....	77
Figura 53. Evaluación del volumen tumoral en experimento de TFD en tumores de cáncer de mama generados por la inoculación de células 4T1 en ratonas BALB/c. ....	79
Figura 54. Evolución del tamaño tumoral con inoculación de $50 \times 10^3$ células. ....	80
Figura 55. Diversos métodos de infiltración utilizados para administración de AM en tumores con volúmenes de $100 \text{ mm}^3$ .....	81
Figura 56. Prueba de tiempo de absorción del AM por las células del tumor. ....	81
Figura 57. Corte longitudinal de tumor que fue inmerso en AM al 1% por 16.5 h. ....	82
Figura 58. Ratonas empleadas en 2do experimento .....	83
Figura 59. Seguimiento del crecimiento tumoral en ratones empleados durante el experimento de TFD en ratonas BALB/c con AM al 1% y $100 \text{ J/cm}^2$ de luz (Ctrl: Control).....	85
Figura 60. Comparación del volumen tumoral final entre los diversos grupos utilizados. ....	85
Figura 61. Órganos extraídos de las diferentes ratonas empleadas en el 2do experimento... ..	86
Figura 62. Pulmones extraídos de ratonas BALB/c a los 16 días después del experimento de TFD. ....	87
Figura 63. Potencia promedio del dispositivo lumínico utilizado en cultivos celulares.....	107
Figura 64. Incremento de temperatura en el dispositivo utilizado en la TFD con cultivos celulares. ....	108
Figura 65. Comparación del parámetro de potencia en dispositivo sin modificar y modificado. ....	109
Figura 66. Parámetros de temperatura en dispositivo modificado.....	109
Figura 67. Espectro de emisión en dispositivo para cultivo celular.....	110

Figura 68. Diagrama a bloques de la pantalla acceso de la interfaz gráfica .....	112
Figura 69. Diagrama a bloques de la pantalla historial de la interfaz gráfica .....	112
Figura 70. Diagrama a bloques de la pantalla registros de nuevos usuarios en la interfaz gráfica.....	113
Figura 71. Diagrama a bloques de la subrutina de registro de usuarios.....	113
Figura 72. Diagrama a bloques de la pantalla aplicación de TFD .....	114
Figura 73. Diagrama a bloques de la pantalla menú .....	114
Figura 74. Diagrama eléctrico del sistema de irradiación.....	116
Figura 75. Diagrama PCB del sistema de irradiación.....	117
Figura 76. Medianas de los grupos empleados en TFD .....	119

# Tablas

---

---

Tabla 1. Factores de riesgo establecidos y emergentes para cáncer de mama.....	14
Tabla 2. Estudios del AM en TFD.....	28
Tabla 3. Normas para dispositivos médicos.....	34
Tabla 4. Volúmenes tumorales registrados de los grupos utilizados en TFD durante el 1er experimento .....	78
Tabla 5. Volúmenes tumorales registrados de los grupos utilizados en TFD .....	84
Tabla 6. Volumen del bazo registrados en los grupos utilizados en TFD.....	86
Tabla 7. Estudios de TFD-AM en células 4T1.....	94
Tabla 8. Porcentaje de células viables obtenidas tras los experimentos .....	119
Tabla 9. Datos empleados para la aplicación de kruskal-wallis .....	120
Tabla 10. Tabla de datos arreglados para el uso del método de DUNCAN.....	121
Tabla 11. Resultados de la prueba de Duncan (comparación entre grupos).....	122



# Capítulo 1

## Introducción



En este capítulo se estructura una breve introducción del trabajo de tesis, presentando antecedentes que evidencian los trabajos TFD en el tratamiento del cáncer y finalmente se presenta el planteamiento, justificación, objetivos e hipótesis de esta tesis.

## **Introducción**

El cáncer de mama es el tipo de neoplasia que se diagnostica con mayor frecuencia en mujeres de todo el mundo. Solo en el año 2020 se diagnosticaron un total de 2,261,419 casos nuevos en hombres y mujeres de todas las edades y la situación en México no es diferente debido a que en el mismo año se estimaron un aproximado de 195,499 nuevos casos y un total de 90,222 defunciones. Lo que ubica a esta afección como el segundo tipo de cáncer de mayor índice de mortalidad (*Age Standardized (World) Incidence Rates, Breast, All Ages*, n.d.; *Mexico*, n.d.).

Actualmente, existen distintos tratamientos contra el cáncer de mama (cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia, terapia hormonal, etc.) que, si bien tienen un efecto importante sobre las células cancerígenas también afectan células no tumorales generando efectos secundarios severos (*Cáncer de Mama - Diagnóstico y Tratamiento - Mayo Clinic*, n.d.). Por lo anterior surge la necesidad de implementar tratamientos alternativos que sean efectivos, menos invasivos y que se puedan utilizar como adyuvantes. Ante estas necesidades se presenta la TFD ya que se ha empleado en cáncer de pulmón, cuello uterino, esófago, vejiga y cabeza (Guan et al., 2014; E. J. Lim et al., 2013; Obstoy et al., 2016a; Wagner et al., 2012).

## Antecedentes

El uso de la luz en combinación con un compuesto fotosensible se remonta a la antigüedad, teniendo sus inicios en la antigua Grecia, Egipto e India. Un ejemplo de esto se puede encontrar en el texto sagrado hindú Atharva Veda que data del 1400 a.c. donde se reporta el uso de plantas (*Eclipta prostrata*, *Citrullus colocynthis* y *Curcuma longa*) que, en combinación con la luz del sol, presentaron un efecto positivo en el tratamiento de enfermedades como el vitíligo. Por lo cual se le considera el inicio de la TFD (Abdel-kader, 2016; Fitzpatrick & Pathak, 1959).

Sin embargo, fue hasta los finales de 1800 y principios de 1900 cuando este concepto es retomado y atribuido a Oskar Raab, un estudiante de medicina que trabajaba bajo la guía del profesor Herman von Tappeiner en el Instituto Farmacológico de Munich Alemania, donde observó por primera vez un efecto fotodinámico *in vitro* al realizar un estudio sobre la toxicidad de la naranja de acridina en paramecios (Abdel-kader, 2016; Daniell & Hill, 1991; Hamblin & Huang, 2013). El descubrimiento casual de Raab demostró que los paramecios en las soluciones de naranja de acridina se inactivaban más efectivamente si las soluciones se exponían a una fuente de luz (Daniell & Hill, 1991).

En los años siguientes Von Tappeiner se hizo cargo de la investigación de Raab y junto con el dermatólogo Jesionek llevaron a cabo las primeras tentativas de aplicar la TFD para el tratamiento de enfermedades como lupus y cáncer (Abdel-kader, 2016; Velpula & Lingam, 2014). Inicialmente las fuentes de luz más utilizadas fueron las lámparas de tungsteno, xenón y halógeno caracterizadas por ser fuentes con un espectro de emisión amplio, que necesitaban del uso de filtros para obtener la longitud de onda adecuada para la excitación del FS utilizado. Sin embargo, debido a su limitada potencia óptica de este tipo de fuentes su uso se enfocó en el tratamiento a afecciones superficiales (Allevato, 2006; Brancalion & Moseley, 2002). Así, el desarrollo de la tecnología láser dio un gran aporte a los estudios de la TFD debido a su facilidad de acoplarse a fibras ópticas en combinación con su alta potencia óptica,



satisfaciendo así las demandas de iluminación para el tratamiento de afecciones que se localizan en lugares de difícil acceso. El mayor inconveniente de estas fuentes de luz es su alto requerimiento eléctrico y su costoso mantenimiento. Estos motivos dieron paso al uso de diodos láser ya que se comparan en muchos aspectos a las fuentes laser, pero con un costo menor. La limitación que presentan estas fuentes de luz es la poca gama de longitudes de onda que se pueden encontrar de forma comercial (Brancaleon & Moseley, 2002).

En los últimos años la tecnología de los diodos emisores de luz (LED's) se ha convertido en una opción fiable para el desarrollo de fuentes de luz para TFD, pues tienen la ventaja de contar con diversas longitudes de onda, tipos y potencias aunado a su coste menor en comparación con los diodos laser y con la ayuda de componentes ópticos se pueden acoplar a fibras ópticas (Hernández-Quintanar et al., 2012). En cuanto al uso del AM como FS existen varias investigaciones donde utilizan este compuesto para el tratamiento de afecciones cancerígenas. Un suceso importante se presentó en el año de 1995 cuando el doctor Orth reportó el uso de este compuesto para el tratamiento de un adenocarcinoma en modelo murino, su investigación demostró que el AM en combinación con una longitud de onda de 665 nm, generaba un efecto citotóxico en el crecimiento del tumor. Lo cual abrió la posibilidad de considerar a la TFD mediada con AM (TFD-AM) para el tratamiento de este tipo de cáncer (Orth et al., 1995, 1998). Sin embargo, también se ha demostrado su efecto en otros tipos de cáncer como el adenocarcinoma de células de pulmón o el carcinoma de células escamosas.(AP et al., 2018; Obstoy et al., 2016b). En años recientes se ha reportado el uso de TFD-AM para el tratamiento de cáncer de mama, en estos estudios informaron el efecto citotóxico que se presentó al exponer líneas tumorales y no tumorales a la TFD. Estos estudios abren la posibilidad de utilizar la TFD-AM como un tratamiento dirigido contra el cáncer de mama (A. F. dos Santos et al., 2017a), por lo que la investigación reportada en esta tesis es de gran importancia, debido a que se estudió el efecto de la TFD mediada con AM en el modelo de cáncer de mama triple negativo generado con células 4T1, condiciones de las cuales no se han presentado reportes.



## Planteamiento del problema

El uso de la TFD como una terapia coadyuvante para el tratamiento de cáncer ha presentado diversas investigaciones tanto *in vitro* como *in vivo*. Siendo en su mayoría investigaciones que se centran en el uso de FSs derivados de la hematoporfirina. Un ejemplo de esto es el Fotofrin, un FS del cual se ha reportado efectos secundarios como la fotoalergia que impide que los pacientes interactúen con la luz directa del sol o la luz artificial por algunos días. Para combatir estos efectos se ha planteado el uso de colorantes orgánicos. Sin embargo, en la mayoría de los reportes discrepan en las dosis de FS y luz utilizada, al igual que en el método de administración y el tiempo de incubación del FS.

De igual forma algunas fuentes de luz que se han utilizado en estos trabajos son dispositivos basados en tecnología LED con un control análogo en donde el usuario puede regular la potencia de la fuente, pero no puede controlar de forma automática los tiempos de irradiación. Lo cual permite la generación de errores en dosificación de la luz, debido al error humano.

Otra limitación que presentan estos dispositivos es el método de irradiación ya que la mayoría de estas fuentes solo permiten la irradiación superficial. Sin embargo, en presencia de tumores profundos estos dispositivos son ineficientes pues no cuentan con la capacidad de transportar la luz de manera eficiente.



## Justificación

Trabajos de TFD-AM *in vitro* desarrollados previamente por el grupo INAOE/CIBIOR, mostraron resultados satisfactorios al aplicar la TFD en líneas celulares tumorales de mama MDA-MB231 (cáncer triple negativo), T47 (progesterona positiva) y una línea celular no tumoral de mama MCF-10A. Por lo que se considera importante continuar con los estudios de TFD-AM en un modelo *in vivo* que a futuro y cumpliendo con todas las normas pueda ser aplicado en el área clínica. Por lo tanto, es obligatorio establecer las mejores condiciones (concentración de FS, dosis de luz, vía de administración) para aplicar esta terapia de forma efectiva en un modelo murino.

Actualmente la mayoría de los sistemas para aplicaciones de luz en TFD se basan en los diodos láser y lámparas incandescentes de alta potencia. Sin embargo, cada dispositivo se ve limitado debido al método de administrar la luz al órgano diana, al área de exposición y al costo.

La tecnología actual de los LED's de alta potencia permite desarrollar sistemas de irradiación con los cuales se pueden generar las densidades de energía adecuadas para la TFD y su costo de implementación es menor, de igual forma, estos se pueden acoplar a fibras ópticas permitiendo así la irradiación intersticial, aunque presentando pérdidas de intensidad / potencia.

Por estas razones se pretende desarrollar un sistema de irradiación de luz para aplicaciones superficiales e intersticiales en la TFD con control de dosimetría mediante el uso de LED's de alta potencia, tratando de reducir las pérdidas de intensidad generadas por el acoplamiento a la fibra óptica



## Objetivos

### 1.3.1 General

Diseñar y desarrollar un sistema de irradiación para la aplicación de la TFD sobre la línea celular 4T1 y estandarizar el procedimiento de aplicación en tumores generados en un modelo murino.

### 1.3.2 Específicos

- Diseñar y desarrollar un sistema de irradiación con LED's para la aplicación de TFD de manera superficial y mediante fibra óptica.
- Diseñar e implementar una interfaz gráfica de usuario para el control del sistema de irradiación.
- Evaluar el efecto citotóxico de la TFD en la línea celular tumoral 4T1.
- Estandarizar un protocolo de TFD, utilizando AM y el sistema de irradiación construido en tumores generados en un modelo murino.



## Hipótesis

Para este trabajo se han postulado diferentes hipótesis:

La TFD-AM ejerce un efecto citotóxico en la línea celular de cáncer de mama de ratón 4T1.

El sistema de irradiación construido y empleado en la TFD disminuye el tamaño de tumores generados en ratonas BALB/c inoculadas con células de cáncer de mama 4T1.

# Capítulo 2

**Marco Teórico**

En este capítulo se abordan los aspectos más generales sobre el cáncer, en específico el cáncer de mama, modelos de investigación y tratamientos enfatizando en los aspectos más importantes de la TFD. Por otra parte, se hace una introducción al AM, la fuente de luz, los efectos de la luz al interaccionar con el tejido biológico y las normas que se recomiendan para el desarrollo de las fuentes de luz.

## 2.1. Cáncer

La proliferación celular se encuentra cuidadosamente regulada por el organismo gracias a la proteína p53, las quinasas dependientes de ciclinas y el factor de crecimiento epitelial, entre otros, los cuales controlan esta multiplicación y rara vez son alterados. Sin embargo, su alteración culmina en la proliferación descontrolada de células anormales que eventualmente pueden evolucionar hacia una población celular que invade tejidos (Figura 1. Ilustración). A este conjunto de características se le denomina cáncer (Ruddon, 2007).

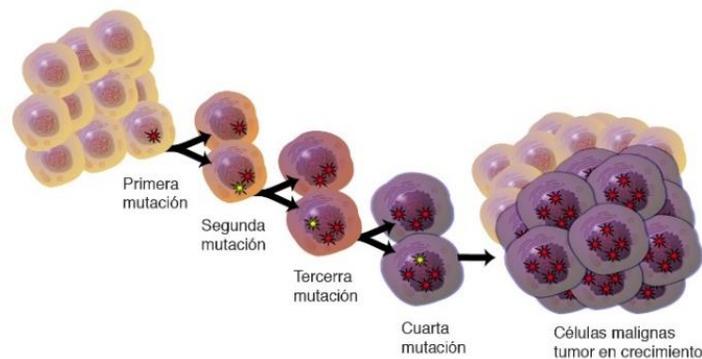


Figura 1. Ilustración de la formación de un tumor.

Fuente: Ver Referencia (*Cáncer*, n.d.)

Las células cancerígenas poseen características particulares que las distinguen de las células normales, por ejemplo (Hanahan & Weinberg, 2011; Ruddon, 2007):

1. Bloquean la señalización que induce la muerte celular.
2. Tienen la capacidad de evadir supresores de crecimiento y evadir los mecanismos de inhibición por contacto.
3. Pueden alterar su anclaje con otras células con el objetivo de abandonar su lugar inicial e invadir nuevos tejidos.

4. Inhiben el sistema inmune e influyen sobre las células normales a fin de crear un ambiente propicio para el desarrollo del tumor.
5. Tienen una gran inestabilidad, lo que permite que acumulen mutaciones en el genoma de la célula cancerígena.
6. Las células cancerígenas pueden reprogramar su metabolismo de la glucosa, limitando su producción energética a la glucólisis.
7. Los tumores poseen la capacidad de inducir el crecimiento de vasos sanguíneos secretando factores proangiogénicos.

Una consideración importante es que los tumores no solo se encuentran compuestos por células malignas, sino que incluyen distintos tipos de células como las células endoteliales y los pericitos, las células del sistema inmunitario, los fibroblastos asociados al cáncer y las células madre y progenitoras del estroma tumoral cuya labor es participar en la progresión del tumor. La combinación de células normales y neoplásicas malignas crea un microambiente crucial para la evolución del tumor (McPherson et al., 2000).

Se considera que la causa del cáncer es netamente genética, pero esta es una situación distinta a la de las enfermedades genéticas clásicas, ya que se originan en células somáticas con peculiaridades dependientes del tipo de célula donde se originan, sus causas y su mecanismo, el grado de malignidad y otros factores. Se manifiesta en alteraciones bioquímicas de todo tipo a nivel celular, tisular y particularmente, por la aparición de marcadores tumorales (Grille et al., 2003). Estas alteraciones genéticas pueden ser heredadas, causadas por errores en la replicación del ADN o también pueden ser debidas a la exposición de factores de riesgo como productos químicos, radiaciones, tabaco, o inclusive factores inherentes como la edad (*Cáncer*, n.d.; Ruddon, 2007).

Un tumor cancerígeno puede propagarse a otras partes del cuerpo a través de la sangre o el sistema linfático y forman un nuevo tumor en otros órganos o tejidos en un proceso que se le denomina metástasis (Figura 2. Ilustración). En general, si esta afección no es tratada el cáncer a menudo termina siendo mortal (Ruddon, 2007; Zubair & Ahmad, 2017).

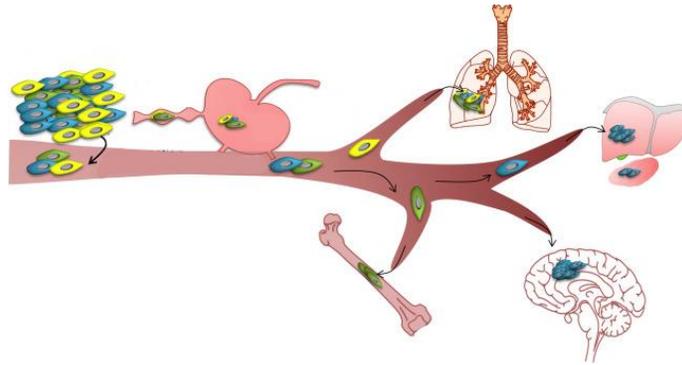


Figura 2. Ilustración del proceso de metástasis.  
Fuente: Ver Referencia (Zubair & Ahmad, 2017)

### 2.1.1. Cáncer de mama

El término “cáncer de mama” hace referencia a la proliferación descontrolada de células en la mama. Este tipo de cáncer puede comenzar en distintas áreas de la mama: En tejido conectivo (formado por tejido fibroso y adiposo con la función de sostener todas las partes de la mama), lobulillos (glándulas que producen leche) o conductos (encargados de transportar la leche al pezón) siendo estos 2 últimos los más comunes (Figura 3). La diseminación del cáncer a otros tejidos está en función del tipo de cáncer, siendo el más invasivo el cáncer ductal infiltrante. Su diseminación a través de vasos sanguíneos o vasos linfáticos permitirá el establecimiento de las células tumorales en órganos blanco como, pulmón, cerebro y hueso (*Definición de Glándula Mamaria*, n.d.; *¿Qué Es El Cáncer de Mama?*, n.d.).

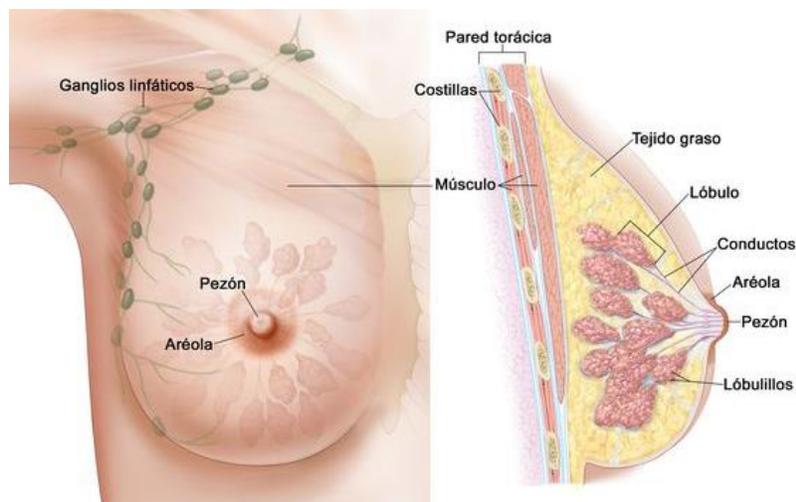


Figura 3. Anatomía de la mama femenina.  
Fuente: Ver Referencia (*Definición de Glándula Mamaria*, n.d.)

Como se mencionó en la introducción, el cáncer de mama es un problema de salud a nivel mundial, ya que es la neoplasia con mayor frecuencia en todo el mundo (Figura). Este tipo de cáncer también se puede llegar a presentar en hombres. Sin embargo, el 99% de los casos se presenta en mujeres. La edad de incidencia se presenta después de los 50 años y se considera que aproximadamente 10% de los casos son en mujeres menores de 40 años. Solo en México se estiman un total de 33,800 casos nuevos para el año 2025 y un total de 9 100 defunciones en el mismo año (*Cáncer Mañana*, n.d.).

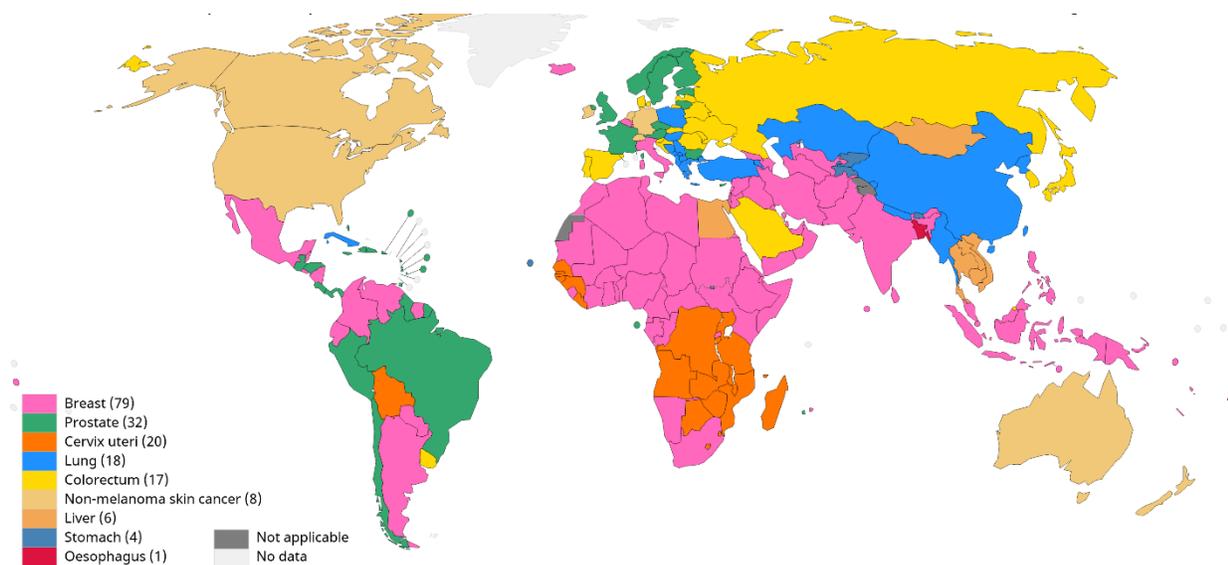


Figura 4. Principales tipos de cáncer por país, ambos sexos, todas las edades.

Rosa: mama, Verde: próstata, Amarillo: colorrectal, Naranja: cérvico uterino, Azul: pulmón y Café: hígado.

Fuente: Ver Referencia (Bray et al., 2021)

Se estima que el 5-10% de los cánceres de mama son hereditarios y se considera que entre el 20-25% de las mutaciones responsables de los cánceres de mama ocurren en los genes supresores de tumores (BRCA 1 y 2). Sin embargo, las causas que generan este tipo de cáncer no son del todo claras, por tal motivo algunos especialistas han identificado algunos factores de riesgo y los han clasificado en dos grupos: riesgos establecidos (no se pueden cambiar) y riesgos emergentes (se pueden cambiar tomando decisiones) (Tabla) (Brandan & Navarro, 2006).

Tabla 1. Factores de riesgo establecidos y emergentes para cáncer de mama  
Fuente: Ver Referencia (*Factores de Riesgo Del Cáncer de Mama*, n.d.)

Riesgo	Factor	Descripción
Establecido	Edad	El riesgo de cáncer de mama aumenta con la edad
	Genética	Mutaciones heredadas en genes como en el BRCA1 y el BRCA2
	Herencia	Antecedentes de familiares directos que presentaron cáncer
Establecido	Raza/origen étnico	Las mujeres blancas son un poco más propensas a desarrollar cáncer de mama que las mujeres afroamericanas, latinas y asiáticas.
	Edad de la menarca	Presentar la menarca antes de los 11 años
	Edad de la menopausia	Presentar la menopausia después de los 54 años
	Anatomía de las mamas	Las mujeres con mamas densas tienen más probabilidades de tener cáncer de mama.
	Recurrencia	Las mujeres que han tenido cáncer de mama tienen mayores probabilidades de tener esta enfermedad por segunda vez.
Emergentes	Sobrepeso	Las mujeres obesas y con sobrepeso tienen un mayor riesgo de recibir un diagnóstico de cáncer de mama.
	Tabaquismo	Fumar causa diversas enfermedades y está vinculado a un mayor riesgo de cáncer de mama
	Consumo de alcohol	Las bebidas alcohólicas, como la cerveza, el vino y el licor aumentan el riesgo de sufrir cáncer de mama.
	Falta de ejercicio	Practicar ejercicio con regularidad a nivel moderado o intenso reduce el riesgo de cáncer de mama.
	Exposición al dietilestilbestrol	Las mujeres que tomaron dietilestilbestrol y las mujeres que fueron expuestas al dietilestilbestrol mientras sus madres estaban embarazadas también pueden tener un riesgo ligeramente mayor de contraer cáncer de mama.

### 2.1.2. Modelos de investigación en cáncer

Debido a la alta incidencia y mortalidad que presenta el cáncer de mama surgió la necesidad de realizar estudios experimentales que ayuden a comprender su comportamiento con la finalidad de generar terapias o medicamentos que permitan atacar esta afección. Sin embargo, es difícil estudiar el comportamiento de esta enfermedad en seres humanos. Por tal motivo se recurre al uso de modelos (Figura 5) que permitan evaluar la eficacia y efectividad de los fármacos sin poner en riesgo la salud de una población.

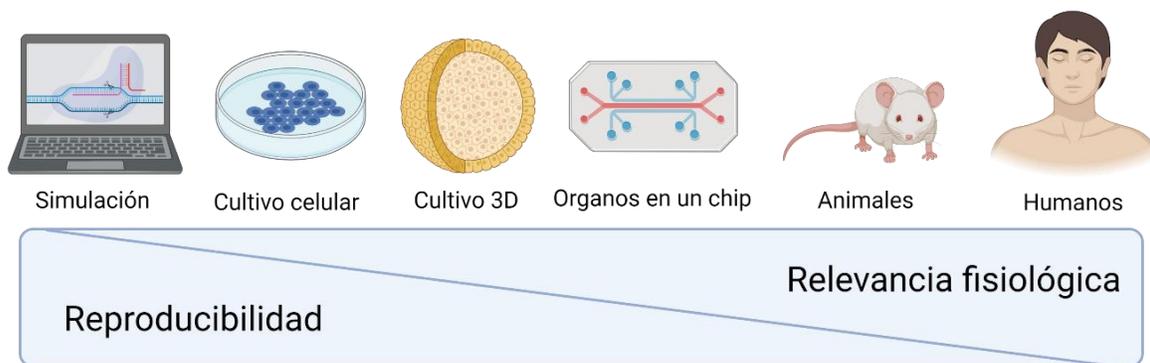


Figura 5. Principales modelos experimentales.  
Organizados según su nivel de relevancia fisiológica  
Adaptada de (Jackson & Lu, 2016)

#### 2.1.2.1. Modelo *in vitro*

El modelo *in vitro* hace referencia a distintos ensayos experimentales que se realizan fuera de un organismo vivo. Estos ensayos se basan en el uso de técnicas que permiten cultivo y mantenimiento celular sin afectar las propiedades fisiológicas, biológicas y genéticas de las células. Permitiendo el estudio de fenómenos como la actividad intracelular, ecología celular, la genómica, proteómica, el flujo intracelular, sus biomoléculas o las interacciones celulares, utilizadas en las áreas de virología, biotecnología, inmunología, farmacología, etc.

Existen 4 tipos diferentes de cultivos como: el cultivo de órganos, los explantes primarios, donde se coloca un extracto del tejido en una interfaz que permite mantener la arquitectura del tejido tal y como se encontraba en el organismo vivo. Los cultivos organotípicos donde se

utilizan diferentes tipos de células que interactúan entre sí con el propósito de producir tejidos funcionales. Por último, podemos encontrar los cultivos celulares primarios que se desarrollan a partir de células que son aisladas de un tejido manteniendo la mayoría de sus características. Sin embargo, este tipo de cultivo se ve limitado por el número de subcultivos que se pueden realizar debido a que mientras mayor número de subcultivos mayor es la posibilidad de que las células alcancen la senescencia. Los cultivos primarios se pueden dividir en dos tipos:

- Cultivos en monocapa donde las células necesitan adherirse a una superficie de soporte.
- Cultivos en suspensión donde las células se encuentran dispersas en el medio de cultivo.

Esta técnica tiene diversas ventajas ya que permiten tener un control sobre el medio ambiente de las células (pH, temperatura, presión osmótica y oxigenación). De igual manera, se pueden obtener y guardar diversas réplicas de cada cultivo gracias a la preservación de muestra por congelación. En cuestiones éticas, estas técnicas permiten refinar condiciones experimentales para reducir el uso de animales. Entre sus desventajas se destacan la facilidad de la pérdida de las características fenotípicas propias del tejido inicial y las estrictas condiciones de asepsia en las que se tienen que trabajar las células para evitar la contaminación.

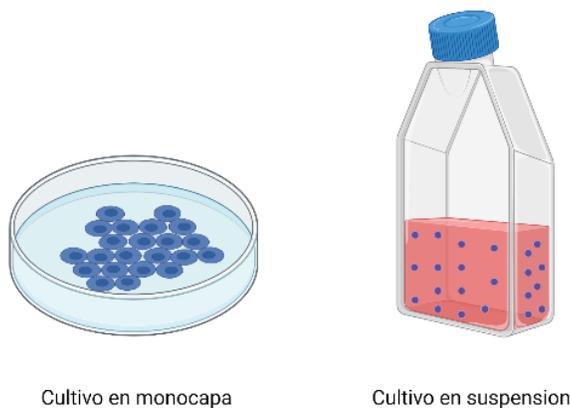


Figura 6 . Tipos de cultivos primarios.



### **2.1.2.2. Modelo *in vivo***

Este modelo hace referencia a la experimentación hecha en organismos vivos, que se pueden dividir en dos tipos: los modelos pre-clínicos (manejo de modelos animales) y los ensayos clínicos, donde una vez comprobado que no existe riesgo para el humano se probará en cientos o miles de personas (según la fase del estudio) el compuesto o técnica en cuestión. Las pruebas con animales tienen un papel fundamental en el avance de la ciencia, ya que han ayudado a comprender y tratar diversas enfermedades humanas como la diabetes, tuberculosis y bronquitis. Al igual que han servido de parteaguas para el desarrollo de medicamentos y vacunas. En cuanto al cáncer esto no es diferente ya que han ayudado en la identificación de carcinógenos, pruebas de agentes preventivos y en el desarrollo de terapias para su tratamiento o su detección.

Si bien existe una gran diversidad de modelos animales como: conejos, cerdos, peces y gatos, que pueden emplearse en la investigación, el modelo murino o de ratón ocupa el primer lugar. En comparación con otros modelos animales, debido al gran número de sus procesos bioquímicos que son similares con el humano; además su reproducción es rápida y se adaptan fácilmente a las condiciones ambientales controladas. Por otro lado, existe una importante cantidad de líneas celulares que, bajo ciertas condiciones en la cual la similitud genética con el animal receptor, permitirán el desarrollo de enfermedades como el cáncer permitiendo con esto el estudio y desarrollo de nuevas terapias. Aunque, ni los ratones, ni las ratas, desarrollan cáncer espontáneamente con alta frecuencia, el desarrollo de esta enfermedad se puede inducir mediante mutaciones (de origen natural, inducidas químicamente y/o manipuladas genéticamente)(Welsh, 2013). Entre los modelos tumorales para ratón podemos encontrar los modelos singénicos donde las células que se implantan tienen el fondo genético tanto en donador como en receptor por lo cual no existe un rechazo en la generación del modelo. Si las células se implantan en el órgano equivalente al organismo donde se originó el cáncer este modelo se denomina ortotópico, de lo contrario, si la implantación de las células tumorales es en un sitio diferente al sitio de origen se denomina ectópico. Gracias al desarrollo de cepas de

ratones inmunodeprimidos se ha podido estudiar el modelo xenoinjerto que permite evaluar el comportamiento de células de cáncer humano para probar la tumorigenicidad y evaluar nuevas terapias (de Jesús-Monge, n.d.).

### **2.1.3. Tratamientos anticancerígenos**

En la actualidad existen diferentes métodos que se utilizan para combatir el cáncer de mama, estos se clasifican en dos tipos, tratamientos locales (tratan el tumor sin afectar al resto del cuerpo) y tratamientos sistémicos (son aquellos donde la terapia alcanza las células malignas en casi cualquier parte del cuerpo). La elección de un tratamiento efectivo se basa en el tipo de neoplasia, su etapa, su tamaño y su grado de diseminación (*Tipos de Tratamiento - Instituto Nacional Del Cáncer, n.d.*).

#### **2.1.3.1. Tratamientos locales**

1. Cirugía: Es un procedimiento por el cual un cirujano extirpa de forma total o parcial el tumor. Existen dos opciones de cirugía en las mujeres con un cáncer de mama localizado:
  - Cirugía conservadora: Se extirpa el tumor con una pequeña cantidad de tejido sano alrededor. Con esta cirugía se conserva la mama, pero en general se debe administrar radioterapia después con objeto de eliminar las células tumorales que pudieran quedar tras la cirugía.
  - Mastectomía: En esta cirugía se extirpa toda la mama. Las pacientes que se someten a una mastectomía pueden reconstruirse la mama mediante cirugía plástica.
2. Radioterapia: En este procedimiento se utilizan partículas u ondas de alta energía, tales como los rayos X, rayos gamma, rayos de electrones o de protones para destruir células tumorales o impedir que crezcan. Existen dos formas de utilizar la radio terapia en el tratamiento de cáncer de mama:

- Tratamiento adyuvante: Se utiliza como un tratamiento secundario, para disminuir el riesgo de que el cáncer reaparezca.
- Tratamiento paliativo: Se utiliza reducir el tamaño del tumor y también es empleado para aliviar algunos síntomas como el dolor que produce a partir de la metástasis.

### **2.1.3.2. Tratamientos sistémicos**

1. Quimioterapia: En este tratamiento se utilizan fármacos que ayudan a parar el crecimiento de las células tumorales matándolas directamente o haciendo que no puedan dividirse, la quimioterapia se indica antes de la cirugía cuando el tumor es demasiado grande y es necesario reducirlo para poder extraerlo, o después de la cirugía con el fin de evitar la recurrencia del cáncer.
2. Hormonoterapia: Es un tratamiento el cual se denomina terapia de bloqueo hormonal, su función es anular las hormonas o bloquear su acción haciendo que se detenga el crecimiento tumoral, generalmente se utiliza para tratar cánceres de mama que son sensibles a las hormonas (RE y RP positivos). Esta terapia puede utilizarse antes o después de la cirugía con el objetivo de disminuir la posibilidad de que el cáncer vuelva a desarrollarse. Si el cáncer ya se ha extendido, la terapia puede reducirlo o controlarlo.
3. Terapias dirigidas: Este tratamiento se basa en el uso de fármacos que identifican y atacan específicamente genes y proteínas de células tumorales sin dañar las células sanas.
4. Inmunoterapia: Es un tratamiento que aprovecha el sistema inmunitario para detectar, frenar el crecimiento o destruir células cancerígenas, este método se basa en el uso de sustancias propias del organismo o creadas en el laboratorio para restaurar el sistema inmune del paciente.

Además de estos tratamientos existen otras terapias alternativas que pueden ayudar a combatir el cáncer como la terapia fototérmica o la TFD.

## 2.2. Terapia fotodinámica

La TFD es un método nacido de la fototerapia que ha demostrado ser efectivo en el tratamiento de diversos padecimientos del tipo oncológico y no oncológico (O'Connor et al., 2009). Se caracteriza por ser una terapia de mínima invasión, poco tóxica y de bajo costo. Su aplicación consiste en el uso de un fármaco con propiedades fotoquímicas denominados FS que al interactuar con luz a una longitud de onda adecuada, absorbe la energía de la luz y pasa a un estado excitado, donde se facilita la interacción con el oxígeno molecular presente en la célula, estimulando la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Figura 7. Elementos principales de la TFD. Figura 7) desencadenando daño irreparable en la célula que posteriormente la lleva a morir (Agostinis et al., 2011; Ferriols Lisart & Pitarch Molina, 2004).

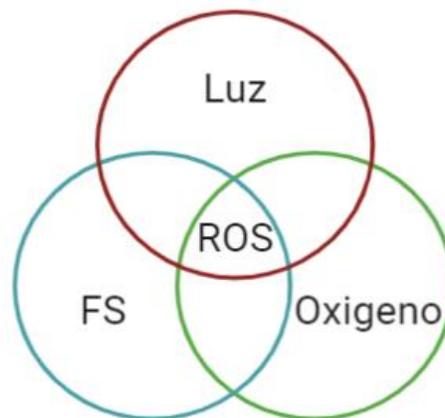


Figura 7. Elementos principales de la TFD.

Esta terapia va ganando importancia dentro de las terapias anticancerígenas debido: a la selectividad hacia las células malignas, las cuales captan y concentran el FS; y a su lenta velocidad de eliminación con respecto de las células sanas. Otras ventajas que ofrece la TFD con respecto a las terapias anticancerígenas convencionales son las siguientes (Capella & Capella, 2003):



- Puede ser aplicada en pacientes que fueron rechazados de la cirugía.
- Se puede utilizar como terapia paliativa.
- Puede ser utilizada como complemento de otros tratamientos.
- Debido a la ausencia de toxicidad acumulada, se puede aplicar de forma repetitiva.
- Es de mínima invasión.
- Es una terapia dirigida que no afecta células sanas.
- Tiene pocos efectos adversos.

Actualmente esta terapia ya ha sido aprobada por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los EE. UU. (FDA) y se encuentra en expansión y consolidación en oncología, dermatología y otras ramas de la medicina.

### **2.2.1. Mecanismo de la TFD**

Como se mencionó en la sección anterior la aplicación de la TFD se basa en la combinación de tres elementos no tóxicos de forma individual (Allevato, 2006). Su aplicación se centra en una serie de pasos (

Figura 8) que inician en la administración del FS por vía sistémica, intratumoral o tópica. Después de esta aplicación, se presenta un tiempo de incubación, donde el FS se concentra en las células cancerígenas y es desechado por las células sanas. Posteriormente se procede a irradiar el área tumoral con luz visible (400 nm – 700 nm), de una determinada longitud de onda que corresponda con la banda de absorción del FS. lo que permite transferir su energía al FS pasando de un estado basal a un estado excitado donde puede perder la energía absorbida por fluorescencia, o se puede generar un cruce Intersistémico, obteniendo un estado más estable donde se puede interactuar con el oxígeno molecular donde se forman ROS, principalmente oxígeno singulete ( $^1O_2$ ), el cual estimula 3 mecanismos antitumorales: la citotoxicidad directa sobre las células tumorales, daño en la vascularización del tumor y estimulación de una respuesta inflamatoria que genera una respuesta inmune (Agostinis et al., 2011).

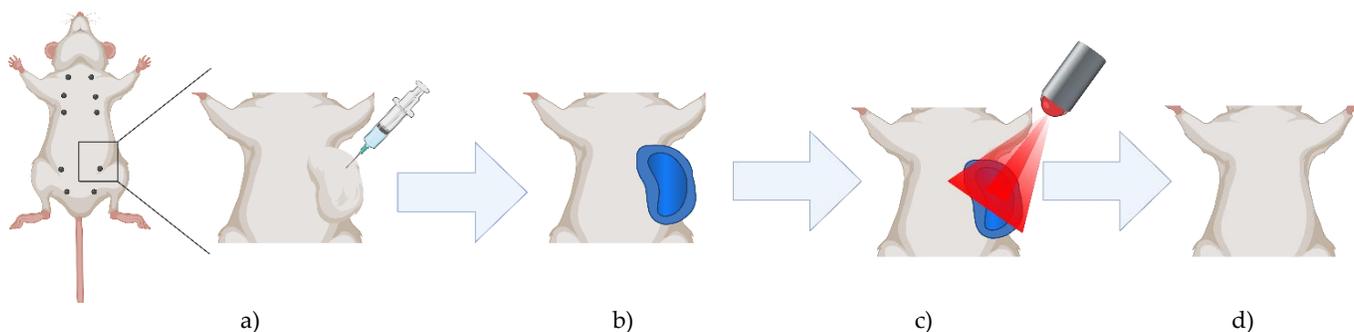


Figura 8. Principios de la TFD.

- a) El FS es suministrado por vía tópica, sistémica o intratumoral, b) Se permite que el FS se difunda y penetre el tejido lo que se conoce como tiempo de incubación, c) Se activa el FS por radiación electromagnética, generando ROS d) El desequilibrio de oxido-reducción genera un daño irreparable en las células, concluyendo con la destrucción del tumor.

Una mejor forma de comprender el proceso de fotosensibilización de la TFD es mediante el diagrama de Jablonski (Figura 9), en este, se observa inicialmente al FS en un estado de reposo, altamente estable denominado estado basal ( $S_0$ ). Cuando a este compuesto se le hace incidir luz a una longitud adecuada según su espectro de absorción. Se genera una transferencia de electrones a un orbital de mayor energía generando un estado electrónicamente excitado llamado singulete ( $S_1$ ), en este estado el FS es extremadamente inestable por lo cual después de un periodo (del orden de nanosegundos) pierde esta energía por medio de la fluorescencia y/o calor. Por otro lado, el FS también puede experimentar la conversión interna generando un estado más estable denominado triplete.

En este estado el FS puede volver al estado basal por medio de la fosforescencia o transfiriendo su energía al oxígeno molecular, generando un proceso fotoquímico tipo I, donde la transferencia de electrones o hidrógenos permiten que el FS interactúe con sustratos biológicos, generando especies citotóxicas como el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o el radical hidroxilo (OH). Estos agentes son altamente reactivos y al encontrarse en una mayor cantidad se generan daños en la célula, haciendo que se activen procesos biológicos intrínsecos, como la apoptosis.

De igual forma se pueden generar un proceso tipo II donde se transfiere la energía del FS a las moléculas cercanas de oxígeno, pasando de su estado más estable conocido como oxígeno triplete ( $^3\text{O}_2$ ), a una forma muy reactiva del oxígeno denominada  $^1\text{O}_2$ . Los dos mecanismos producen fotooxidación de aminoácidos en proteínas, interaccionan con lípidos o ácidos nucleicos, desencadenando un daño irreparable de las macromoléculas celulares conduce a la muerte de las células tumorales a través de un mecanismo apoptótico, necrótico o autofágico, acompañado de la inducción de una reacción inflamatoria local aguda que participa en la eliminación de las células muertas, la restauración de la homeostasis tisular normal y, en ocasiones, en el desarrollo de la inmunidad sistémica (Arias et al., 2007; Robertson et al., 2009; Tardivo et al., 2005). Existe un tercer tipo de reacción que se denomina tipo III, en esta, el FS reacciona directamente con las biomoléculas sin la necesidad del oxígeno. Estas reacciones pueden ocurrir de manera simultánea. Sin embargo, su papel en la citotoxicidad de la célula depende del tipo de FS.

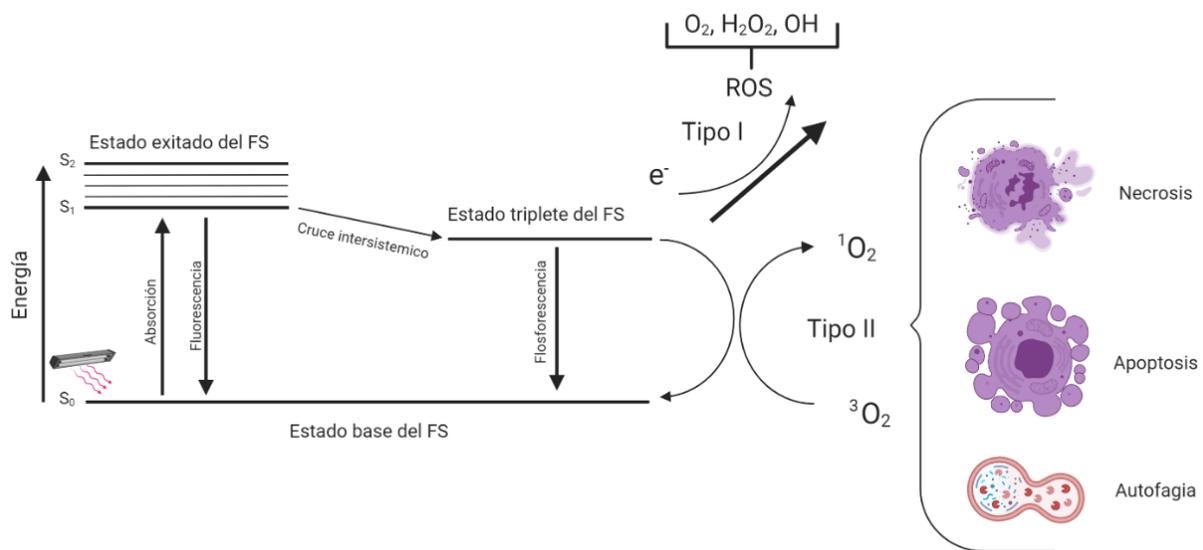


Figura 9. Esquema del mecanismo de acción de la TFD.

### **2.2.2. Oxígeno molecular**

El oxígeno es un elemento no metálico y altamente reactivo, cuando dos átomos de oxígeno se enlazan se forma un tipo de gas denominado dioxígeno que constituye la base de la respiración celular en los organismos aerobios. En la generación del efecto fotodinámico se producen ROS, las cuales tienen un importante papel en la señalización celular. La eficacia de la TFD está relacionada con la capacidad del FS de producir ROS y la cantidad de moléculas de oxígeno que se encuentran en el tejido a tratar (Johansson, 2007; Jori et al., 2006).

### **2.2.3. Fotosensibilizadores**

Los FSs son un grupo de compuestos no tóxicos para el organismo, que tiene la capacidad de absorber y transformar la energía de los fotones, generando reacciones fotoquímicas las cuales inducen la muerte celular (Sharman et al., 1999). Sin embargo, para que esto suceda existen diversas características que los FSs deben cumplir (Allison et al., 2004; Hamblin & Huang, 2013; Mordon et al., 2012):

- El FS debe ser biocompatible.
- Debe presentar una acumulación selectiva en el tejido tumoral.
- Rápida eliminación en tejido sano, con el fin de minimizar la fototoxicidad de la piel.
- Alto rendimiento en la producción de  $^1\text{O}_2$ .
- Su espectro de absorción deberá estar en el rango de 600 a 800 nm.
- No debe ser tóxico en la oscuridad.
- De preferencia sus moléculas deben ser solubles en agua, para facilitar el cruce en membranas celulares.

En la actualidad existen diversos tipos de FSs que se han llegado a utilizar para el tratamiento de afecciones cancerígenas. Estos se clasifican según su estructura química, su pureza o por su orden de aparición histórica (generación), siendo esta última la más utilizada. Dentro de la primera generación encontramos a los FSs derivados de la hematoporfirina, siendo Photofrin el primer FS aprobado para su uso en seres humanos (Daniell & Hill, 1991). Sin embargo, este

fármaco presentó diversas desventajas debido a la fotosensibilización cutánea prolongada o su limitada absorbancia en el rango de emisión de la luz roja. Estas desventajas promovieron el desarrollo de nuevos FS con propiedades fotofísicas y fotoquímicas mejores que las del Photofrin, a estos FS se les denominó de segunda generación. Generalmente, estos FS son compuestos puros, de estructura química conocidas y que presentan máximos de absorción a longitudes de onda superiores a 630 nm con altos coeficientes de extinción molar y rendimientos cuánticos de formación de. Entre los derivados de las porfirinas se destacan meta-tetra (hidroxifenil) porfirina (mTHPP, Foscan o Temoporfin).

Posteriormente aparecieron los FS de la tercera generación se introduce el uso de sistemas de transporte denominadas nanopartículas con la finalidad de aumentar absorción, distribución y selectividad por las células cancerígenas (Allison et al., 2004; Hamblin & Huang, 2013; C. K. Lim et al., 2013). Algunos FS que se han destacado son aquellos que no se derivan de la hematoporfirina son los halogenados xantenos, fenotiazinas y acridinas, debido a que estos presentan una alta absorción en el rango de 600 nm – 800 nm lo que permite llegar tejidos profundos (Aspiroz et al., 2017; A. F. dos Santos et al., 2017b; Pérez Laguna, 2019).

### 2.2.3.1. Azul de metileno

El AM también conocido como cloruro de metiltionina es un colorante natural perteneciente a la familia de las fenotiazinas (Figura 10). Este compuesto químico utilizado en la industria como colorante de ropa, en medicina es utilizado principalmente para el tratamiento de la metahemoglobinemia. Sin embargo, tiene otros usos como colorante histológico y antiséptico tópico (Clifton & Leikin, 2003; Pires et al., 2016).

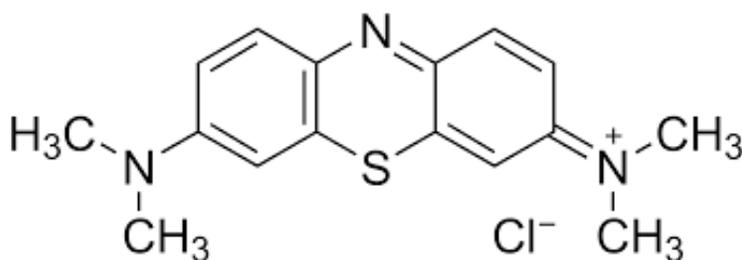


Figura 10. Estructura química del AM.



Particularmente, el AM es empleado en TFD debido a que exhibe una fototoxicidad profunda, no presenta toxicidad en oscuridad, tiene una fuerte absorbancia en el rango de 550 – 700 nm, presentando un pico máximo de absorción en 664 nm en soluciones acuosas. Sin embargo, en soluciones concentradas, la fuerza iónica se ve aumentada lo que favorece la dimerización, esto desplaza el pico de absorción a 590 nm (Figura 11), lo que conlleva a la disminución de la respuesta terapéutica al utilizar fuente de luz con espectros de emisión de 600 – 630 nm. Otra característica del AM es su alto rendimiento cuántico en la generación de  $^1\text{O}_2$  ya que presenta 0.50  $\phi$  en alcoholes y 0.47  $\phi$  en soluciones acuosas. En otras palabras, el 47 o 50% de los fotones absorbidos en el proceso de la TFD generan  $^1\text{O}_2$  (Nyokong & Ahsen, 2012; Tardivo et al., 2005).

Algunos estudios realizados para evaluar este FS en TFD han permitido observar que el AM estimula la fototoxicidad por procesos tipo I y tipo II. La selección de la vía depende directamente de la concentración de dímeros que contenga la solución del FS. De igual forma se ha encontrado que el AM se une a interfaces cargadas negativamente como las membranas citoplasmáticas, la membrana mitocondrial, los ácidos nucleicos y los polisacáridos provocando la muerte celular por apoptosis en lugar de generar lisis celular (Blass & Fung, 1976; Orth et al., 2000).

En la actualidad aún se desconoce la razón por la cual este FS se acumulan en concentraciones significativamente más altas en las células cancerosas que en las células normales. Sin embargo, la razón de tal biodistribución puede ser la por la capacidad del AM de adherirse a lipoproteínas de baja densidad (LDL) gracias a su estructura. El papel de las LDL es suministrar a los tejidos el colesterol necesario para crear membranas durante la división celular (Kwiatkowski et al, 2018).

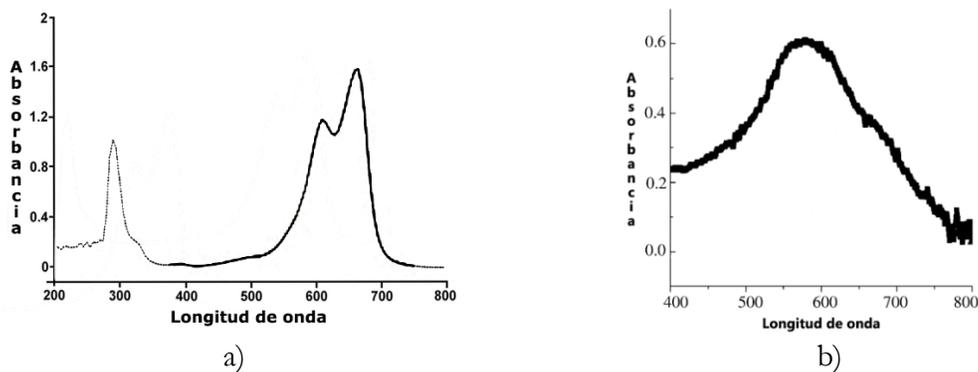


Figura 11. Espectro de absorción del AM.

a) Espectro de absorción de AM en soluciones acuosas, b) Espectro de absorción de AM con formación de dímeros en tejido tumoral.

Modificado de (Giannelli & Bani, 2018; Tardivo et al., 2005)

La dosis recomendada para la administración de este fármaco en seres vivos es de 1 - 2 mg/kg (AP et al., 2018; Obstoy et al., 2016a). La administración se realiza por vía intravenosa o intratumoral durante un periodo de 5 a 10 minutos (Fda & Cder, n.d.). Una vez administrado el fármaco se presenta un tiempo de semivida de 5 o 6.5 h con un tiempo máximo de 24 h, posteriormente es eliminado por la orina y/o heces fecales; haciendo que presenten una coloración azul. Este no es un fármaco que presente altos riesgos a la salud. Sin embargo, en dosis mayores a 4 mg/kg se puede presentar intoxicación por anilina o dapsona, anemia hemolítica o descamación cutánea en infantes. En dosis de 7 mg/kg se pueden presentar náuseas, vómitos, dolor abdominal, dolor de pecho, fiebre o hemólisis. En dosis de 20 a 80 mg/kg se puede presentar hipotensión y coloración azulada de la piel similar a la cianosis (Blass & Fung, 1976; Disanto & Wagner, 1972; Peter et al., 2000).

En la actualidad el AM se está utilizando como FS para el tratamiento de enfermedades no cancerígenas como el acné vulgar, úlceras cutáneas, leishmaniasis cutánea entre otras. Para el tratamiento de enfermedades cancerígenas se ha aprobado el uso de AM en el tratamiento de melanomas (Tardivo et al., 2005). Sin embargo, continúan los estudios *in vivo* e *in vitro* para verificar su eficacia en el tratamiento de diversas afecciones del tipo oncológicas (Tabla 2).

Tabla 2. Estudios del AM en TFD.

Referencia	Tipo de lesión	Tipo de estudio	Dosis AM	Resultado
(A. F. dos Santos et al., 2017a)	Cáncer de mama (MDA MCF-10A, MCF-7, MDA-MB-231)	<i>in vitro</i>	2- 20 $\mu$ M	La TFD presentó una citotoxicidad mayor al 90% en las líneas celulares tumorigénicas.
(E. J. Lim et al., 2013)	Adenocarcinoma de pulmón humano (A549)	<i>in vitro</i>	0.1 - 2 $\mu$ g/ml	Se presentó una citotoxicidad del 70% al irradiarse con 60 J/cm <sup>2</sup> .
(Chen et al., 2008)	Melanoma (B16 F1)	<i>in vitro</i>	0 a 20 $\mu$ M	La TFD generó una citotoxicidad del 54.7% con dosis de 20 $\mu$ M
	Melanoma en ratones C57BL6	<i>in vivo</i>	50 mg/kg	Se presentó la reducción del 69.6% en el tamaño del tumor y alargo vida del ratón 21 días más, respecto al grupo control.
(Orth et al., 1995)	Adenocarcinoma G-3 Xenotransplantados	<i>in vivo</i>	----	MB al 1% generó destrucción completa en el 79 % del volumen tumoral en los ratones tratados.
(Wagner et al., 2012)	Melanoma maligno	<i>in vivo</i>	2 mg/kg	Se presentó una reducción del 94% en el volumen tumoral a los 10 días de aplicar el tratamiento con TFD.

#### 2.2.4. Fuentes de luz

Como ya se ha mencionado con anterioridad, la luz tiene un papel fundamental en la respuesta terapéutica de la TFD debido a que esta tiene la importante función de excitar al FS. Por tal motivo se podría suponer que el tipo de luz a utilizar depende únicamente de FS. Sin embargo, existen diversos factores que se deben tomar en cuenta a la hora de aplicarlo en modelos *in vivo*. En la actualidad existen diversos dispositivos que se pueden utilizar en la aplicación de la TFD. Estos dispositivos se han clasificado según el tipo de irradiación que se emite (Figura 12) (Allevato, 2006):

- Incoherente: cuando las ondas electromagnéticas no tienen una relación en su fase y se generan interferencias.
- Coherente: cuando las ondas lumínicas conservan una relación de fase constante tanto en tiempo como en espacio.

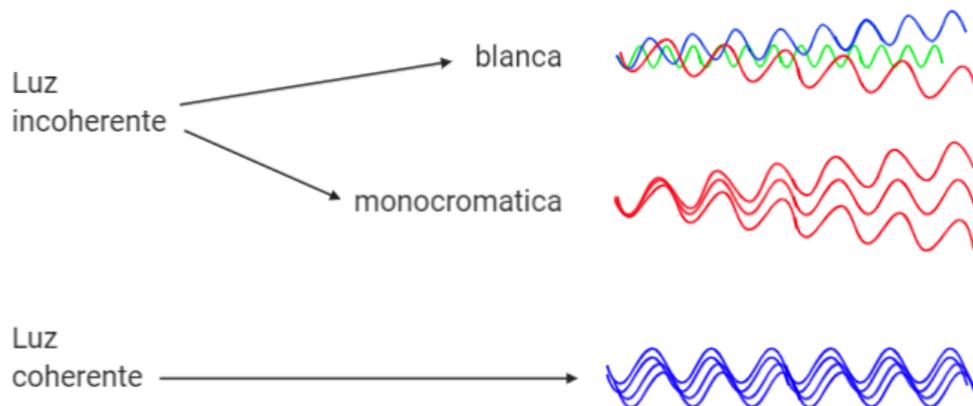


Figura 12. Representación de las emisiones de ondas en los diferentes tipos de luz.

Históricamente las primeras fuentes utilizadas en TFD fueron del tipo incoherente, principalmente se empleaban lámparas de tungsteno, xenón y halógeno (Figura 13a). Estas fuentes de luz contaban con un diámetro de emisión de al menos 5 cm que era perfecto para irradiar afecciones de gran tamaño, con el uso de filtros de colores se podían utilizar para activar diferentes FSs, lamentablemente estos dispositivos no permitían alcanzar afecciones internas lo cual restringió su uso a afecciones superficiales (Brancaleon & Moseley, 2002; Calzavara-Pinton, 2001).

Por tal motivo el desarrollo del láser fue de gran importancia para la terapia, debido a que este tipo de fuentes mejoró la eficacia de la excitación del FS. Al ser fuentes con una gran potencia óptica y que permitieron el acoplamiento a fibra óptica con el fin de alcanzar tejidos que eran imposibles de alcanzar con las fuentes incoherentes (Kim & Darafsheh, 2020a). Sin embargo, los problemas que presentaron estas fuentes fue su gran tamaño y el requerimiento de soporte técnico especializado, lo que implicaba un alto costo (Figura 13b). Con la finalidad de atacar estas desventajas se empezó a remplazar las fuentes laser por la tecnología de diodo láser, debido a que estos dispositivos demostraron ser más eficaces al acoplarse a fibra óptica (Figura 13c) manteniendo su alta potencia de salida, con la característica de ser de un tamaño mucho menor y siendo económicos en comparación con los láseres tradicionales (Boucher, 2011b).

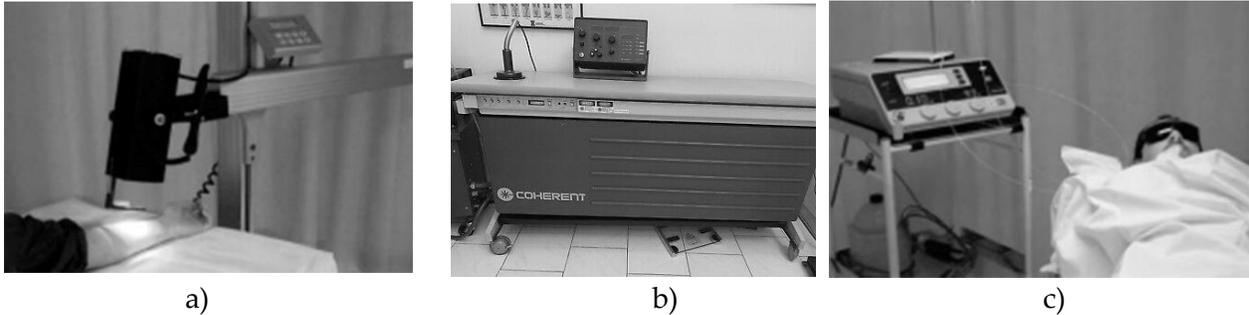


Figura 13. Ejemplos de fuentes de luz utilizadas en TFD  
a) Lámpara de filamento de tungsteno b) Láser c) Diodo láser  
Fuente: Ver Referencia (Boucher, 2011b; Brancaléon & Moseley, 2002)

Debido al gran número de fuentes de luz que se encuentran disponibles, es necesario analizar cada una de ellas con el fin de obtener una mayor respuesta terapéutica de la TFD. Entre las consideraciones a tomar se encuentran (Chen et al., 2008; Mordon et al., 2012):

- El espectro de emisión de la fuente debe empatar con el espectro de absorción del FS.
- Proporcionar la suficiente potencia lumínica (factor que depende del tipo de lesión, tejido y medio del método de irradiación) que permita irradiar al tejido con eficiencia, evitando altos tiempos de exposición y/o produciendo mínimos o nulos efectos secundarios.

Otra característica importante para tomar en cuenta es la forma de suministrar la luz. Esta puede ser de forma superficial donde la irradiación se mantiene fuera del cuerpo, aplicada en lesiones superficiales como el acné, o intersticial donde se recurre al uso de fibras ópticas que permiten llevar la luz a tejidos profundos (Wilson & Patterson, 2008).

#### **2.2.4.1. Fuentes LED**

Los LEDs son otra tecnología igualmente utilizada en la aplicación de la TFD. Estos son dispositivos semiconductores que emiten luz como resultado de la recombinación de huecos y electrones al aplicarse una tensión adecuada en sus terminales. Su luz es incoherente con un ancho espectral amplio y una gran divergencia del haz. Existen una diversidad de LEDs que proporcionan emisiones desde el ultravioleta (350 nm) hasta el infrarrojo cercano (1100 nm) con anchos de banda de 5 a 10 nm, otras características importantes que han contribuido al

uso de los LEDs en la TFD son el precio, la versatilidad y su bajo consumo eléctrico. Gracias a estas características se han logrado desarrollar prototipos especializados para el tratamiento de lesiones superficiales o en regiones con poco o ningún acceso (Figura 14). Estos dispositivos podrían reemplazar a los diodos laser debido a que en la actualidad existen LED's de alta potencia que se pueden utilizar en conjunto con fibras ópticas (Brancaleon & Moseley, 2002; Kim & Darafsheh, 2020b; Wang & Dai, 2017).

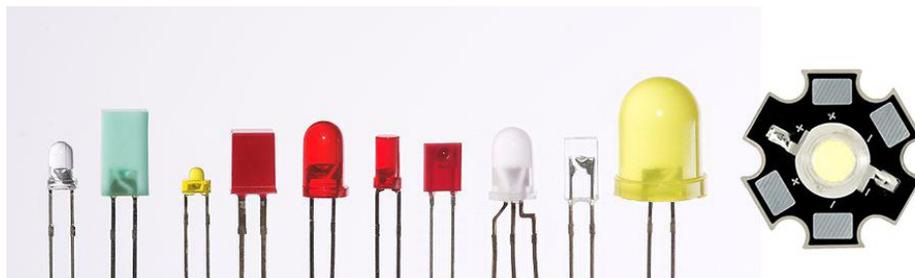


Figura 14. Tipos de LED's comerciales

#### 2.2.4.2. Interacción de la luz con el tejido

La respuesta terapéutica de la TFD depende en gran medida de la longitud de onda con la que se va a tratar, ya que, si bien se puede utilizar cualquier longitud de onda dentro del espectro visible, se debe considerar que en el organismo hay cromóforos como la hemoglobina y el agua que absorben longitudes de onda menores a 600 nm o longitudes superiores a 1200 nm respectivamente. Por dicha razón cuando se pretende tratar afecciones que se encuentran a nivel de la dermis o la hipodermis, se observa que la longitud más utilizada es de 600 – 700 nm. Debido a que esta longitud de onda puede penetrar hasta la zona de la dermis y se evita la absorción de la luz por el agua o la hemoglobina (Figura 15a, b)(Corral, n.d.). También es importante recordar que cuando la luz interactúa con los tejidos, esta puede reflejarse debido a los distintos índices de refracción que existe en el tejido y el aire, el tipo de reflexión que predomina es la reflexión difusa donde la luz incidente es reflejada en muchos ángulos, causando una pérdida de aproximadamente 4 – 7%. La luz restante se transmite en las capas con mayor profundidad de la piel donde pueden ser dispersadas por biomoléculas o absorbidas por el FS (Figura 15c)(Sellera et al., 2016).

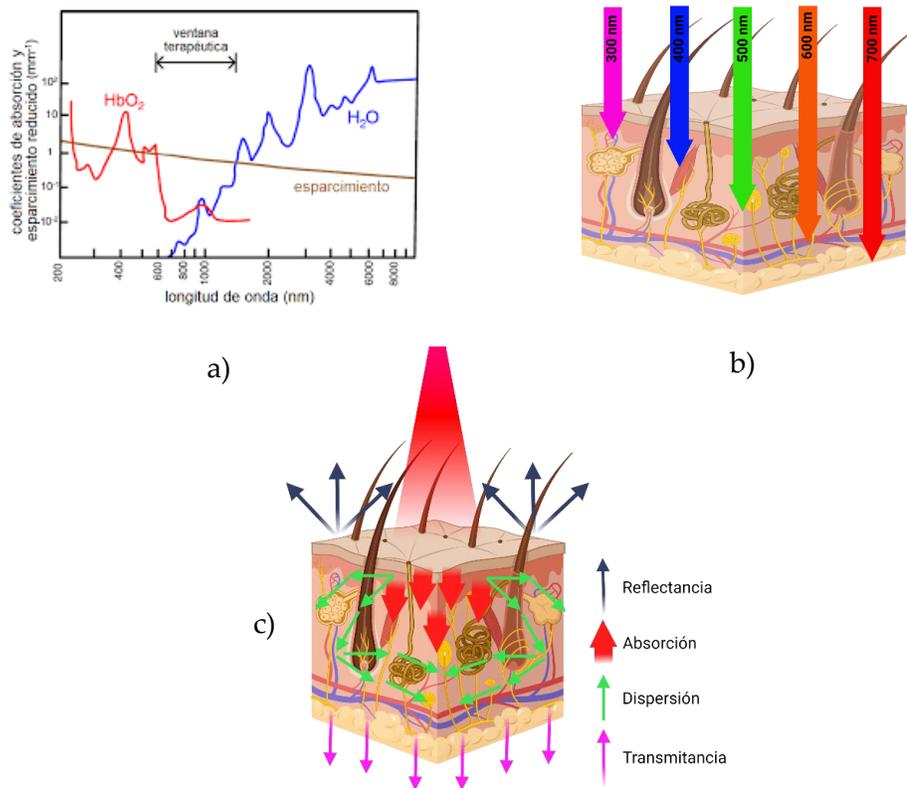


Figura 15. Interacción de la luz con el tejido biológico.

- a) Espectros de absorción de los cromóforos en el organismo b) Nivel de penetración de la luz según su espectro de absorción c) Diversas interacciones de la luz en el tejido.

## **2.9. Estándares y normas para el desarrollo de dispositivos**

Un dispositivo es un elemento que se ha desarrollado para realizar una función específica en el área de medicina, se considera como un dispositivo desde elementos simples como el algodón hasta sistemas tan desarrollados como robots utilizados en cirugía. Cada una de estas herramientas tiene un riesgo que se puede generar al momento de su uso, por tal motivo se deben considerar normas y estándares que garanticen la seguridad y calidad de estos.

Internacionalmente existen estándares y normas que son aceptadas en varias áreas desde la ingeniería hasta las ciencias de la salud. Sin embargo, existen normas específicas, como la ISO 13485:2003 que menciona los aspectos más relevantes en sistemas de calidad para el diseño y fabricación de dispositivos médicos. También se pueden encontrar estándares como la IEC 60601 donde se involucra el manejo de corrientes eléctricas en dispositivos médicos o la ISO 14971:2012 que recomienda el desarrollo de un sistema de gestión de riesgos.

En México la institución encargada de regular estas normas es la COFEPRIS, ya que tiene la misión de proteger a la población contra riesgos a la salud. Esta institución aún no ha expedido algún documento oficial sobre las normas que debe tener un sistema de iluminación para la TFD. Sin embargo, si existe un documento que regula las unidades de fototerapia utilizadas en recién nacidos, el cual fue desarrollado por el Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud. De este documento podemos destacar la clasificación que ocupará el dispositivo desarrollado en esta tesis, así como algunas normas que aplican en este. En nuestro caso este dispositivo se considera como un dispositivo médico invasivo de tipo quirúrgico para uso pasajero. Debido a que es utilizado solo o en combinación con otros dispositivos médicos que generalmente, se introducen al organismo o están en contacto con el paciente, permaneciendo menos de 60 minutos y están destinados al tratamiento y alivio de una enfermedad (Olvera, n.d.). La Tabla 3 muestra algunas de las principales normas que tienen relación con las fuentes de luz utilizadas en la TFD, estas son expedidas por organismos como International Electrotechnical Commission (IEC), American National Standards Institute (ANSI), Association for the Advancement of Medical Instrumentation y la Secretaría de Salud.

Tabla 3. Normas para dispositivos médicos.  
Fuente: Ver Referencia (Olvera, n.d.).

Nombre de la norma	Expedida por	Año	Carácter	
			Nacional	Internacional
IEC 60601-1-1 Ed. 2.0 b: 2000 Medical electrical equipment - Part 1-1: General requirements for safety - Collateral standard: Safety requirements for medical electrical systems.	IEC	2000		X
IEC 60601-1 Ed. 3.0 b: 2005 Medical electrical equipment - Part 1: General requirements for basic safety and essential performance.	IEC	2005		X
IEC 60601-2-50 Ed. 2.0 b Corr.1: 2010 Corrigendum 1- Medical electrical equipment - Part 2-50: Particular requirements for the basic safety and essential performance of infant phototherapy equipment.	IEC	2010		X
ANSI/AAMI ES60601-1:2005 (IEC 60601-1:2005, MOD) Medical electrical equipment, Part 1: General requirements for basic safety and essential performance, includes amendment (2010).	ANSI/AAMI	2005		X
NOM-197-SSA1-2000. Establece los requisitos mínimos de infraestructura y equipamiento de hospitales y consultorios de atención médica especializada.	SSA	2000	X	
ISO 14971:2007. Medical devices.- Application of risk management to medical devices.	ISO	2010		X
NOM-137-SSA1-2008. Etiquetado de dispositivos médicos.	SSA	2008	X	

# Capítulo 3

Diseño y  
desarrollo del  
dispositivo

En este capítulo se presenta el diseño y el proceso de fabricación tanto del circuito del sistema de irradiación como de su estructura. De la misma forma se describe cada pantalla que conforma la interfaz gráfica de usuario y se describe la caracterización del LED empleado.

## Introducción

Dados los resultados prometedores que ha tenido la TFD en el tratamiento del cáncer, no resulta extraño pensar en la mejora continua de los dispositivos utilizados en esta terapia aumentando su funcionalidad y su precisión. En el presente trabajo se muestra el diseño y desarrollo de un sistema de irradiación basado en tecnología LED para la aplicación de la TFD (Figura 16). Este sistema permite llevar la luz al tejido de manera superficial o intersticial, con el fin de no solo irradiar neoplasias superficiales, sino llegar a las neoplasias donde la luz no puede llegar por sí sola. Este sistema se centra en la aplicación de la TFD-AM, por lo que, tomando en cuenta el espectro de absorción del AM (Figura 11) se utilizó un LED de alta potencia con una longitud de onda de  $650\text{ nm}$  a  $670\text{ nm}$ , un conjunto de fibras ópticas de plástico y un software que permite calcular el tiempo de irradiación de la terapia a partir de la dosis de luz que se desea suministrar.

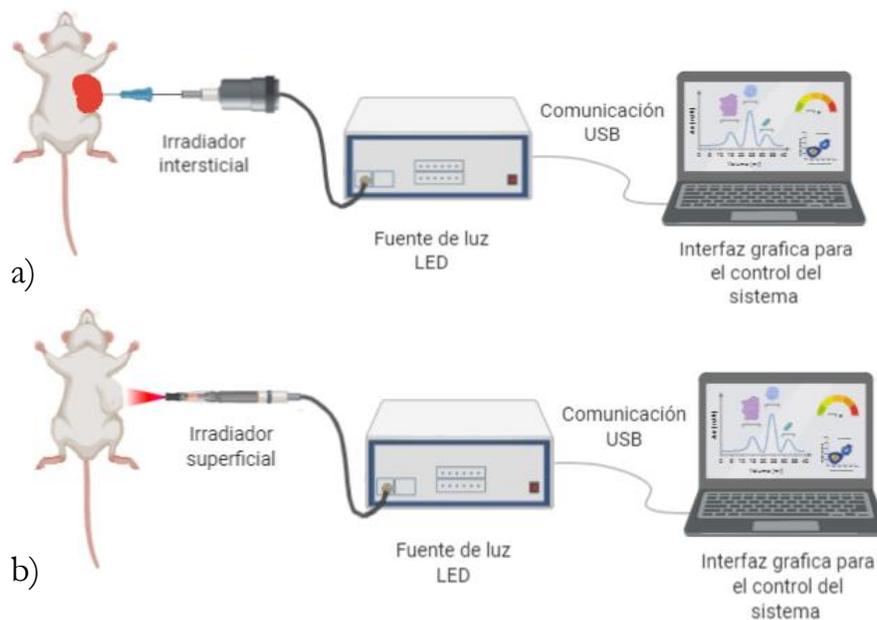


Figura 16. Esquema del sistema de irradiación para la TFD.  
(a) Sistema con irradiador intersticial. (b) Sistema con irradiador superficial.

### **3.1. Consideraciones previas**

Para la construcción del sistema es necesario considerar diversos parámetros que se ven involucrados en la efectividad y seguridad de la TFD como son:

- I. Longitud de onda: Esta depende completamente del espectro de absorción del agente FS a utilizar en la terapia.
- II. Intensidad de radiación: Esta es regulada por controles de intensidad de luz y por la distancia entre la fuente de luz y el paciente.
- III. Superficie corporal expuesta a la terapia: Este factor depende del tamaño y la profundidad de la zona a irradiar, también es importante para determinar la efectividad de la terapia y permite comparar la eficiencia y la efectividad de las diferentes formas de llevar la luz al tejido.
- IV. Tiempo de exposición a la luz: El tiempo de una sesión depende de la potencia de la fuente de luz y el área de la zona a irradiar.

Es importante considerar que, si el tejido es irradiado con una densidad de energía muy baja, pocas moléculas del FS podrán pasar a un estado excitado, lo que reduce la formación de ROS, haciendo que la respuesta terapéutica de la TFD no sea efectiva. De otra forma, en el caso de densidades muy altas o se irradia por demasiado tiempo, se pueden llegar a producir efectos de hipertermia, eritemas, quemaduras u otras lesiones de piel (Wyld et al., 2001).

#### **3.1.1. Descripción del LED**

Como se mencionó en la sección 2.2.3.1 el FS AM tiene un espectro de emisión que va desde 550 – 700 nm, presentando un pico máximo de absorción en 664 nm. Por tal motivo se planteó el uso del LED Rebel LXM3-PD01 cuyo espectro de emisión está entre los 650 – 670 nm. Lo que permite empatar el espectro máximo de emisión y absorción lo cual puede generar una mejor respuesta terapéutica. Su potencia de emisión depende de su voltaje de alimentación, cuando se suministran 2.1 V con 350 mA la potencia ronda en 360 mW y cuando se suministran 2.8 V con 700 mA la potencia ronda en 684 mW. Este LED cuenta con una base

disipadora que proporciona una estabilidad térmica ante los cambios de temperatura generados por su funcionamiento, haciendo que este LED opere a temperaturas de -40 hasta 120°C (Figura 17). Sin embargo, es necesario utilizar un disipador para evitar que la temperatura afecte la potencia o el espectro de emisión.

El uso de una lente concentradora permitió aumentar la potencia de emisión debido a que la lente tiene la capacidad de refractar la luz hacia un solo punto lo cual aumenta la posibilidad de acoplar el haz de luz a fibras ópticas.

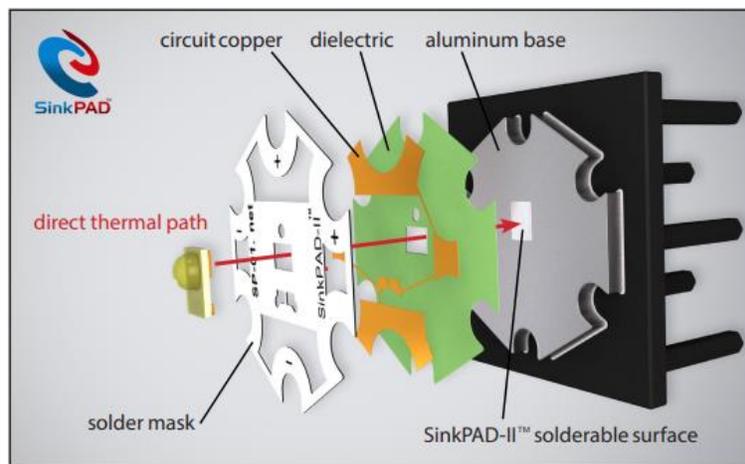


Figura 17. Esquema interno del diodo emisor de luz.

### **3.2. Diseño eléctrico del sistema**

La Figura 18 muestra un esquema del circuito, el diagrama completo se encuentra en la sección de anexos B (figura 65). Este circuito se puede dividir en 3 etapas, la etapa de potencia utiliza una fuente conmutada de 12 V como alimentación principal que se utiliza para alimentar el controlador del LED y el ventilador, posteriormente se genera una alimentación de 5 V que sirve como una señal de control para la etapa de seguridad donde se ha conectado un paro de emergencia que interrumpe de manera inmediata la operación del LED. Por último, tenemos la etapa de control que utiliza un microcontrolador atmega32p (Arduino nano) que se encarga del control del dispositivo. Es importante remarcar que entre las fuentes de alimentación no existe alguna conexión eléctrica para prevenir daños al puerto USB de la

computadora. A continuación, se describen los circuitos secundarios más importantes que componen este diagrama general.

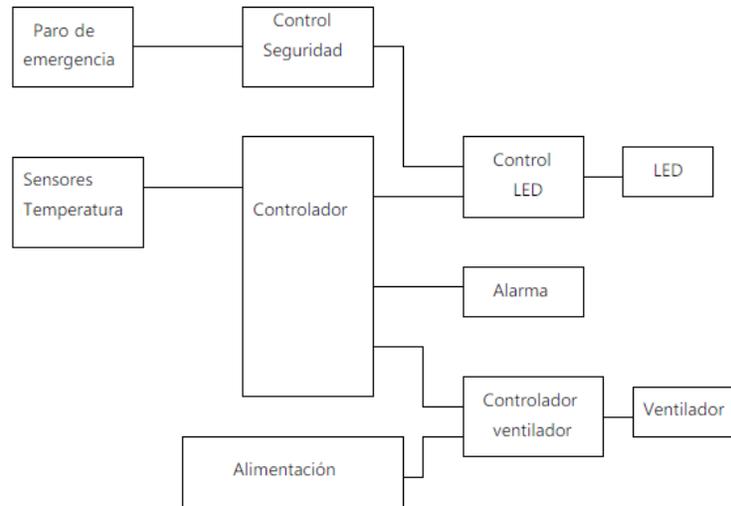


Figura 18. Esquema del circuito realizado para el control de la fuente de iluminación.

### 3.2.1. Circuito control del LED

Con la intención de suministrar la corriente requerida en el LED para tener una potencia óptica que permita alcanzar la respuesta terapéutica, se optó por utilizar el controlador BuckPuck 3023-DE-700 que es un regulador de corriente continua, este controlador permite variar el amperaje suministrado al LED de 0 mA hasta 700 mA. Para esto se pueden utilizar diversas configuraciones. Sin embargo, debido a nuestras necesidades se utilizó la configuración digital con el uso de microcontroladores (Figura 19), cuyo uso disminuye el número de componentes a utilizar y brinda una gran flexibilidad en la programación.

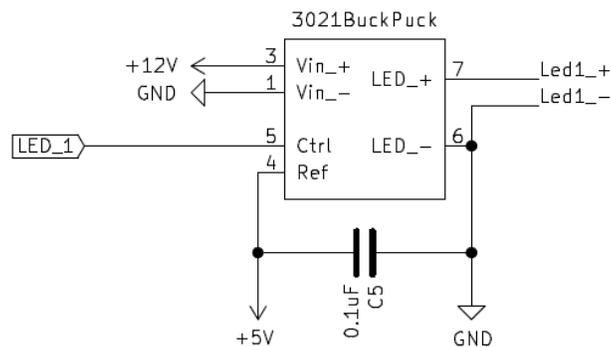


Figura 19. Configuración del controlador BuckPuck 3023-DE-700 para el uso con microcontroladores.

En esta configuración el microcontrolador no solo permite el encendido y apagado del LED de forma automática, sino que también se puede emplear un control de intensidad mediante la técnica de modulación por ancho de pulso (PWM). Esta técnica convierte una señal digital en analógica mediante la variación del tiempo de encendido y apagado (Figura 20).

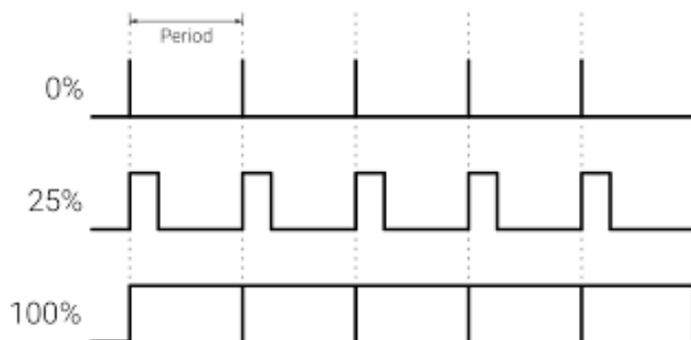


Figura 20. Ejemplo de una señal de salida de PWM.

### 3.2.2. Circuito control de seguridad

Este pequeño circuito se desarrolló como una medida preventiva en caso de que exista algún error a la hora de utilizar la fuente de luz. Como por ejemplo si el ratón se llega a mover, la computadora no respondiera o el sistema no se apague al terminar el tiempo de irradiación, por estos motivos se empleó un método de apagado de emergencia que no pone en riesgo la integridad del dispositivo, ya que este afecta únicamente al LED.

El circuito de control de seguridad (Figura 21) se compone de un transistor en configuración de emisor común que funciona como un interruptor, al recibir la señal del paro de emergencia el transistor entra en saturación y activa un dispositivo electromecánico que utiliza un electroimán para cambiar los estados de un contacto pasando de una posición abierta, apagando el LED de manera inmediata. Este tipo de arreglos es muy utilizado en sistemas industriales ya que evita situaciones que pongan en riesgo la seguridad del usuario o del sistema.

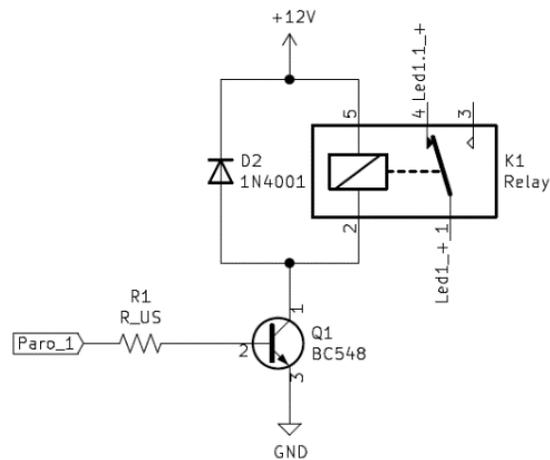


Figura 21. Circuito de seguridad.

A partir del diagrama general se desarrolló un soporte físico que nos permite instalar diferentes componentes eléctricos de manera permanente sin el riesgo de que se desconecten por movimiento, a este tipo de soportes se les denomina circuitos impresos. El diseño del circuito impreso se generó mediante el software Kicad (Figura 22) en donde se planteó el uso de una placa doble cara para reducir el tamaño de la placa, el diagrama de conexiones se encuentra en la sección de anexos b (Figura 66).

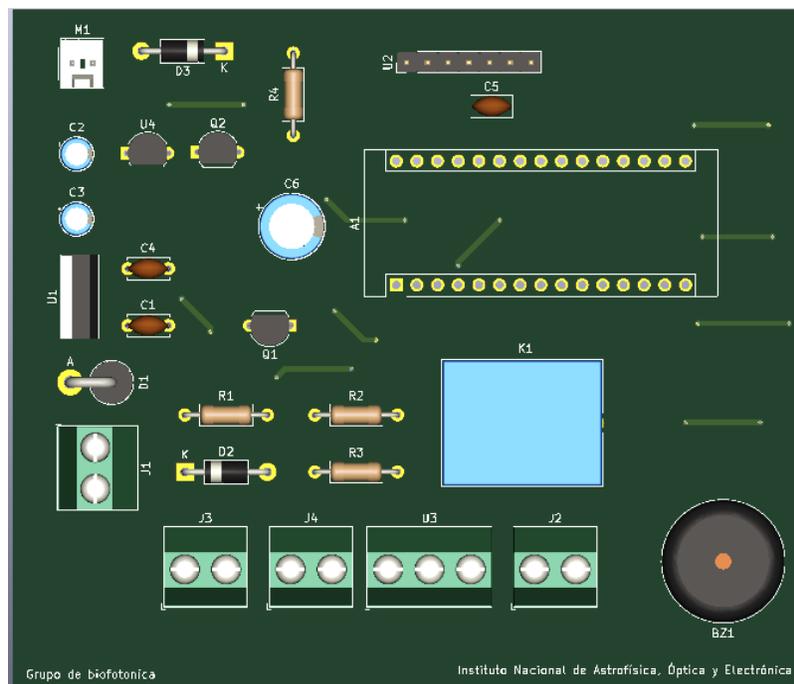


Figura 22. Circuito impreso diseñado en Kicad.

### 3.3. Desarrollo del circuito impreso

Existen diferentes métodos para realizar un circuito impreso, uno de los más utilizados en la actualidad es mediante maquinas CNC que desbastan una placa fenólica dejando un patrón que une dos o más componentes. Para esto es necesario generar archivos Gerber que contienen la información necesaria para poder realizar un circuito impreso con máquinas CAD CAM. Estos archivos se generan a partir de un diseño previo en softwares como Kicad. Posteriormente se abrieron estos archivos en el software BoardMaster Protomat donde se configuraron los puntos de inicio del desbaste y los tipos de herramientas a utilizar (fresa .22 mm, brocas .6, .8, 1, 1.1, 1.3 mm, router para corte de 2.2 mm).

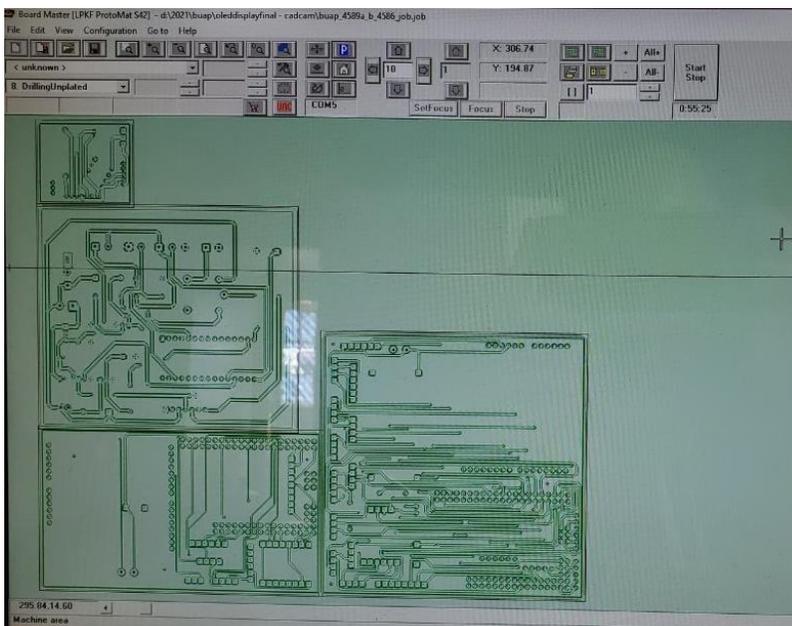


Figura 23. Software y hardware utilizados en el desbaste del circuito impreso.

Inicialmente se lavó la placa por los dos lados con jabón desengrasante y una esponja no abrasiva, posteriormente se secó con un trapo de microfibra. Una vez que la placa estuvo libre de grasa, polvo y agua se fijó en la maquina Protomat S42 y se inició el desbaste de la cara inferior, al terminar se realizó la cara superior.

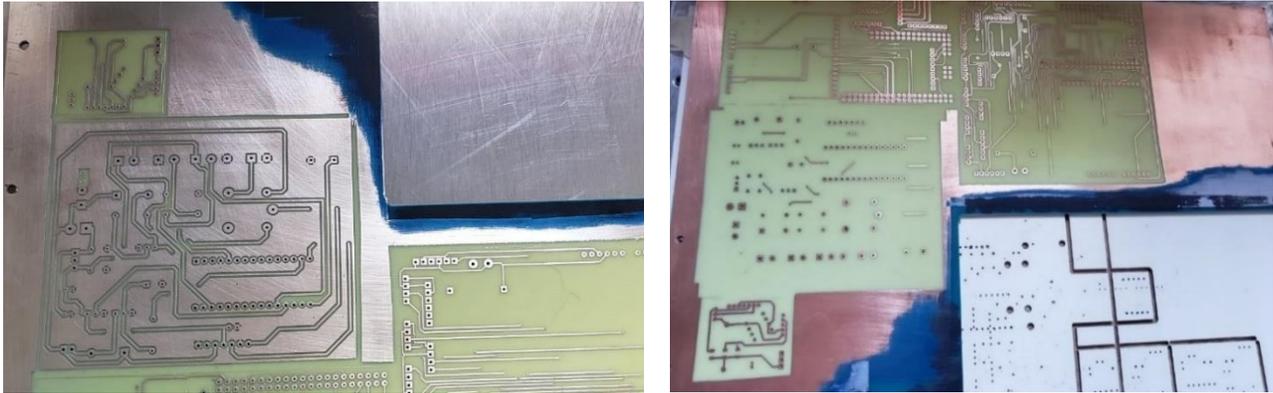


Figura 24. Cara superior e inferior del circuito impreso.

Una vez finalizado el desbaste se aplicó un revestimiento químico con plata, el cual refuerza los pads del circuito impreso con una delgada capa de plata. Permitiendo así conectar la cara inferior con la superior, además de darle una mayor resistencia al circuito.

Posteriormente se aplicó la mascarilla antisoldante con el objetivo de proteger las pistas de la corrosión o humedad y darle un acabado elegante al circuito. Para esto se realizó una mezcla entre la pintura fotosensible y un endurecedor. Se aplicó con un rodillo de goma para evitar la formación de grumos y se colocó la impresión en offset positivo del archivo soldermask bottom obtenido de los archivos Gerber del diseño, se dejó secar en un horno con luz UV por 20 min a 80°C, este proceso también se realizó en la cara superior.

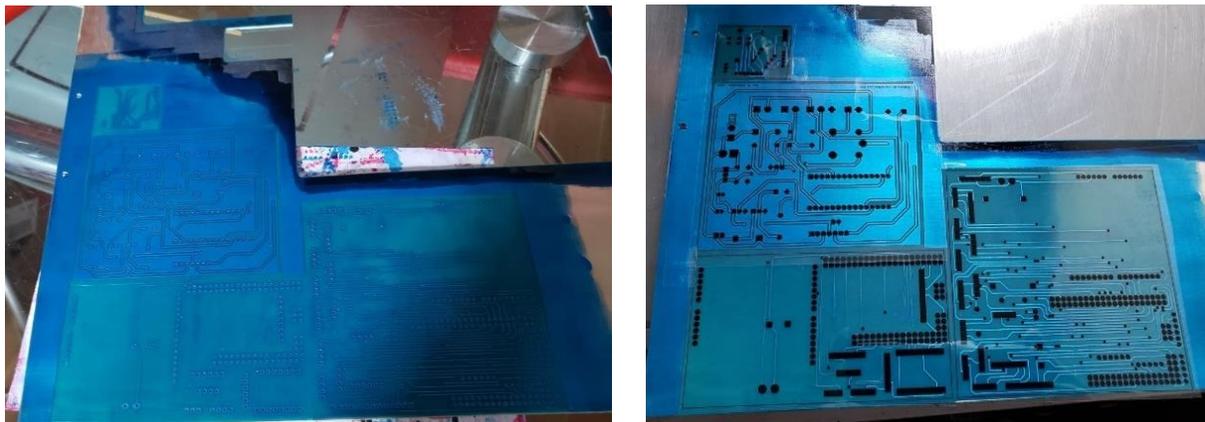


Figura 25. Aplicación de mascarilla antisoldante.

Para eliminar los excesos de pintura en la placa y obtener un color uniforme se realizaron dos lavados con una solución de agua y carbonato de potasio, se enjuagó con agua destilada y se dejó secar.

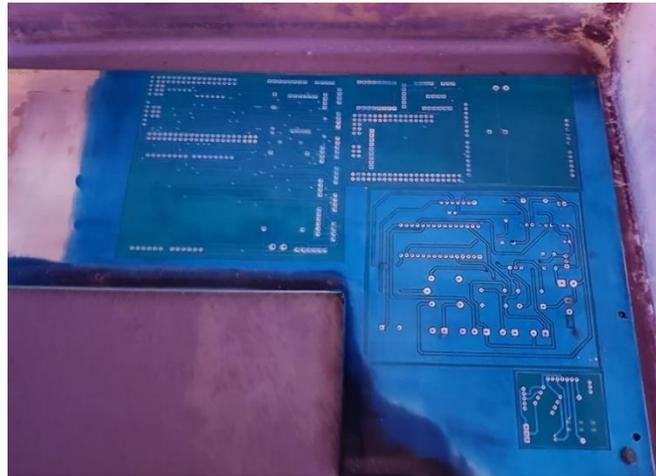


Figura 26. Lavado con carbonato de potasio.

Por último, se recortó la placa y se procedió a soldar los componentes, para esto se utilizó un caudín con punta tipo lápiz (RADOX® 110-155) que tiene una potencia de 40 W y soldadura 60% estaño con 40% plomo, para mejorar la soldadura se aplicó un poco de pasta con flux en los pines de los componentes.

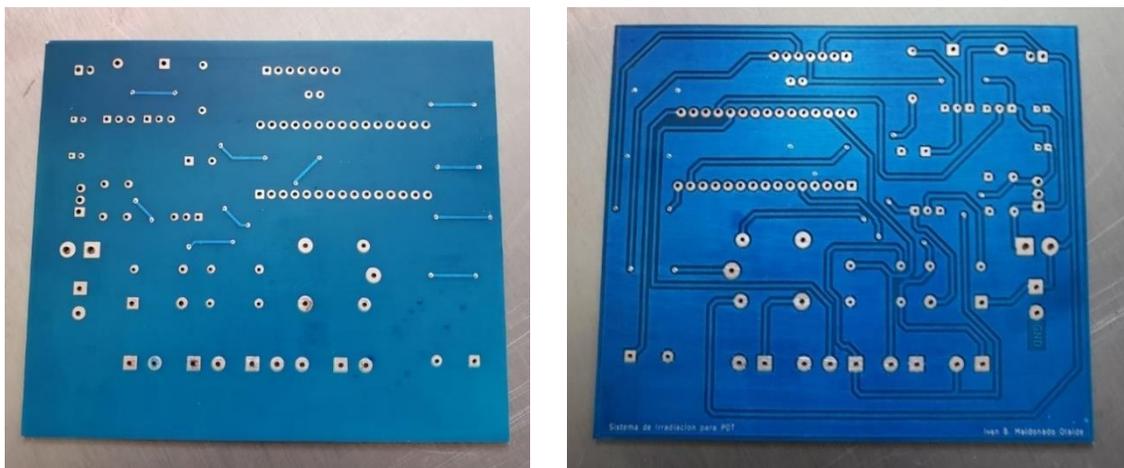


Figura 27. Vista superior e inferior de la placa terminada.

### 3.4. Descripción de la estructura

Debido a que este dispositivo se diseñó para su uso en ratones es necesario que presente una manejabilidad en los ejes X, Y, Z para poder colocarse de forma adecuada en la zona a irradiar, por tal motivo el dispositivo se divide en 2 partes: el controlador y el irradiador. Con la finalidad de tener una imagen más clara del dispositivo, se desarrolló un modelo 2D con la ayuda del software Eplan P8 y un modelo 3D con la ayuda de Solidworks, estos modelos fueron utilizados como una propuesta esquemática que ayudó a conocer los requerimientos esenciales que debe tener la estructura, al igual que proporciona información importante en cuanto a los materiales a emplear. De una forma más concreta el modelo 2D fue utilizado para diseñar la vista externa del dispositivo, lo que permitió dimensionar el número y tamaño de las perforaciones necesarias para los conectores a emplear (Figura 28).

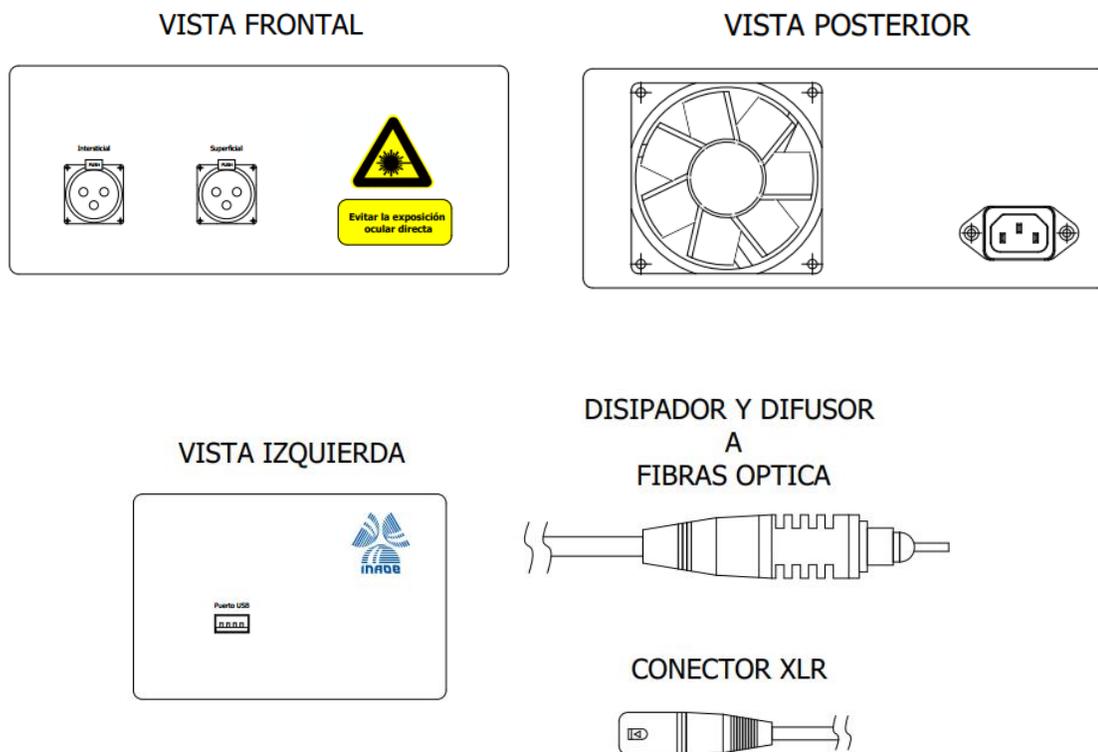


Figura 28. Modelo 2D diseñado en Eplan.  
En esta imagen se puede observar las diferentes vistas planeadas para el controlador e irradiador del dispositivo.

El modelo 3D (

Figura 29) permitió dimensionar nuestro sistema en la parte interna a nivel componente, gracias a estas vistas se inició con el desarrollo del circuito impreso y se obtuvo un plano de instalación de los componentes. De igual forma permitió generar algunas simulaciones. Gracias a estas se optó por utilizar una caja eléctrica hecha en un material resistente a impactos y aislante como lo es el acrilonitrilo butadieno estireno (ABS), el diseño de esta caja facilita su manipulación, elimina la necesidad de un montaje riguroso y permite dar un mantenimiento de una manera rápida.

Figura 29. Modelo 3D diseñado en solidworks.

En la figura de la izquierda se puede observar la parte frontal y en la figura de la derecha se observa la parte posterior del dispositivo, en ambas figuras se muestra la posición de cada componente.

### **3.5. Descripción del irradiador**

El LED empleado en nuestro dispositivo tiene un ángulo de apertura de  $125^\circ$  y dentro de nuestro protocolo experimental se requiere limitar esta área a 1 cm, por este motivo y con el propósito de darle manejabilidad al dispositivo se desarrolló un soporte similar a la estructura de un Cautín que no solo permitiera moverse en los ejes X, Y, Z. sino que también permitiera limitar el área de irradiación. Para esto se empleó la del LED en combinación con una barra de acrílico de 1 cm de diámetro, fibras ópticas de plástico de 0.7 mm de diámetro y un disipador que tiene la función de reducir la temperatura del LED.

Para la construcción de estos soportes, primero se diseñaron en solidworks y se imprimieron en ABS con la ayuda de una impresora 3D (Alfawise® U30), se les aplicó un tratamiento con vapor de acetona (Equate®) para mejorar el acabado de la impresión.

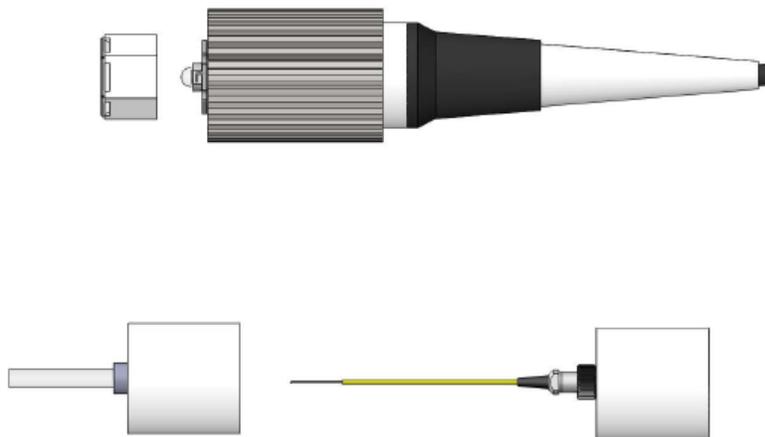


Figura 30. Modelo 3D del irradiador diseñado en solidworks.

### **3.6. Diseño del software**

El sistema de irradiación cuenta con un software desarrollado en LabVIEW®. Este programa define la duración del tratamiento, la densidad de potencia y el método de irradiación, previamente introducidos por el usuario. De igual forma se monitorea la temperatura del sistema. Al concluir el tratamiento se presenta una alarma audible como indicador para el usuario. Todo esto con la intención de poder controlar la dosis de luz aplicada y eliminar los errores humanos que se pueden llegar a presentar en la aplicación de la TFD.

Esta interfaz permite tener un control sobre los usuarios que utilicen el sistema con la finalidad de evitar un mal uso de este. Al término de la terapia, a los usuarios se les proporciona un documento de Excel que contiene un registro de los parámetros utilizados durante la terapia. Todo esto desde una PC o laptop que cuente con Windows vista/ 7/ 10 como sistema operativo.

### 3.6.1. Requerimientos del software

De acuerdo con las necesidades presentadas en la aplicación de la TFD, el hardware y los laboratorios, se definieron los requerimientos de software:

- Comunicación con una base de datos
- Control de acceso de usuarios
- Registro de nuevos usuarios
- Historial de accesos
- Cálculo de la dosis
- Procesamiento de señales
- Comunicación con el Arduino NANO
- Visualización de los datos obtenidos por el hardware

### 3.6.2. Base de datos en Access

Previamente al desarrollo de la interfaz gráfica de usuario se desarrolló una base de datos en Access con el propósito de poder llevar un registro de los usuarios y un historial de su último acceso. Esta base de datos se vincula a nuestra interfaz con el objetivo de permitir el acceso a los usuarios o visualizar el historial de accesos como se puede observar en la Figura 31.

Id	Nombre	Usuario	Contraseña	Fecha	Hora
1	Ivan Betsabeel Maldonado Olalde	IBMO	*****	12/06/2020	15:36
2	Teresita Spezzia Mazzocco	TSM	*****	04/08/2020	16:20
3	María Guadalupe Delgado Lopez	MGDL	*****	07/08/2020	13:22
4	Cristina Isabel Díaz Failach	CIDF	*****	28/08/2020	11:34

Figura 31. Base de datos desarrollada en el software Access.

### 3.6.3. Pantalla de acceso

La pantalla inicial o pantalla de acceso nos permite iniciar la navegación en la interfaz de usuario de nuestro sistema de irradiación. Esta pantalla es vinculada con una base de datos desarrollada en Access donde compara si el usuario y contraseña son correctos permitiendo ingresar al menú, en caso contrario se envía una alerta indicando que el usuario y/o contraseña

son incorrectos como se observa en la Figura 32, así mismo en el Anexo A se incluye la programación desarrollada (Figura 60).



Figura 32. Pantalla de acceso del programa ejecutable para el sistema de irradiación.

### 3.6.4. Menú principal

El menú principal es una pantalla que nos permite iniciar la navegación en el sistema de irradiación, ya que contiene botones para trasladarse a las pantallas de: Aplicación de la TFD, registro de nuevos usuarios y el historial de los usuarios que ha utilizado el sistema de irradiación. Esta pantalla también cuenta con un botón que nos permite cerrar la interfaz de usuario como se muestra en la Figura 33, así mismo en el Anexo A se incluye la programación desarrollada (Figura 64).

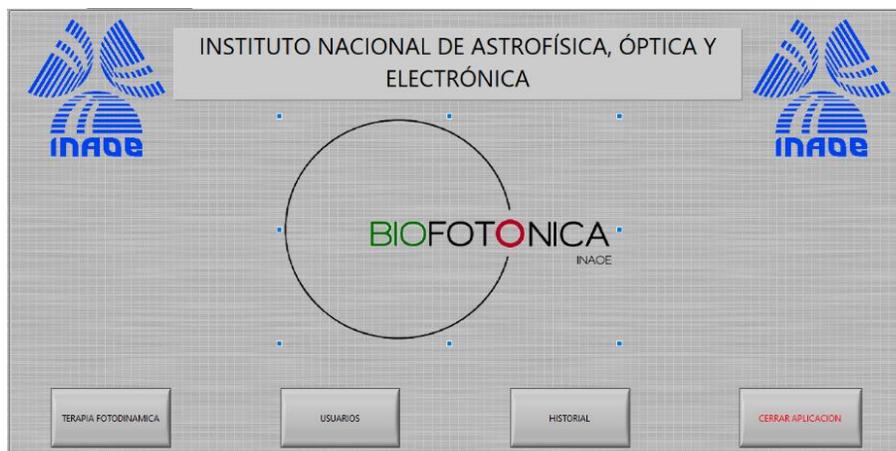


Figura 33. Menú del sistema de irradiación.

### 3.6.5. Registro de nuevos usuarios

La pantalla de registro de nuevos usuarios se encuentra vinculada con la base de datos en forma de escritura permitiéndonos agregar nuevos usuarios del sistema de irradiación o modificando los ya existentes, esto en caso de haber olvidado la clave de acceso. A través de esta pantalla se podrá llevar un registro del personal que tenga acceso a este sistema para mantener un control de su uso y prevenir posibles fallas por el uso indebido. La Figura 34 nos muestra la pantalla de registro de usuarios, así mismo en el Anexo A se incluye la programación desarrollada (Figura ).



Figura 34. Pantalla de registro para nuevos usuarios del sistema de irradiación.

### 3.6.6. Historial de usuarios

La pantalla de historial de usuarios permite visualizar el registro de usuarios que han iniciado sesión en el sistema de irradiación a partir de un registro obtenido de la base de datos mencionada en la sección 3.6.2, esta pantalla despliega el nombre de los usuarios que han utilizado el dispositivo, con su respectiva fecha y hora. La Figura 35 muestra el historial de usuarios, así mismo en el Anexo A se incluye la programación desarrollada (Figura 61).



Figura 35. Pantalla de historial de usuarios del sistema de irradiación.

### 3.6.7. Aplicación de la TFD

La pantalla de aplicación de la TFD (Figura 36) es la más importante de nuestro sistema ya que esta permite al usuario elegir las dosis de luz que se aplicarán, y a partir de esta dosis y el tipo de radiación se obtendrá el tiempo de irradiación. Al finalizar este tiempo se activa una alarma que indica el fin de la terapia, de igual forma el usuario podrá agregar datos como el tipo de línea celular y dosis del FS. Estos datos se guardarán en una ubicación elegida por el usuario en un archivo .xlsx, la programación de esta pantalla se encuentra en el anexo A (Figura 63).



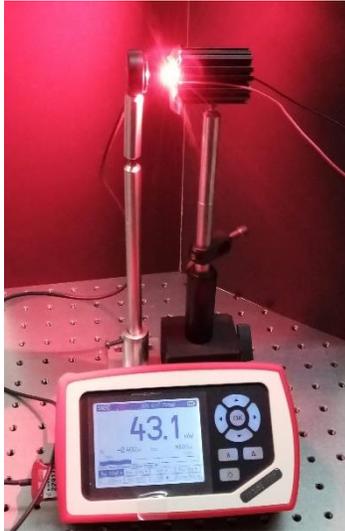
Figura 36. Pantalla principal para la aplicación de la terapia.

### **3.7. Resultados del dispositivo para uso en ratones**

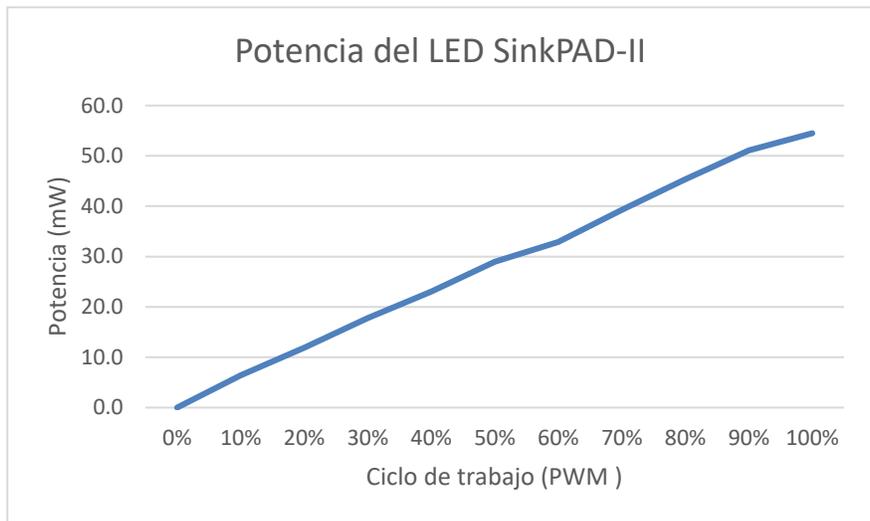
Como se mencionó en la sección 3.3 se diseñó una fuente de luz cuya finalidad es activar el FS AM. Por tal motivo se buscó un LED cuyo espectro de emisión y potencia permitieran generar una respuesta terapéutica. Para comprobar tanto el espectro de emisión y la potencia máxima del dispositivo se realizaron las siguientes pruebas:

#### **3.7.1. Medición de potencia**

La potencia de un LED está directamente relacionada con la corriente que se le suministra, una forma de controlar la corriente del LED es mediante la técnica de PWM. Esta técnica permite convertir una señal digital en una señal analógica cambiando el tiempo que se mantiene encendida la señal, esto nos permite fragmentar la señal en ciclos de trabajos que varían del 0 – 100%. Para realizar las mediciones de potencia se alineó el LED a 1 cm de distancia del medidor de energía y potencia óptica PM100D de THORLABS® (Figura 37a), este dispositivo se utilizó con un sensor S120C (fotodiodo de silicio) cuyos parámetros de detección en longitud de onda van de los 400 – 1100 nm con una resolución de 1 nm. Este sensor presenta un diámetro de apertura configurable a partir de 0.010 mm hasta 9.5 mm. Para este experimento se configuró el medidor a 630 nm con un diámetro de apertura del sensor de 6.3 mm. Se realizaron mediciones en ciclos de trabajo desde el 10% hasta el 100% de la señal en intervalos del 10%, donde se registraron las mediciones cada 30 segundos por un periodo de 10 minutos.



a)



b)

Figura 37. Potencia promedio del dispositivo para ratones.  
a) Arreglo experimental, b) Potencia promedio del LED

La Figura 37b muestra un barrido de la potencia óptica por los diferentes porcentajes de ciclo de trabajo, donde se observó la correlación de la potencia más baja fue de 6.4 mW a un 10% de ciclo de trabajo y la potencia más alta fue de 54.5 mW al 100%. Sin embargo, se observó que al emplear el ciclo de trabajo del 100%, ocurre un decaimiento en la potencia a partir del minuto 1 de operación del dispositivo, cuestión que se puede atribuir al aumento en la temperatura del dispositivo tal como lo muestra la Figura 38b. Con el objetivo de disminuir estos efectos se empleó el uso de un disipador cilíndrico de aluminio, el cual nos permite evitar el sobrecalentamiento del LED y minimizar la pérdida de potencia. Por lo cual en la Figura 38c observamos una mejora en la estabilidad de la potencia óptica, manteniéndose en un promedio de 56.5 mW. Lo anterior gracias a que la temperatura se mantiene en un máximo de 25°C, tal y como se muestra en la Figura 38d.

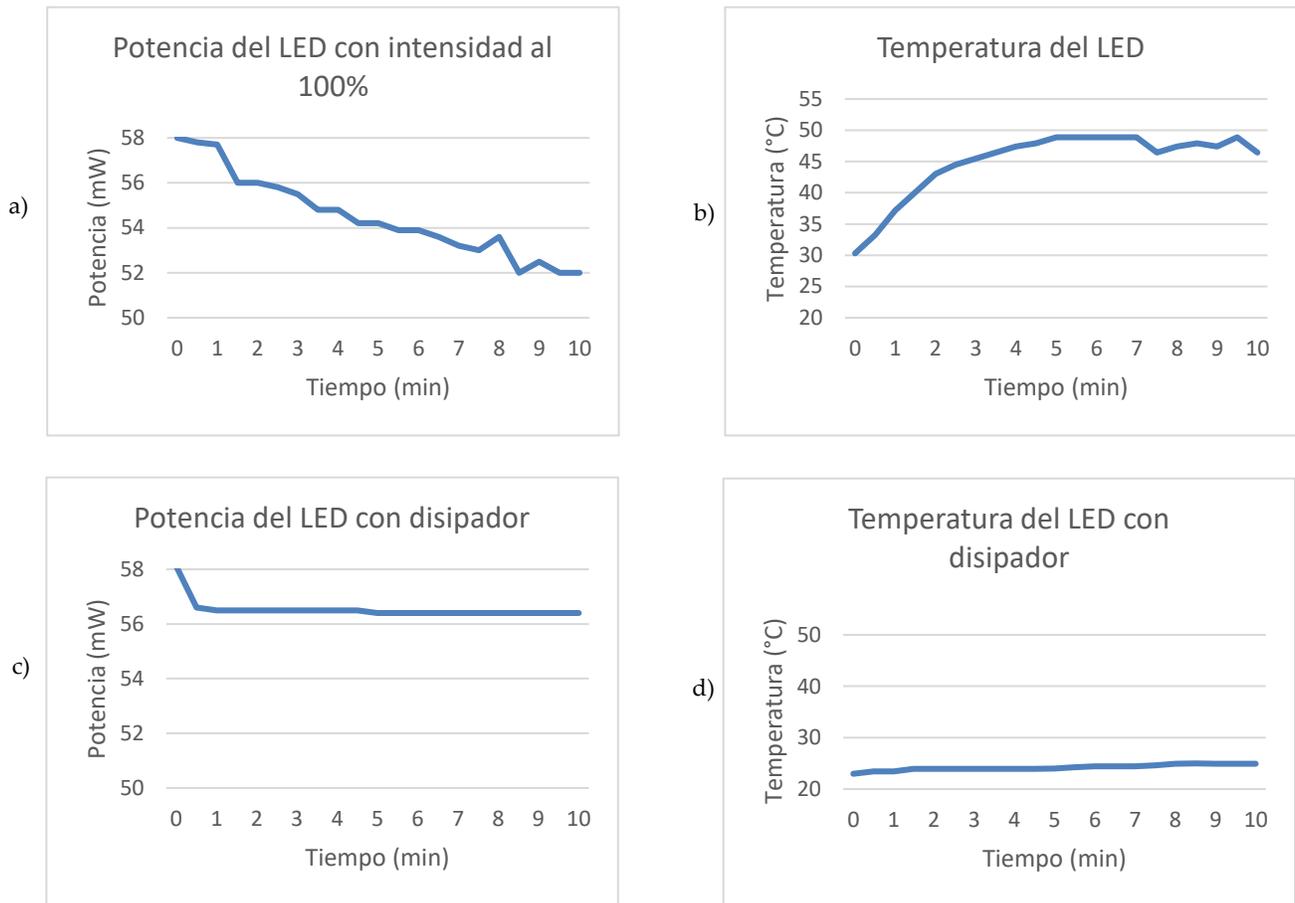


Figura 38. Potencia y temperatura del LED al 100% de intensidad.

a) Potencia óptica del LED, b) Temperatura del LED, c) Potencia óptica del LED con disipador y d) Temperatura del LED con disipador

Un problema que se observó fue que la potencia no era lo suficientemente alta para poder generar una respuesta terapéutica adecuada. Por tal motivo nace la necesidad de aumentar esta potencia, para realizar esto, se empleó el uso de una lente concentradora (

Figura 39a) de 12 mm de diámetro fabricada con policarbonato con una eficiencia en la transmisión del 68.7%. Es importante mencionar que se eligió una lente de policarbonato sobre una de vidrio debido en trabajos previos se ha mencionado que los beneficios en cuanto al menor peso, costo y su mayor resistencia al impacto contrarrestan las desventajas de tener una menor transmitancia (Perelló et al., 2001). En combinación con la lente concentradora se empleó una barra de acrílico de 5 cm de largo con área de 1 cm<sup>2</sup>, col al que se obtuvo una potencia promedio final de 106 mW (

Figura 39b), la cual se ha reportado que es una potencia capaz de generar una respuesta terapéutica (Orth et al., 2000).

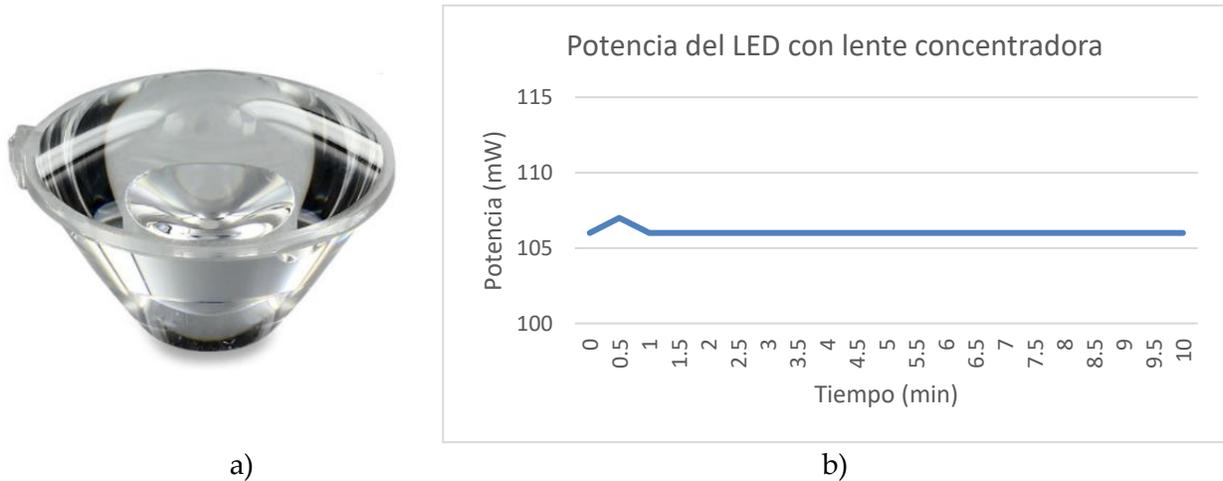


Figura 39. Potencia del LED con lente concentradora.  
a) Tipo de lente concentradora, b) Potencia del LED con el uso de una lente concentradora.

### 3.7.2. Medición del espectro de emisión

El último parámetro analizado para el desarrollo de esta fuente de luz fue el espectro de emisión. Para obtener dicho espectro, se utilizó un espectrómetro (Ocean Optics® USB 2000), alineando la entrada de la fibra óptica con el LED a una distancia de 1 cm. Posteriormente se dejó encendido el LED por 5 minutos y se obtuvo la lectura del espectro.

Las especificaciones técnicas del LED nos indican que su espectro de emisión se encuentra entre 600 – 700 nm, indicando que el pico de emisión puede variar según el voltaje y la corriente utilizada en la alimentación del LED. La Figura 40 muestra la lectura del espectro de emisión de nuestro sistema de irradiación, en esta figura se logra observar que el uso de la intensidad al 100% no genera una variación en el espectro de emisión. Manteniendo su pico máximo en 650 nm el cual empata con el pico de absorción del AM.

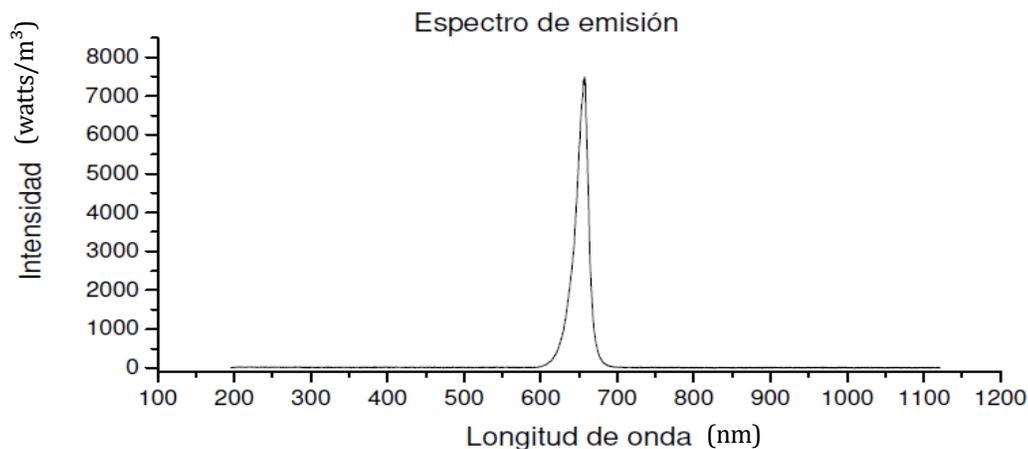


Figura 40. Espectro de emisión del dispositivo para ratones.

Tras los resultados obtenidos durante la caracterización de este dispositivo podemos resumir que este sistema de irradiación cuenta con el espectro de absorción en el rango de 600 a 700 nm y un pico de absorción en 650 nm, este dispositivo cuenta con control de intensidad de irradiación regulada por PWM, que va desde el 0% al 100% de irradiación, alcanzando una potencia máxima de 106 mW que se mantiene estable por al menos 10 min.

# Capítulo 4

## Metodología



En este capítulo se presenta la información correspondiente a los materiales utilizados en esta investigación, así como la descripción de los métodos que se llevaron a cabo. Los métodos incluyen el cultivo y mantenimiento de la línea celular, desarrollo del modelo tumoral, el procedimiento para realizar la TFD tanto *in vitro* como *in vivo*, y los métodos para realizar la evaluación del efecto de la TFD.

## **4.1. Materiales**

### **4.1.1. Línea celular**

Para la realización de esta tesis se trabajó con la línea celular de cáncer de mama derivada del tejido de la glándula mamaria de un ratón BALB/c denominada 4T1 (ATCC® CRL-2539™), la cual fue adquirida directamente de American Type Culture Collection (ATCC) conservándose a temperatura de -80°C. Todos los experimentos se realizaron con pases tempranos (pase 3 y 4) con la finalidad de disminuir el riesgo de trabajar con células que pudieran tener alteraciones. El mantenimiento de la línea celular se realizó utilizando el medio de cultivo RPMI-1640 (ATCC® 30-2001™), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Biowest® S1810-500™), 100 U de penicilina y 100 µg de estreptomina (Caisson® PSL01-100ML™).

### **4.1.2. Ratones**

Se utilizaron 25 ratones hembra BALB/c, vírgenes de 8 semanas de edad aproximadamente, con un peso de 18-22 g. obtenidos del Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y del Bioterio Centro Médico Siglo XXI (CMNSXXI). Las ratonas se sometieron a un periodo de adaptación de 5 días en las instalaciones del bioterio del CIBIOR, donde se mantuvieron con una temperatura de 22°C a 24°C, ciclo luz/obscuridad natural. La ingesta de agua purificada y alimento (LabDiet® 5008™) fue *ad libitum*. Los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana -NOM-062-ZOO-

1999 y fueron sacrificados por dislocación cervical al alcanzar un volumen tumoral de 1000 mm<sup>3</sup>.

#### 4.1.3. Dispositivos lumínicos

Para la realización de este trabajo de tesis se emplearon dos dispositivos lumínicos diseñados y elaborados en el Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica. El primer dispositivo se empleó exclusivamente para los estudios *in vitro*. Este dispositivo se caracteriza por estar conformado por un arreglo matricial de 12 LED's que emiten a una longitud de onda de 635 - 650 nm con una potencia promedio de 26.66 mW. El diseño del dispositivo permite acoplarse perfectamente en microplacas de 96 pozos (Figura 41).



Figura 41. Dispositivo de irradiación para estudios *in vitro*.

El segundo dispositivo fue empleado para los experimentos *in vivo*. Se caracteriza por ser un sistema de irradiación automatizado que permite tanto la irradiación superficial como la intersticial, este dispositivo emite a una longitud de onda de 620 - 680 nm y una intensidad promedio de 100 mW/cm<sup>2</sup> (Figura 42). El diseño y desarrollo se encuentra descrito en el capítulo 3 de este documento.

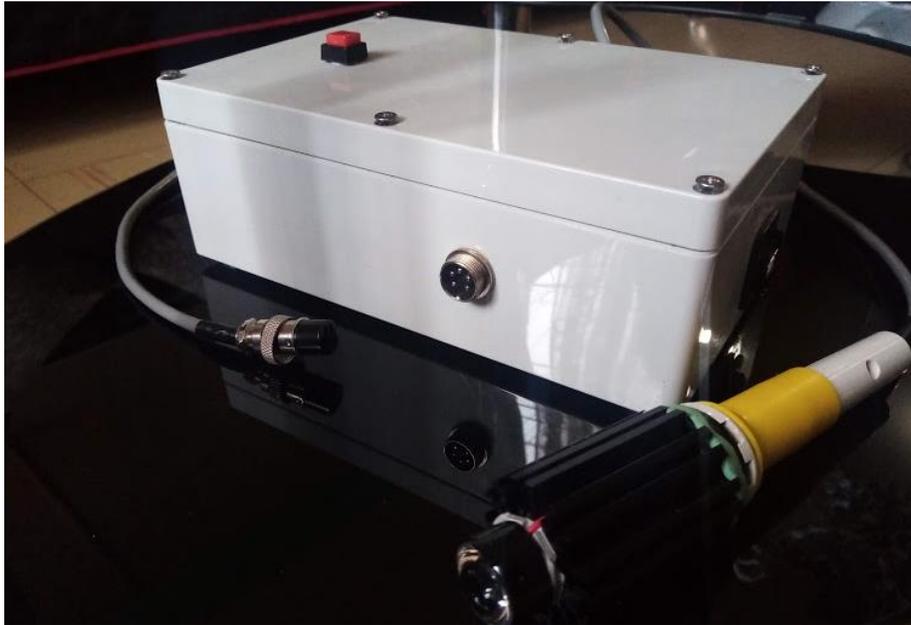


Figura 42. Dispositivo de irradiación para estudios *in vivo*.

## 4.2. Métodos

### 4.2.1. Cultivo celular

Para la realización del primer cultivo celular con la línea 4T1 nos guiamos de los artículos reportados por Pularki (BA & S, 2001), se atemperó el vial de células a una temperatura de 37°C, posteriormente se agregó el contenido en un tubo falcón estéril que contenía 9 ml de medio, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min para recuperar el paquete celular, el cual fue homogenizado con 1 ml de medio se colocó en una caja de cultivo T25 de 40 ml que contenían 5 ml de medio.

Cada día se verificó que el cultivo no presentara contaminación al igual que se evaluó la confluencia y la morfología celular con la ayuda del microscopio invertido de contraste de fase (Nikon® TMS-F), cuando el cultivo alcanzó una confluencia del 70 – 80% se procedió a realizar un subcultivo. Para esto se realizaron 2 lavados con PBS, se agregaron 500 µl de Tripsina/EDTA (GIBCO® 15400054) y se mantuvo a una temperatura de 37°C durante 5 min.



Cuando las células se redondearon y se despegaron de la superficie, se procedió a inactivar la tripsina con 1 ml de medio de cultivo. Las células fueron recuperadas y depositadas en un tubo eppendorf de 1.5 ml con el fin ser centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min (Heathrow Scientific® HS10050). Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se homogenizó el paquete celular con 1 ml de medio. Por último, se realizó el conteo celular por cámara de Neubauer, empleando una tinción con azul tripán (90  $\mu$ l) (Sigma-Aldrich® T8154-100ML).

#### **4.2.2. Captación del AM**

La concentración del FS en el interior de las células es un factor tan importante como la dosis de luz que se emplea para generar el efecto de la TFD. Una baja captación puede originar una baja concentración de  $^1\text{O}_2$  y, por lo tanto, un menor efecto de la TFD (Allevato, 2006; Ramón, 2015). La captación del FS depende en gran medida del tiempo de interacción de las células con el FS, la estructura del FS y la permeabilidad de la pared celular. Una hora de incubación es el tiempo de interacción adecuado que permite encontrar una concentración adecuada del FS en el interior de la célula, según reportes de trabajos previos de tesis realizados en conjunto INAOE/CIBIOR (Atenco Cuautle et al., 2019; Pérez Pérez et al., 2021).

Siguiendo el mismo protocolo se emplearon  $12 \times 10^3$  células 4T1/pozo contenidas en 150  $\mu$ l de medio de cultivo y se depositaron por triplicado en pozos de una placa de 96 pozos, se incubaron por 24 h a 37°C con 5%  $\text{CO}_2$ , después de la incubación se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron con 100  $\mu$ l de PBS, se agregó el FS en concentraciones de 10  $\mu$ M y 20  $\mu$ M disueltos en medio de cultivo. La placa se incubó por 1 hora en las condiciones ya mencionadas, posteriormente se retiró el PBS y se realizó un lavado con PBS. Para finalizar se lisaron las células con agua destilada y se procedió a leer el espectro de absorción con un lector de microplacas (BIOTEK-SYNERGY 4).

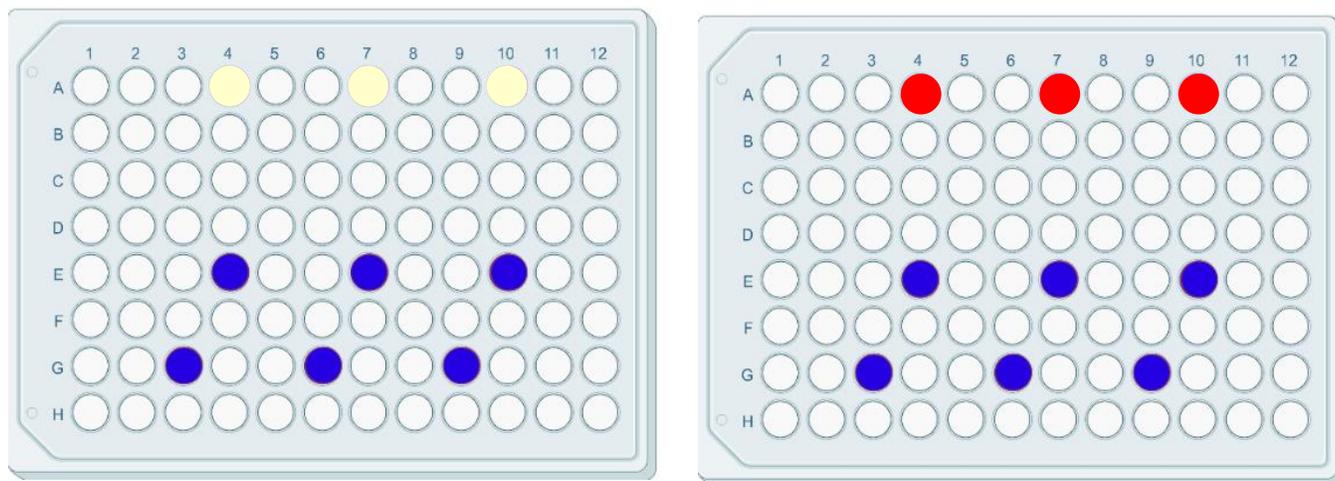


### **4.2.3. Aplicación de la TFD *in vitro***

Para poder comparar el efecto terapéutico de la TFD fue necesario tener un grupo de células que sirvieran como marco de referencia de la viabilidad celular en las células 4T1. Este grupo se le denominó “control sin interacción” debido a que este grupo de células no interaccionó con AM ni con la fuente de luz. También se emplearon 2 grupos control para las dosis de FS y de luz a emplear para observar si estos elementos generaban un efecto citotóxico por sí solos. Por último, se utilizaron los grupos interactuados con las distintas dosis de FS en combinación con la dosis de luz. Para cada uno de estos grupos se colocaron  $12 \times 10^3$  células / 200  $\mu$ l de medio por pozo. La distribución empleada en los experimentos se muestra en la Figura 43. Las placas se mantuvieron en reposo por 15 min, para favorecer la adhesión celular a la superficie, al final se depositaron en una incubadora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h.

Al término de la incubación, se retiró el medio de cultivo y se realizó un lavado con PBS, en los pozos correspondientes al control de AM (Figura 43a) se adicionó el FS en concentraciones de 10  $\mu$ M y 20  $\mu$ M y se incubaron por 1 hora en la oscuridad con las condiciones antes mencionadas. Al finalizar la incubación se eliminó el FS, se realizaron 2 lavados con PBS y se agregó medio de cultivo/SFB/antibiótico. Para verificar el efecto de la TFD en dosis de luz de 20 J/cm<sup>2</sup>, 30 J/cm<sup>2</sup> y 40 J/cm<sup>2</sup> tres placas fueron utilizadas respectivamente (Figura 43b), de inicio las células de los pozos marcados en azul fueron interaccionados con el FS siguiendo el procedimiento mencionado con anterioridad. Posteriormente a los 2 lavados con PBS se agregaron 100  $\mu$ l de PBS y se irradiaron las placas con su respectiva dosis de luz. Por último, se agregó medio de cultivo/SFB/antibiótico y se dejaron en incubación por 24 h, pasado este tiempo se observó el efecto de la TFD en la morfología con la ayuda de un microscopio a 10x esto debido a que no se necesitaba emplear mayor detalle en la morfología celular y no se contaba con un objetivo mayor a los 20x. El FS empleado en los ensayos *in vitro* se toma de la preparación de un stock de AM (MAYER® #7220-79-3) a 200  $\mu$ M/PBS que se filtró por 0.22  $\mu$ m (Millex® SLGVR33RS) y se mantuvo en refrigeración y protegido de la luz. A partir de

este stock se prepararon soluciones de trabajo de 10  $\mu\text{M}$  y 20  $\mu\text{M}$  en medio de cultivo RPMI-1640.



a)

b)

Figura 43. Configuración del cultivo celular en placas de 96 pozos

a) Muestra la configuración del grupo control donde la fila A contiene el grupo control sin interacción, en fila E control de AM a 10  $\mu\text{M}$  y fila G control de AM a 20  $\mu\text{M}$  b) Muestra la placa de TFD, fila A contiene el control de luz, fila E tratamiento con 10  $\mu\text{M}$  y fila G tratamiento con 20  $\mu\text{M}$ .

#### 4.2.4. Evaluación del efecto de la TFD por la técnica de MTT

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas de la célula que conllevan a que se produzca un daño que puede ser detectado. La integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de viabilidad celular que puede ser evaluada por la capacidad de las mitocondrias de reducir el compuesto 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).

El MTT es reducido por la enzima succinato-deshidrogenasa a su forma insoluble formazán, el producto de reacción es retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización de los cristales de formazán, de esta forma es cuantificada la cantidad de MTT reducido. El cambio de color de violeta a amarillo, indica una baja absorbancia y por consecuencia una disminución de la viabilidad celular.



Establecidas las concentraciones de FS y luz, se realizó la técnica de TFD como se indicó anteriormente, una vez finalizada la interacción se eliminó el medio de cultivo y las células se lavaron una vez con PBS. Entonces se preparó una solución stock de MTT con 5 mg/ml de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2ilo)-2, 5-difeniltetrazol (Sigma-Aldrich ® M5655™) y PBS. A partir del stock se preparó una solución de trabajo de MTT (MTT 10%, SFB 7% y antibiótico 1%), 37 µl de esta solución fueron agregados a cada pozo, además se agregó la solución en otros 3 pozos más, los cuales sirvieron como blanco de referencia. Las placas se dejaron incubar por 4 h a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. Los cristales de formazán formados se solubilizaron por adición de 70 µl de DMSO (Sigma-Aldrich ® D8418-100ML™), la placa se mantuvo en agitación a 470 rpm por 15 min. Por último, se leyeron las absorbancias a 570 nm y 620 nm con el lector de microplacas.

### **4.3. Terapia fotodinámica en modelo murino**

#### **4.3.1. Inoculación de ratonas**

A partir de los cultivos celulares mencionados en la sección 4.2.1 se generó un subcultivo en una caja de cultivo T25 de 70 ml para la inoculación de las ratonas, este cultivo fue recuperado de la siguiente forma: se desechó el medio de cultivo, se agregó 1.5 ml de Tripsina/EDTA, se mantuvo a temperatura de 37°C por un lapso de 5 min. Al término se agregaron 3 ml de medio de cultivo para inactivar la acción de la tripsina. Las células se recuperaron y se transfirieron a 3 tubos eppendroff de 1.5 ml. Después de este proceso las células se centrifugaron a 1500 rpm por un lapso de 5 min, finalmente se eliminó el sobrenadante y se agregó 1 ml de medio de cultivo libre de SFB. Posteriormente se realizó el conteo celular usando la cámara de Neubauer y se realizó la dilución pertinente con la finalidad de obtener una solución con  $100 \times 10^3$  células en 50 µl de medio libre de suero tal y como lo menciona Pularki (BA & S, 2001) (en un segundo experimento se administró  $50 \times 10^3$  células en 50 µl debido a que se presentaron signos de necrosis en el primer grupo inoculado). Las células se cargaron en una



jeringa de 1 ml con aguja hipodérmica de 27G (Diabelab), esta concentración fue suministrada en una de las glándulas mamarias del flanco derecho de la ratona.

#### **4.3.2. Medición del tumor**

Se monitoreó la aparición del tumor cada 2 días, palpando el área de la inyección con el dedo índice para detectar la presencia del tumor. Una vez detectados se realizaron al menos dos mediciones del tumor de forma perpendicular entre sí y abarcando la porción más grande del tumor en cada dirección. Los diámetros se midieron con la ayuda de un medidor vernier (Stainless Hardened) y se calculó el volumen con la fórmula (Wagner et al., 2012)(Del Valle et al, 2004):

$$\text{Volumen del tumor} = \frac{(D. mayor)(D. menor)^2}{2}$$

#### **4.3.3. Aplicación de la TFD *in vivo***

Los experimentos de TFD iniciaron cuando los volúmenes tumorales alcanzaron los 80  $mm^3$ . En ese momento las ratonas fueron divididas en 4 grupos:

- I. Grupo control sin interacción.
- II. Grupo control de FS.
- III. Grupo control de luz.
- IV. Grupo de TFD.

Para los grupos de control de FS y TFD se administraron 150  $\mu$ l de AM de manera intratumoral inicialmente se infiltró con una jeringa de insulina 31 G, posteriormente en un segundo experimento se infiltró con la ayuda de la bomba de infusión (WPI® SP100i), dicha bomba se configuró con un diámetro de jeringa de 8.59 mm a una velocidad de 2.5 ml/h. La administración inicialmente fue en el centro del tumor y posteriormente se trató de ramificar hacia la periferia (ver sección 5.6.1). El FS se dejó incubar por un periodo de 30 min (este

tiempo se debe al tiempo máximo que se mantuvieron las ratonas anestesiadas) y después se procedió a irradiar de manera superficial con una dosis de luz de  $100 \text{ J/cm}^2$ , las ratonas se sacrificaron por dislocación cervical al alcanzar un volumen tumoral de  $1000 \text{ mm}^3$ . Los tumores se extrajeron y se midieron (ancho-largo-alto). Para conocer el factor de crecimiento de cada tumor, se dividió el último volumen registrado entre el volumen registrado al inicio del experimento. Al mismo tiempo se extrajeron los órganos diana de las células 4T1 con el fin de buscar signos de metástasis.

Es importante mencionar que antes de aplicar las dosis de luz se analizaba la potencia del dispositivo para reducir los errores de variación en nuestra terapia.



Figura 44. Calibración del dispositivo

#### **4.3.4. Infiltración y captación del AM en tumores**

Con el propósito de observar la capacidad que tiene el AM de infiltrar y ser captado por los tumores generados con las células 4T1, se probaron 2 métodos experimentales diferentes. Para



el primer experimento se utilizó una ratona que presentara un volumen tumoral de  $150 \text{ mm}^3$ , a la cual se le extrajo el tumor y se dejó inmerso en 5 ml de AM al 1% durante un periodo de 16.5 h, este experimento nos permitió evaluar la capacidad del FS de infiltrar los tumores.

El segundo experimento evaluó el tiempo de incubación utilizado en los experimentos de TFD. Para esto se infiltraron 2 ratonas con 150  $\mu\text{l}$  de AM al 1% cuyo volumen tumoral era de  $100 \text{ mm}^3$ . El primer tumor se extrajo al finalizar la infiltración y a la segunda ratona se dejó incubar el FS en el tumor por 30 min, pasado este tiempo se extrajo el tumor. Ambos tumores se fijaron en formol amortiguado y a los 5 min se valoró de forma cualitativa la cantidad de AM que se diluyó en el formol.

#### **4.4. Análisis estadístico**

Para los experimentos *in vitro*, se analizaron los resultados obtenidos en el ensayo de MTT, este ensayo colorimétrico nos permite calcular el porcentaje de células viables (ver 4.2.4). Estos valores se registraron en una hoja de cálculo, clasificándose por grupo experimental. Para el experimento *in vivo*, se consideró el volumen del tumor, el cual se midió usando un calibrador (vernier), los datos se registraron en una hoja de cálculo para comparar el efecto que presentó la terapia en comparación con los grupos de control.

Los resultados obtenidos se analizaron con la prueba estadística de kruskal-wallis, la cual se combina con la prueba de Duncan, para determinar la eficacia del tratamiento por la comparación entre grupos, para determinar los grupos con diferencia significativas a los controles. En esta tesis se consideró una significancia del 95%.

# Capítulo 5

## Resultados

En este capítulo se exponen los resultados de los diversos métodos *in vitro* e *in vivo* empleados en esta tesis. Cuya finalidad es evaluar el efecto citotóxico y terapéutico de la TFD mediada con AM, para lo anterior se compraron los grupos tratados con los grupos control, los cuales evalúan cada condición empleada.

## 5.1. Captación de FS

La captación del AM por las células 4T1 se pudo confirmar tanto para concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  como de 20  $\mu\text{M}$ , la Figura 5 muestra los espectros de absorción obtenidos después de una hora de interacción del AM con las células 4T1, en ella se puede observar una importante diferencia entre los espectros obtenidos de las células tratadas con TFD 10  $\mu\text{M}$  y 20  $\mu\text{M}$  de AM, en comparación con las células sin interacción. Estos resultados nos indican que, con el tiempo de incubación y las concentraciones empleadas, el FS se logró infiltrar en las células 4T1. Otro aspecto que también se destaca es que la concentración de 20  $\mu\text{M}$  presentó una absorbancia mayor en comparación con la concentración de 10  $\mu\text{M}$  (0.040 y 0.022 u.a. respectivamente).

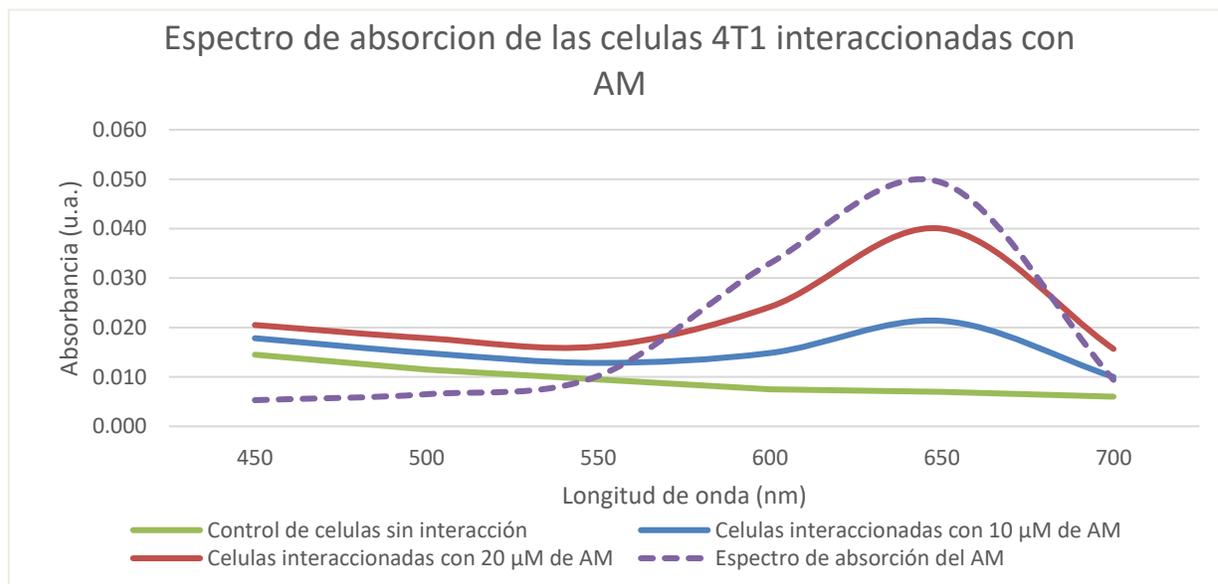


Figura 45. Espectro de absorción de células 4T1 interactuadas con las diferentes concentraciones de AM utilizadas en los experimentos.

## 5.2. Efecto de la TFD en la viabilidad celular

El efecto citotóxico que se presentó en las células 4T1 tras la aplicación de la TFD-AM fue evidente, en la dosis mínima aplicada que fue de 10  $\mu\text{M}$  de AM con 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  y la dosis máxima que consistió en 20  $\mu\text{M}$  de AM con 30  $\text{J}/\text{cm}^2$  se obtuvo una disminución de la viabilidad celular del 35.5% y del 75.9% respectivamente en comparación con el grupo control sin interacción (Figura 46), una mayor concentración de FS y luz generaron un mayor efecto sobre la viabilidad celular. También se pudo observar el efecto de cada uno de los componentes de la TFD sobre la viabilidad celular. Los controles de AM de 10  $\mu\text{M}$  y 20  $\mu\text{M}$  presentaron una reducción en la viabilidad celular del 9.4% y 33.7% respectivamente, los controles de luz de 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  y 30  $\text{J}/\text{cm}^2$  presentaron una reducción del 10.2% y 42.3% respectivamente. Sin embargo, es importante mencionar que, durante el proceso, el dispositivo de irradiación mostró un importante incremento de temperatura donde alcanzo una temperatura de 45 °C lo que nos sugiere que el efecto generado al utilizar una intensidad de 30  $\text{J}/\text{cm}^2$  pudiera ser más por el calentamiento y no por el efecto conjunto de la TFD.

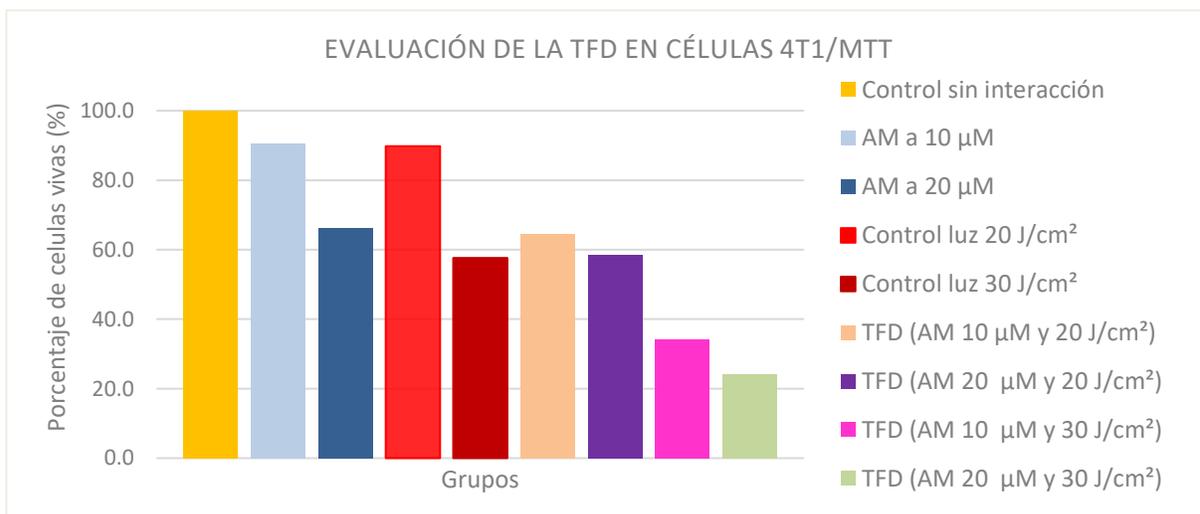


Figura 46. Resultados de viabilidad celular a las 24 h del tratamiento. Donde se presentan los resultados del ensayo de MTT realizado a los diferentes grupos de células 4T1 que fueron interaccionados con AM, luz y dos distintas dosis de TFD.

Por lo tanto, se realizaron modificaciones en el dispositivo lumínico con la finalidad de reducir el efecto térmico que se observó durante el experimento. Dentro de las modificaciones realizadas al dispositivo se encuentran el remplazo de LED's y el cambio del disipador (ver el Anexo A. Análisis y modificación del dispositivo empleado en la TFD con cultivos celulares). Esto permitió incrementar la potencia óptica y a su vez reducir el tiempo de exposición, lo cual favoreció el efecto citotóxico, tal como se muestra en la Figura 47 en donde podemos observar que el control de luz no generó una disminución significativa en la viabilidad celular, al igual que los grupos control de AM (10 y 20  $\mu\text{M}$ ) al compararse con las células de control sin interacción. Sin embargo, al emplear la TFD se observó una disminución estadísticamente significativa (\*) en la viabilidad celular del 72.94% en la dosis de 10  $\mu\text{M}$  de AM con 40  $\text{J}/\text{cm}^2$  y del 96.7% en la dosis de 20  $\mu\text{M}$  de AM con 40  $\text{J}/\text{cm}^2$ .

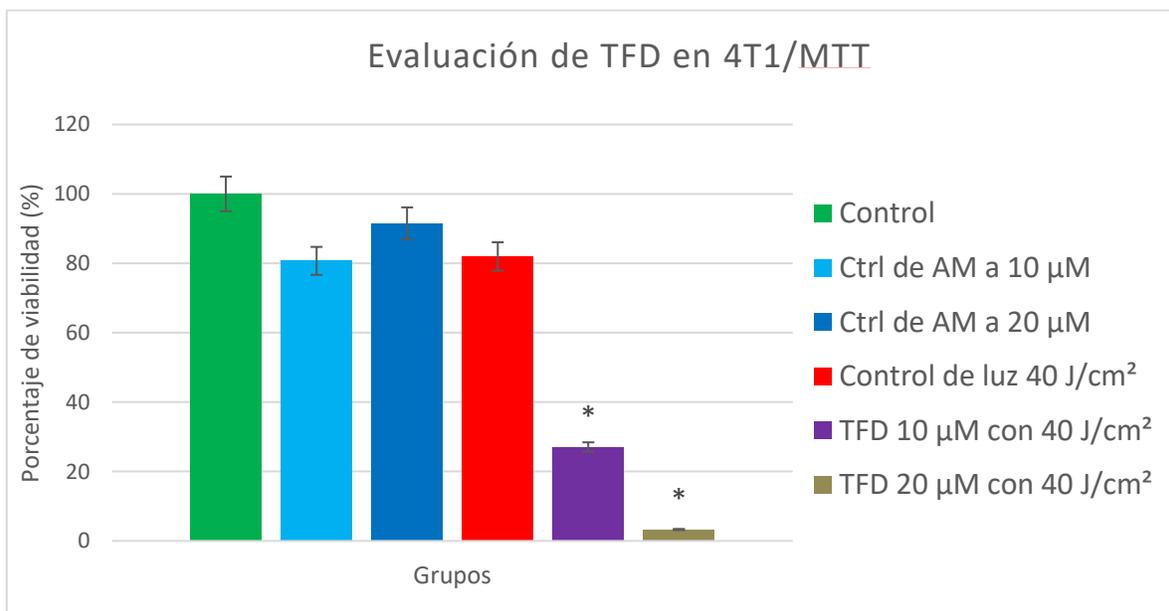


Figura 47. Análisis comparativo del efecto citotóxico de la TFD en la viabilidad celular medido por medio del ensayo de MTT (Ctrl: Control).

### 5.3. Efecto de la TFD en la morfología celular

Evaluar los cambios morfológicos generados por la TFD, es parte importante en los estudios de citotoxicidad, factores como la pérdida de adhesión al sustrato, interacción célula-célula y cambios en el tamaño celular con la subsecuente pérdida de la relación citoplasma-núcleo son indudablemente un reflejo del daño celular. La evaluación del efecto de cada uno de los componentes de la TFD como la concentración del FS y la dosis de luz son elementos importantes para el establecimiento de las condiciones óptimas en el empleo de la TFD. Las células 4T1 crecen formando una monocapa en el fondo del envase presentando características fusiformes (apariencia larga y delgada). En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.8** se muestra el efecto generado por cada una de las condiciones utilizadas en los experimentos de TFD al compararse con células sin interacción (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.8a**), las cuales fueron cultivadas en condiciones normales. De esta forma podemos observar como la diferencia entre la monocapa de las células marcadas como control y las células tratadas. Gracias a esto podemos notar que en el grupo tratado con AM a 10  $\mu\text{M}$  no se distinguen alteraciones morfológicas causadas por la dosis del FS (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.8b**). Así mismo cuando la concentración de AM se incrementa a 20  $\mu\text{M}$  (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.8c**) pareciera no afectar a las células ya que se conserva una morfología celular semejante al control sin interacción. El control de luz a 40  $\text{J}/\text{cm}^2$  (7 min y 30 seg) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.8d**) no presentó cambios importantes ya que se mantuvo la morfología epitelial y la relación citoplasma-núcleo se apreció homogénea, la proliferación no se vio afectada alcanzando una confluencia prácticamente del 100% a las 24 h de haber iniciado el experimento, esto podría indicarnos que el AM y la interacción con la luz por sí solos, ejercen un efecto mínimo sobre las células 4T1. Por el contrario, los cambios morfológicos en las células tratadas con la TFD en dosis de 10  $\mu\text{M}$  de AM y 40  $\text{J}/\text{cm}^2$  (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.8e**) muestran pérdida de interacción tanto célula-célula y célula-sustrato ya que se observan espacios libres en la monocapa, al redondearse las células se pierde la relación citoplasma-núcleo, la muerte celular es notoria debido a la generación de cuerpos apoptóticos. Las células



4T1 bajo las condiciones de TFD en dosis de 20  $\mu\text{M}$  de AM y 40  $\text{J}/\text{cm}^2$  (**Error! No se encuentra el origen de la referencia.**8f), muestran una importante pérdida de contacto o adhesión célula-célula, reflejo de la muerte celular por apoptosis (círculos rojos) en donde se observan mecanismos de desmontaje de celular apoptóticas como lo son la ampollas de membrana plasmática (formación de grandes protuberancias en la superficie de la célula) y la formación de cuerpos apoptóticos (fragmentación de la membrana celular) los cuales se incrementan de manera importante con esta dosis y que sin duda alguna reflejan los resultados obtenidos con la prueba de MTT.

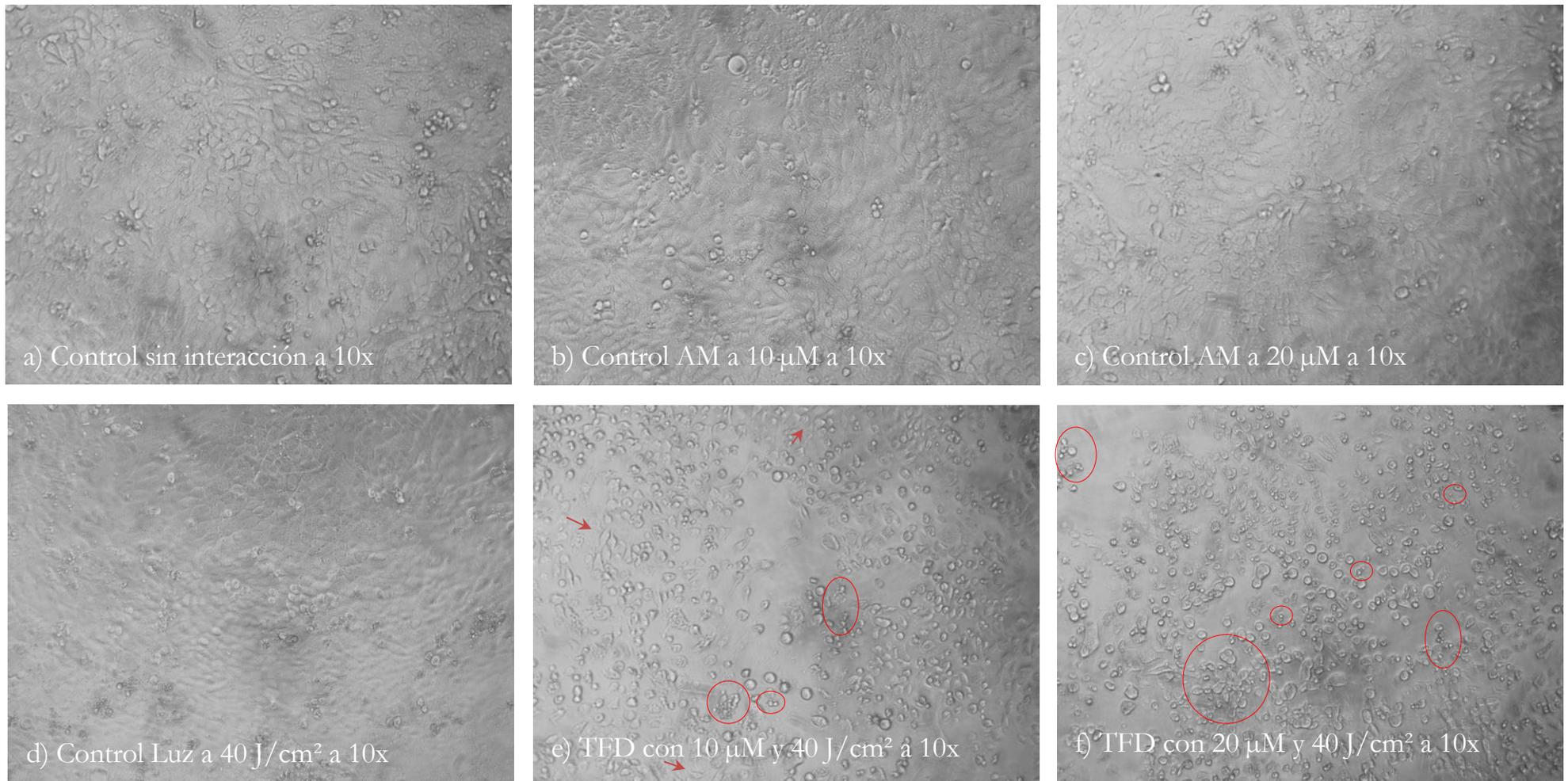


Figura 48. Morfología celular en grupos utilizados para TFD con AM.

a) Grupo control sin interacción, b) Grupo control de AM a 10  $\mu\text{M}$ , c) Grupo control de AM a 20  $\mu\text{M}$ , d) Grupo control de luz a 40  $\text{J}/\text{cm}^2$ , e) Grupo TFD con 10  $\mu\text{M}$  de AM y 40  $\text{J}/\text{cm}^2$  y f) Grupo TFD con 20  $\mu\text{M}$  de AM y 40  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Esta figura nos permite comparar el efecto de la TFD con dosis de 10  $\mu\text{M}$  de AM y 40  $\text{J}/\text{cm}^2$  luz en la morfología celular, en este caso se logra desatacar como las células no generaron una monocapa como en los controles debido a que las células se redondearon.

Para poder observar de forma más precisa los cambios morfológicos mencionados con anterioridad, se presenta la Figura 49 donde se muestra imágenes de los grupos de TFD con dosis de 10  $\mu\text{M}$  de AM en combinación con 40  $\text{J}/\text{cm}^2$  (Figura 49a) y 20  $\mu\text{M}$  de AM en combinación con 40  $\text{J}/\text{cm}^2$  (Figura 49b). Donde se puede visualizar mejor la pérdida de interacción tanto célula-célula y célula-substrato (recuadro azul), la relación citoplasma-núcleo (recuadro rojo) y la generación de cuerpos apoptóticos (recuadro verde).

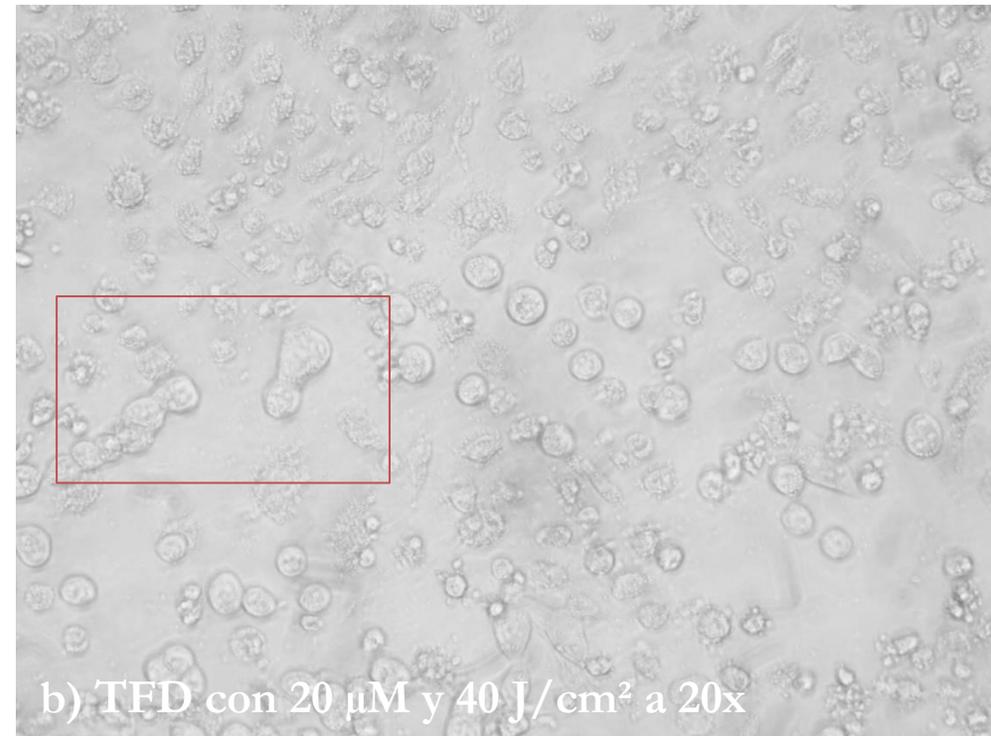
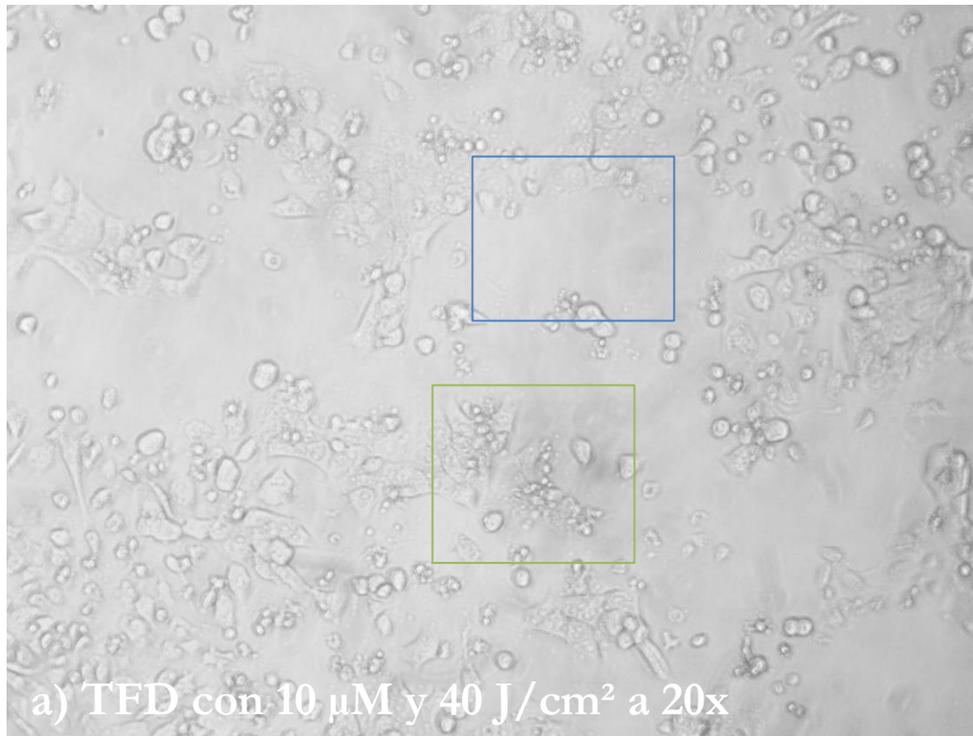


Figura 49. Morfología celular en grupos tratados con TFD.

a) Grupo TFD con 10  $\mu\text{M}$  de AM y 40  $\text{J}/\text{cm}^2$  y b) Grupo TFD con 20  $\mu\text{M}$  de AM y 40  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Esta figura nos permite comparar el efecto de la TFD con dosis de 10  $\mu\text{M}$  de AM y 40  $\text{J}/\text{cm}^2$  luz en la morfología celular, en este caso se logra desatacar como las células no generaron una monocapa como en los controles debido a que las células se redondearon.

## 5.4. Generación del modelo tumoral en ratones

La generación del modelo tumoral es un factor importante que nos permitió identificar el máximo volumen tumoral que se puede utilizar ( $80 \text{ mm}^3$ ) en el estudio de la TFD, la Figura 5 muestra la evolución de los tumores que se desarrollaron en ratonas BALB/c, donde se puede observar que las ratonas adquiridas del bioterio de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) presentaron un tumor palpable de  $27 \text{ mm}^3$  en el día 4 postinoculación, los tumores continuaron creciendo hasta el día 8 donde alcanzaron un volumen promedio de  $61.03 \text{ mm}^3$ . Sin embargo, en los días subsecuentes se observó una reducción en los volúmenes tumorales que continuó disminuyendo hasta que se presentó una remisión total en el día dieciocho que se mantuvo hasta el sacrificio del animal en el día 25. Con el fin de descartar que la remisión que se presentó se debiera a alteraciones de la línea celular, un grupo de ratonas BALB/c adquiridas del Bioterio de CMNSXXI, fueron inoculadas de manera alterna con las mismas condiciones, como resultado se obtuvieron, nódulos en el con un desarrollo y tamaño similar a la 1ra inoculación. Los cuales siguieron su desarrollo hasta el día 25 postinoculación, alcanzando un volumen promedio de  $845 \text{ mm}^3$  a los 25 días postinoculación.

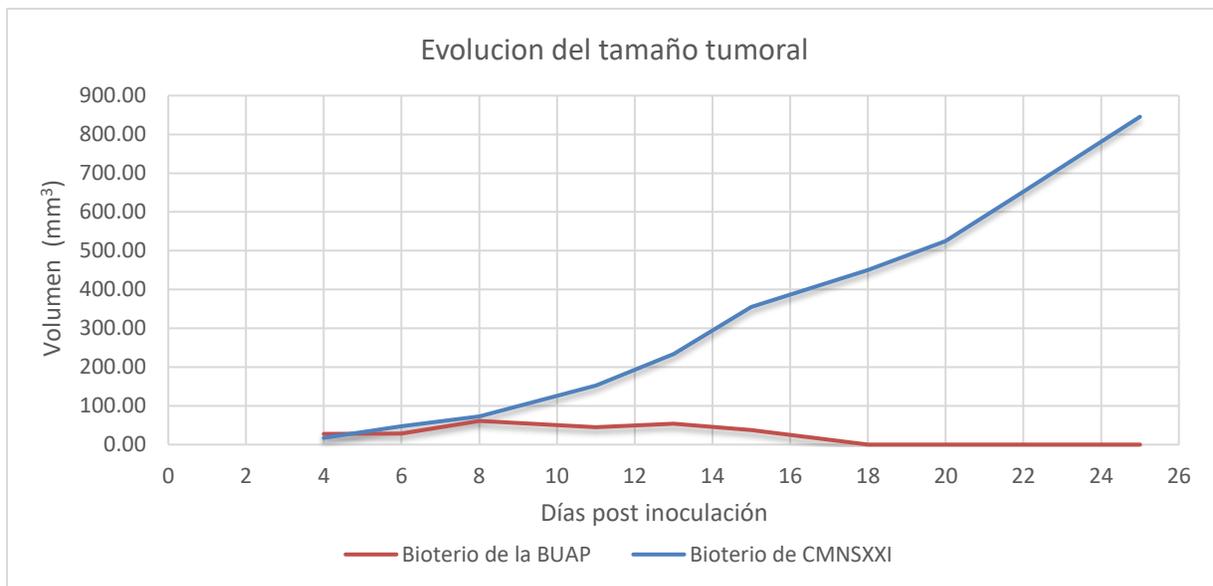


Figura 50. Evolución del tamaño tumoral en ratonas del bioterio de la BUAP y Centro médico inoculadas con  $100 \times 10^3$  células 4T1.

Por otro lado, el número de células implantadas parece ser un factor importante para el desarrollo de tumores generados en un modelo murino, lo cual se pone de manifiesto al analizar la gráfica de la figura 51, debido a que durante la generación del grupo de tumor con  $10 \times 10^4$  células 4T1. Se observó que el número de células inoculadas propició el desarrollo de necrosis en el área del tumor (figura 52), deteriorando el estado fisiológico del animal. Tomando en cuenta estos resultados, se decidió inocular un segundo grupo de ratonas BALB/c del CMNSXXI con sólo  $5 \times 10^4$  células 4T1, la mejora observada fue la ausencia de necrosis en 3 de las 4 ratonas inoculadas, no se observaron cambios conductuales como retraimiento en alguna zona de la caja, ni cambios en pelo, ojos u orejas que son los principales indicadores de sufrimiento.

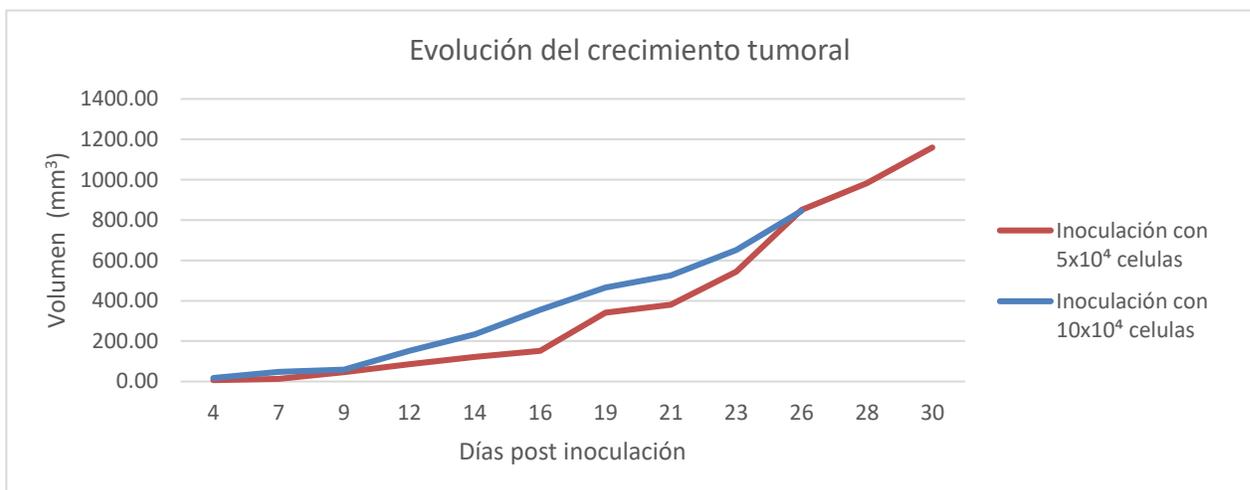


Figura 51. Evolución del tamaño tumoral en ratonas BALB/c obtenidas del bioterio de centro médico inoculadas con de  $5 \times 10^4$  y  $10 \times 10^4$  células 4T1.



Figura 52. Necrosis tumoral presentada en ratonas BALB/c inoculadas con  $10 \times 10^4$  células 4T1.  
Ratona con necrosis en tumor a los 25 días postinoculación

## 5.5. TFD en modelo murino

Se realizó un primer experimento en ratonas que fueron inoculadas con  $10 \times 10^4$  células 4T1, cuyo volumen tumoral oscilaba entre los 350 – 400 mm<sup>3</sup> en el día 15 postinoculación. Estas ratonas fueron sometidas a uno de los grupos de tratamiento propuestos (control sin interacción, control de AM, control de luz y TFD) en la sección 4.3.3.

Tabla 4. Volúmenes tumorales registrados de los grupos utilizados en TFD durante el 1er experimento

Días postratamiento	Control sin interacción		Control de AM		Control de luz		Tratado con TFD	
	Volumen (mm <sup>3</sup> )	Volumen (relativo)						
0	396.73	1	286.79	1	339.58	1	395.71	1
3	587.66	1.48	421.42	1.47	470.08	1.38	320.59	0.81
5	865.41	2.18	471.04	1.64	491.00	1.45	271.11	0.69
7	1048.60	2.64	661.41	2.31	510.89	1.50	386.91	0.98
10	1093.01	2.76	1033.90	3.61	813.05	2.39	441.76	1.12

La Tabla 4 y Figura 503, nos muestra la influencia que tiene cada una de las condiciones experimentales en el desarrollo del tumor. En el día 3, los controles de AM, luz y sin interacción presentaron un crecimiento similar, posterior a este día se observa una disminución en el tamaño de los tumores control de am y luz, sin embargo, al día siete en ambos se generó un repunte en el crecimiento. No obstante, el control de luz se mantiene por debajo del tamaño del tumor sin interacción. Sin embargo, es notorio el efecto que generó la TFD sobre el desarrollo tumoral, la TFD presentó una reducción del volumen tumoral inicial en los primeros 5 días postratamiento donde el tumor se redujo hasta los 271 mm<sup>3</sup>, en los días posteriores se observó un crecimiento, como resultado final se obtuvo que el desarrollo del

tumor tratado con TFD fue mucho menor ( $441 \text{ mm}^3$ ) que en el resto de los grupos que alcanzaron un volumen promedio de  $1000 \text{ mm}^3$ .

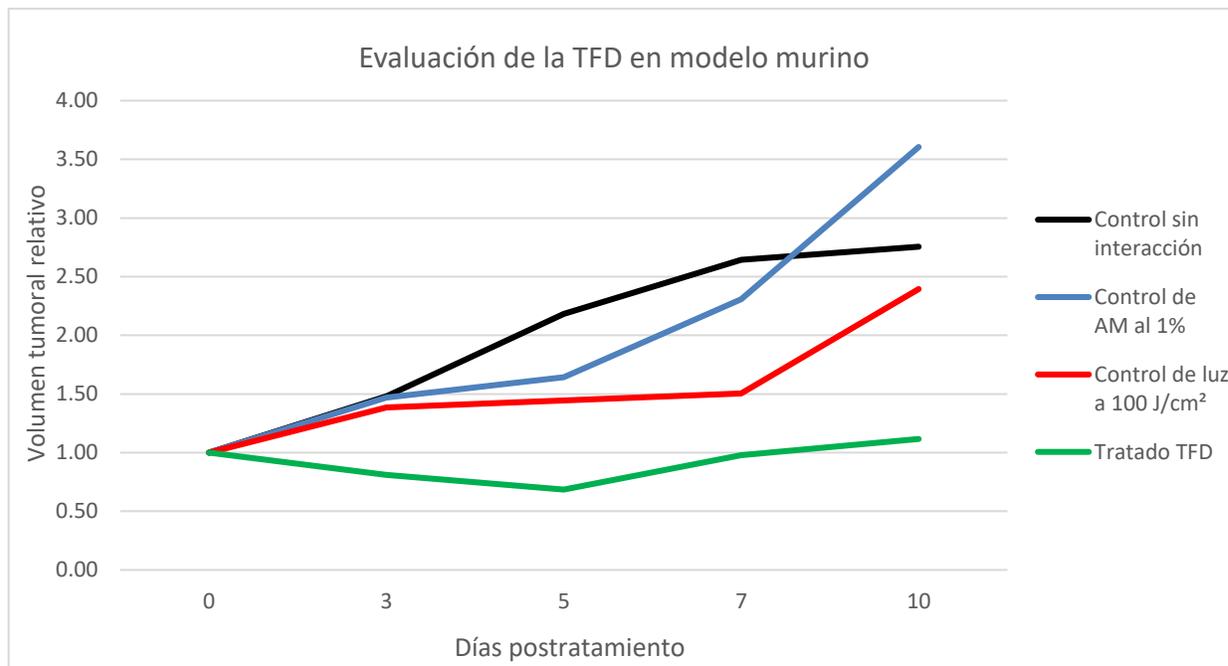


Figura 503. Evaluación del volumen tumoral en experimento de TFD en tumores de cáncer de mama generados por la inoculación de células 4T1 en ratonas BALB/c.

Estos resultados los podemos verificar en el collage de la figura 54, donde podemos observar el tamaño alcanzado de los tumores sometidos a las diferentes condiciones empleadas. El tumor no interaccionado (figura 54a) alcanzó un volumen de  $1034 \text{ mm}^3$  desarrollando necrosis tisular, el control de luz (figura 54b) alcanzó un volumen de  $813 \text{ mm}^3$ , mientras que el control de AM (figura 54c) alcanzó un volumen de  $1093 \text{ mm}^3$ , sin embargo, el tumor tratado con TFD (figura 54d) llegó a medir en el mismo lapso un volumen de  $414 \text{ mm}^3$ , el cual presentó una costra en la superficie del tumor.

Es importante mencionar que durante la aplicación de la terapia se presentaron zonas no teñidas con AM y fue justo en esas zonas donde tiempo después se observó nuevamente el crecimiento del tumor (flecha roja en la figura 54d).

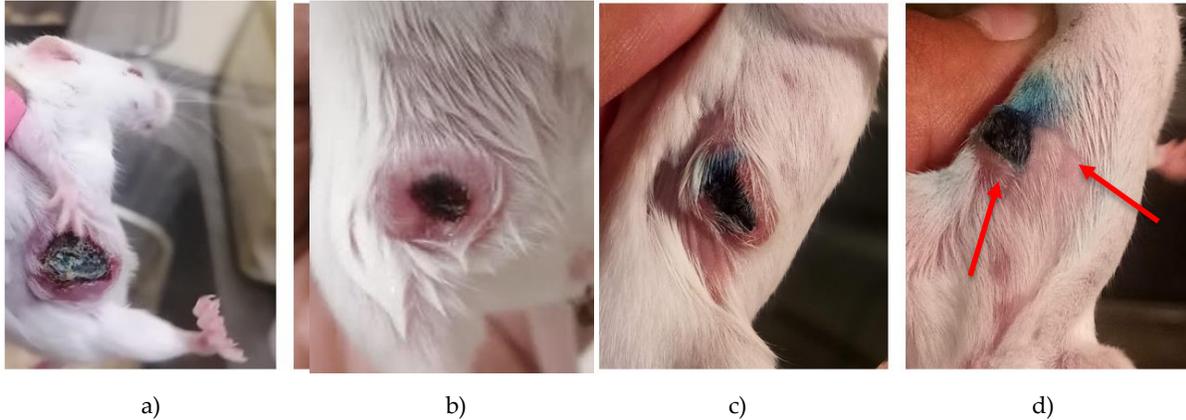


Figura 51. Evolución del tamaño tumoral con inoculación de  $50 \times 10^3$  células.  
a) Control sin interacción, b) Control de luz, c) Control de AM y d) TFD

## 5.6. Análisis de los parámetros involucrados en TFD

La observación de zonas sin teñir durante la aplicación de la TFD nos dejó claro que la infiltración homogénea del tumor con el FS es uno de los factores que influye en la eficacia de la TFD. Por tal motivo se iniciaron una serie de experimentos que permitieron verificar la aplicación del FS y la luz.

### 5.6.1. Infiltración del FS en el tumor

De inicio los tumores fueron infiltrados de forma manual en múltiples zonas, pero al realizar la disección se pudieron observar zonas internas sin teñir (Figura 525a). En otros tumores, el FS se aplicó en un solo punto de la zona central para después deslizar la aguja suavemente hacia varios puntos tratando de cubrir todo el tumor (Figura 525b) pero los resultados fueron similares al anterior, observándose que no se controlaba la presión ejercida sobre el embolo de la jeringa y en ocasiones se generaba pérdida del FS. Por tal motivo se decidió utilizar una bomba de infusión (Figura 525c) lo que mejoró la distribución del FS como se puede observar en la Figura 525d.

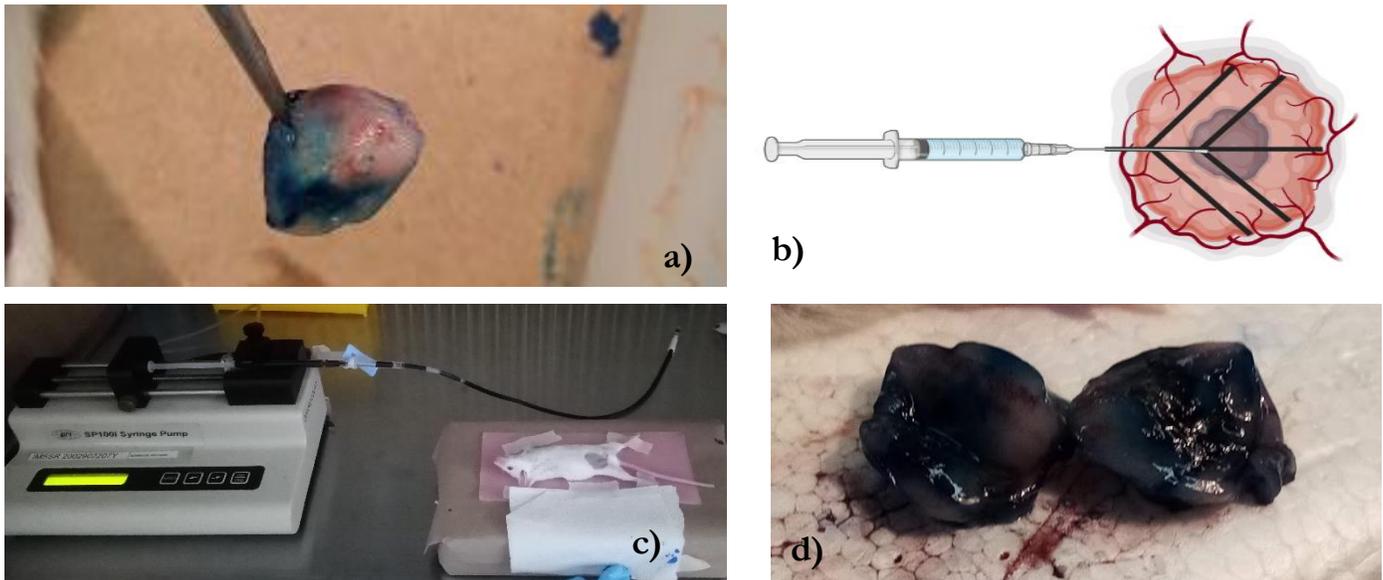


Figura 525. Diversos métodos de infiltración utilizados para administración de AM en tumores con volúmenes de  $100 \text{ mm}^3$ .

- a) Tumor infiltrado premodificación del método de infiltración, b) Método de infiltración, c) Aplicación de AM con bomba de infusión y d) Tumor infiltrado postmodificación del método de infiltración.

Por otro lado, el tiempo de contacto del FS con el tumor es un factor importante, pues a mayor tiempo de contacto la difusión es mejor, esto se pudo observar cuando dos tumores infiltrados bajo las mismas condiciones, pero extraídos a diferentes tiempos mostraron la pérdida de colorante en diferente proporción, lo cual se muestra en la Figura 7 donde se puede observar un tumor infiltrado e inmediatamente extraído (frasco A), que ha perdido rápidamente el colorante (solución con mayor intensidad de color), por el contrario el tumor que fue extirpado 30 min después de la infiltración (frasco B) presentó una mayor captación de AM y por lo tanto menos eliminación al ser colocado en formol.

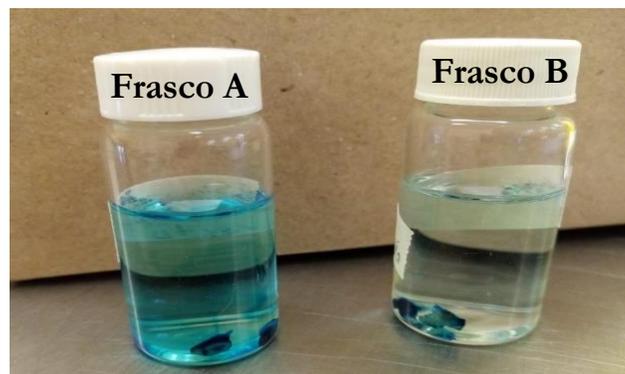


Figura 56. Prueba de tiempo de absorción del AM por las células del tumor.

### 5.6.2. Captación del AM por el tumor

El tamaño tumoral también es un factor importante, pues en tumores grandes se requerirá una mayor cantidad de FS para cubrir todo el volumen y el tiempo requerido para su difusión también será mayor, en la figura 57 se observa el resultado de sumergir un tumor en AM al 1% por un lapso de 16.5 h, esto nos permitió observar la proporción de FS que fue captado por el tumor, en estos resultados se muestra una difusión incompleta, debido a que en el centro del tumor no se observó tinción por AM.

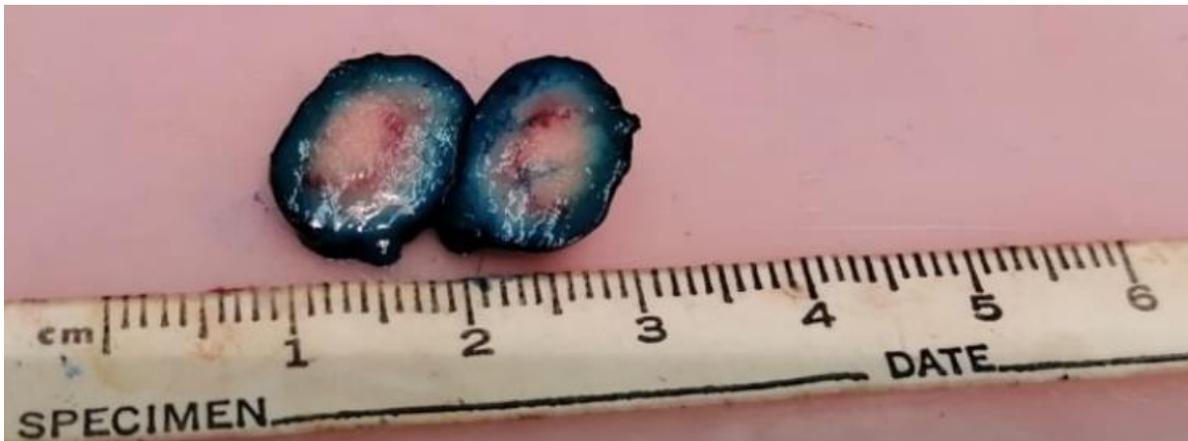


Figura 57. Corte longitudinal de tumor que fue inmerso en AM al 1% por 16.5 h.

### 5.7. Respuesta terapéutica de la TFD con condiciones de administración de FS y luz mejoradas

Después de analizar los resultados obtenidos de los estudios de infiltración, captación del FS y la dosis de luz mencionados en la sección 5.6, se llevaron a cabo nuevos experimentos de TFD y se evaluaron los efectos ocasionados.

Los resultados de los ensayos de TFD empleando las condiciones mejoradas tanto en la generación del modelo tumoral, el uso de un volumen tumoral de 80 mm<sup>3</sup> y la administración del FS y la luz mostraron que una mejora significativa en comparación con el experimento anterior tal y como se muestra en la figura 58 donde se observa el crecimiento de tumores sin necrosis al ser inoculadas con  $50 \times 10^3$  células (figura 58a y figura 58b). El tumor de la ratona

marcada como control de luz (figura 58c) presentó una costra sobre el área del tumor al igual que la ratona tratada con TFD (figura 58d), en esta última el tumor creció hacia la parte interna.

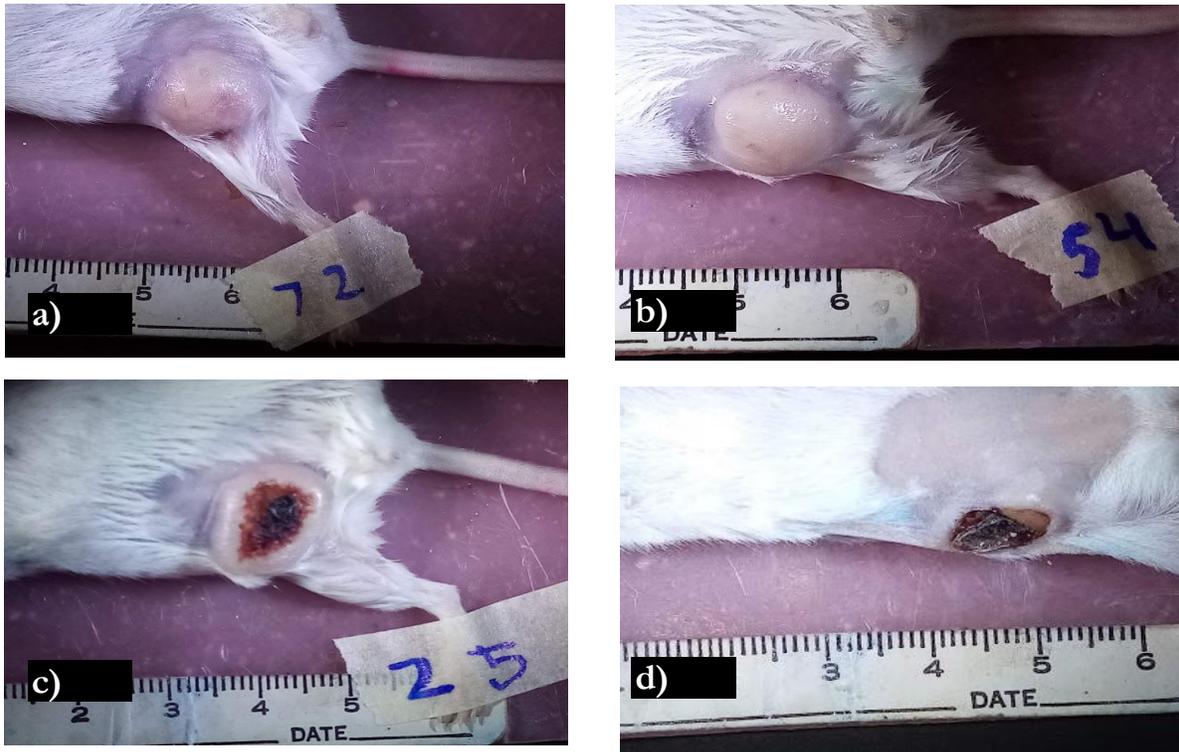


Figura 538. Ratonas empleadas en 2do experimento  
a) Control sin interacción, b) Control de AM, c) Control de luz y d) Tratada con TFD

La evolución del efecto fototóxico inducido por la TFD en tumores de cáncer de mama que fueron interaccionados con AM al 1% y luz se muestra en la Tabla 5, donde se puede observar que en los tumores donde solo se administró AM y luz no se indujo alguna citotoxicidad o inhibición en el crecimiento del tumor, llegando a un volumen final de  $1198 \text{ mm}^3$  y  $1188 \text{ mm}^3$  respectivamente, al igual que en el tumor no interaccionado que alcanzó un volumen final de  $1092.9 \text{ mm}^3$ .

Tabla 5. Volúmenes tumorales registrados de los grupos utilizados en TFD

Días postratamiento	Control sin interacción		Control de AM		Control de luz		Tratado con TFD	
	Volumen (mm <sup>3</sup> )	Volumen (relativo)						
0	82.5	1.00	80.1	1.00	79.5	1.00	81.6	1.00
1	143.3	1.73	85.3	1.06	108	1.35	151.4	1.85
2	200.6	2.43	132.9	1.65	158	1.98	126	1.54
5	302.6	3.66	403.8	5.04	274.1	3.44	332.2	4.07
7	368.6	4.46	446.5	5.57	369.2	4.64	271.7	3.32
9	602.5	7.30	520.8	6.50	511.2	6.43	217.6	2.66
12	733	8.88	873	10.89	670.2	8.43	390.7	4.78
14	914.2	11.08	1158.7	14.46	873	10.98	408.6	5.00
16	1092.9	13.24	1197.7	14.95	1188.1	14.94	455	5.57

El tumor sometido a TFD en los 2 primeros días postratamiento presentó una ligera disminución de 25 mm<sup>3</sup>, en el día 5 propuesto para una segunda aplicación se registró un incremento de tamaño tumoral de 206.2 mm<sup>3</sup>, mismo que se redujo al final del experimento alcanzando un volumen de 454 mm<sup>3</sup>, reducción significativa al compararse con el tamaño del tumor sin interacción (1093 mm<sup>3</sup>) y los controles de AM y luz. Gráficamente podemos ver el desarrollo de los tumores en la Figura 0, donde se presenta la normalización de los datos mostrados en la Tabla 5.

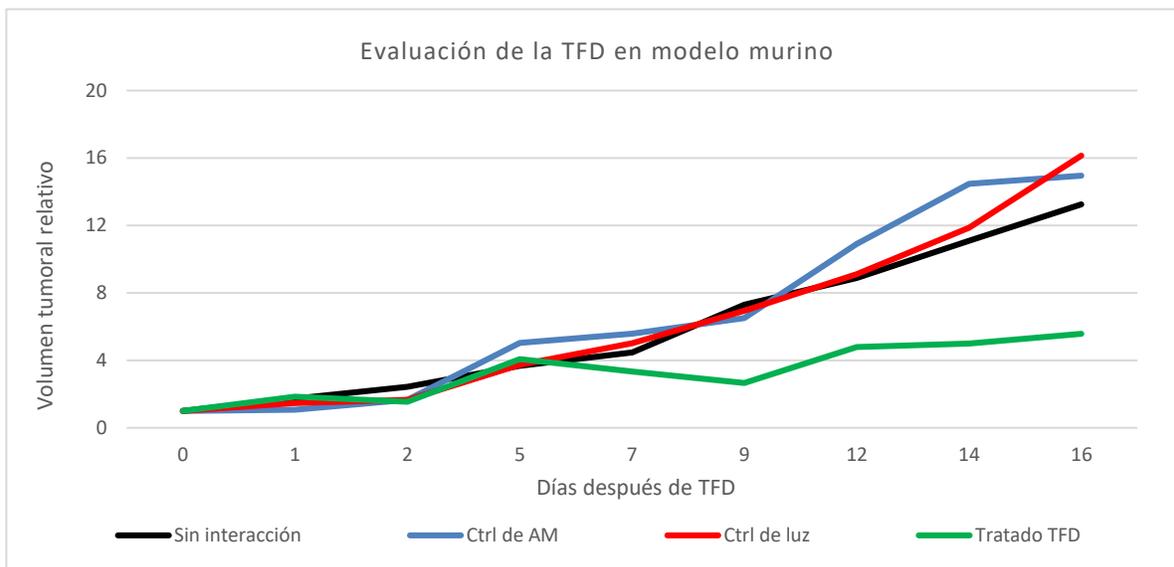


Figura 59. Seguimiento del crecimiento tumoral en ratones empleados durante el experimento de TFD en ratonas BALB/c con AM al 1% y 100 J/cm<sup>2</sup> de luz (Ctrl: Control).

Para confirmar estos resultados las ratonas fueron sacrificadas al alcanzar un volumen tumoral de 1000 mm<sup>3</sup> (el día 16 postratamiento), se extrajeron los tumores, se midieron y se compararon entre sí, tal y como se muestra en la Figura 6, se pueden observar los tumores extraídos de las ratonas empleadas en los experimentos de TFD, en donde se puede corroborar que los tumores de control crecieron un promedio de 14.78 veces más que su volumen inicial y el tumor tratado con TFD solo creció 5.5 veces en comparación a su volumen inicial.



Figura 60. Comparación del volumen tumoral final entre los diversos grupos utilizados. En esta imagen se observa la diferencia de tamaño entre los tumores control y el tumor tratado con TFD.

Tras extraer el tumor, también se extrajeron los órganos a los cuales las células cancerígenas 4T1 tienden a diseminarse como hígado, pulmón y cerebro (figura 61) con el propósito de analizarlos macroscópicamente en busca de señales de metástasis. Durante esta revisión se encontró que, en las 3 ratonas utilizadas en los diversos controles, se presentó esplenomegalia (agrandamiento del bazo). los cuales presentaron un bazo de mayor tamaño si se compara con la ratona tratada con TFD (Tabla 5). De igual forma en los pulmones (figura 62) se observaron hematomas y formación de nódulos (indicados con flechas rojas), los cuales se podrían considerar como signos de metástasis.

Tabla 6. Volumen del bazo registrados en los grupos utilizados en TFD.

Grupo	Longitud	Ancho	Volumen
Control sin interacción	2.4 cm	0.9 cm	1.0 cm <sup>3</sup>
Control de AM	2.6 cm	1.0 cm	1.3 cm <sup>3</sup>
Control de luz	2.3 cm	0.9 cm	0.9 cm <sup>3</sup>
Tratado con TFD	1.9 cm	0.7 cm	0.5 cm <sup>3</sup>

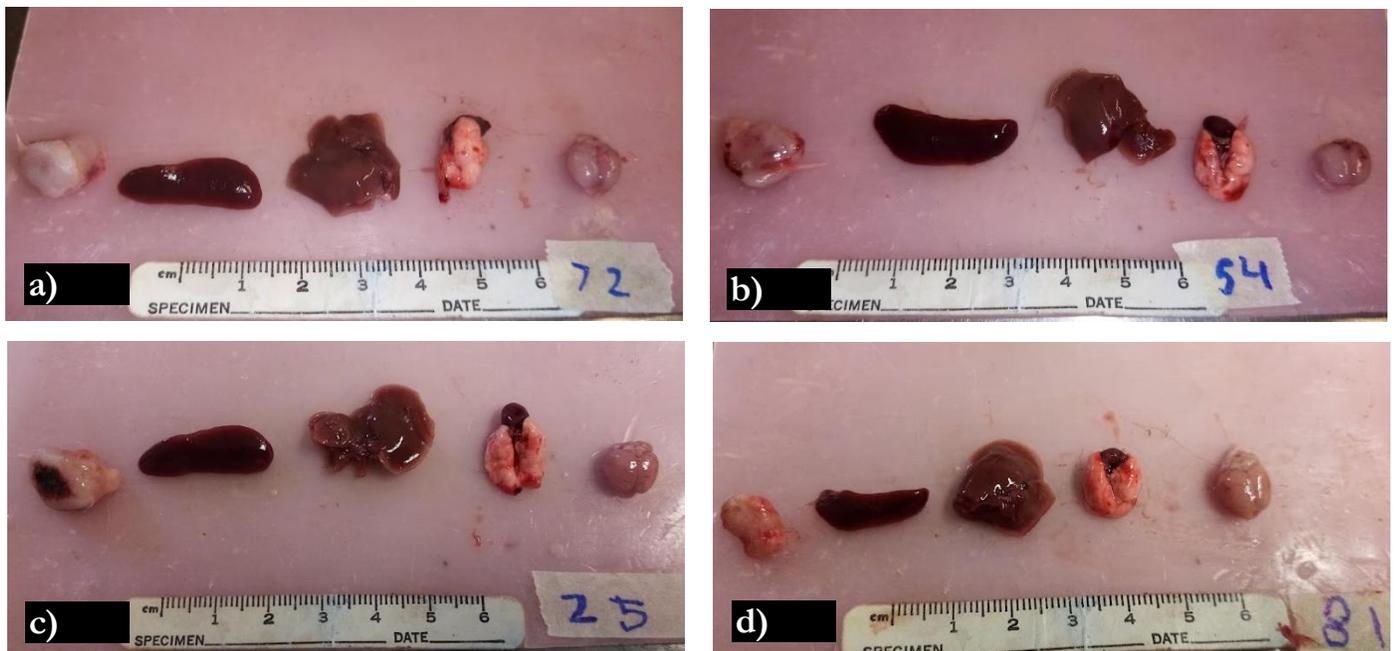


Figura 541. Órganos extraídos de las diferentes ratonas empleadas en el 2do experimento. En esta figura se puede observar (de derecha a izquierda) el tumor, el bazo, con una diferencia de tamaño notable en las ratonas control al compararse con la ratona tratada con TFD, el hígado, los pulmones y el cerebro. a) Control sin interacción, b) Control de AM al 1%, c) Control de luz a 100 J/cm<sup>2</sup> y d) Tratada con TFD empleando AM al 1% y 100 J/cm<sup>2</sup> de luz a roja.

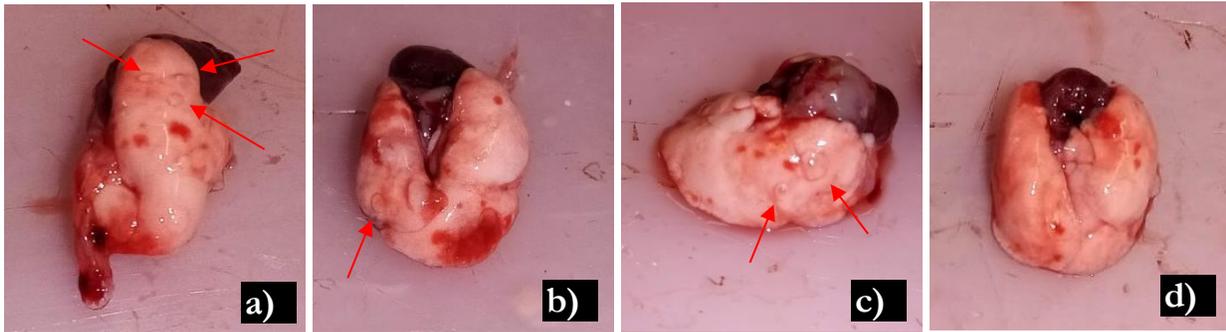


Figura 62. Pulmones extraídos de ratonas BALB/c a los 16 días después del experimento de TFD. Pulmones de ratona: Control sin interacción b) Control de AM al 1% c) Control de luz a 100 J/cm<sup>2</sup> y d) Tratada con TFD empleando AM al 1% y 100 J/cm<sup>2</sup> de luz roja. En esta figura se observaron nodulaciones en los diferentes pulmones de las ratonas control que no se observaron en la ratona tratada con TFD (flechas rojas).

# Capítulo 6

## Discusión



En esta tesis se reporta un trabajo integral que abarca desde el diseño y desarrollo de un sistema de irradiación basado el uso de LED's de alta potencia, el cual permite irradiar con potencia de 100 mW/cm<sup>2</sup>. Este dispositivo se empleó con el objetivo de reducir los errores humanos que puedan llegar a suceder durante el proceso de aplicación de la TFD, al mismo tiempo se consideró tener un control de usuarios con el propósito de agilizar los procesos de mantenimiento tanto preventivos como correctivos. Adicionalmente el diseño de modular de nuestro dispositivo permite el uso de LED's con diferentes longitudes de onda, esto gracias a que el irradiador fue diseñado como un elemento independiente que se puede remplazar o intercambiar sin realizar modificaciones al circuito electrónico del sistema, del mismo modo este diseño permite el uso de fibras ópticas gracias al uso de cabezales intercambiables que permiten el acoplamiento tanto a un difusor de acrílico como el acoplamiento a fibras ópticas, estas características permiten destacar nuestra fuente de las que se emplean en la actualidad.

El sistema de irradiación desarrollado se basa en el uso de la tecnología LED de alta potencia la cual permite emular los parámetros de potencia empleados las fuentes de luz laser y de diodo laser que se emplean en la actualidad, un ejemplo de esto es la fuente Atilite CL-16, la cual cuenta con una potencia óptica de 70 – 100 mW y una única longitud de onda de emisión que se encuentra en el rango de los 630 nm (Boucher, 2011a; Mordon et al., 2020). Por otro lado, el equipo de trabajo del Dr. Suren Stolik del Instituto Politécnico Nacional se ha encargado de desarrollar distintos sistemas de irradiación de los cuales también han empleado el uso de la tecnología LED de alta potencia para su funcionamiento (Hernandez-Quintanar et al., 2011). En comparación, la mejora que se presenta en nuestro dispositivo desarrollado es la reducción de los costos de adquisición y mantenimiento debido a que se utilizó un microcontrolador de Arduino en lugar de un PIC en combinación con una interfaz desarrollada en LabVIEW, lo que implica que en caso de un fallo del funcionamiento sea más fácil desmontar el microcontrolador y remplazarlo, ya que toda la programación se encuentra en la interfaz, en comparación con el PIC, el cual se debe programar de forma independiente y después instalarlo en el circuito impreso. Otra ventaja que ofrecer este dispositivo es la



capacidad de utilizar LED's de diferentes longitudes de onda debido al desarrollo independiente del controlador e irradiador.

En un inicio se consideró que este sistema de irradiación tuviera la capacidad de emplearse con fibras ópticas. Sin embargo, durante el desarrollo no se tomó en cuenta la eficiencia de acoplamiento o eficiencia de transmisión, es decir la relación entre la potencia acoplada a la fibra óptica y la potencia emitida por la fuente, esto presentó un problema debido a que se genera una pérdida significativa del 46% de la potencia suministrada por el LED, la cual no podría generar una dosis de luz adecuada para TFD dentro del periodo de tiempo permitido por el efecto de la anestesia en las ratonas (alrededor de 1 hora) (Mudarra & Pastor Alberto, 2011) ya que se requiere de 30 min de incubación y 75 min de irradiación, por lo tanto se decidió solo utilizar la irradiación superficial para obtener las mejores condiciones posibles en el tratamiento con TFD.

Por otro lado, la investigación de la TFD mediada con AM ha demostrado la efectividad de este FS en el estudio de diversas líneas celulares de cáncer como de melanoma maligno, osteosarcoma, cáncer de mama humano, adenocarcinoma de células de pulmón y escamosas (J et al., 2014; Obstoy et al., 2016b). Con la finalidad de avanzar en el estudio de este FS en modelos animales se propuso el estudio de una línea celular de cáncer de mama murino, la cual se denomina 4T1, se ha estudiado por diversos autores en quienes emplean el uso de nanopartículas, con propósito de transportar los FS's a las células diana con mayor eficiencia, como lo ha demostrado (Rong et al., 2014), al emplear nanopartículas de grafeno para transportar el FS 2- (1-hexiloxietil) -2-devinil pirofeofórbido-alfa (Photochlor) en donde solo con el FS logró una reducción en la viabilidad del 30% y en combinación con las nanopartículas se generó una reducción de la viabilidad celular del 80%.

De igual forma se puede encontrar el trabajo de (Khanal et al., 2014) quienes desarrollaron microgeles biocompatibles basados en N-isopropilacrilamida para transportar y reducir la dosis de AM, este microgel fue diseñado con la propiedad de ser termosensible, pues al ser irradiados tienden a sufrir un incremento en la temperatura y liberan el FS. Sus resultados

demonstraron que el microgel, mejoró la eficacia de la TFD más que la del AM libre ya que se logró inhibir el 80% de la viabilidad de las células MCF-7 con solo 14  $\mu\text{M}$  de AM. No obstante, es importante considerar que el estudio de la TFD en esta línea celular no se ha reportado con el uso único del AM como FS.

Estudios previos a este trabajo (Atenco Cuautle et al., 2019; Pérez Pérez et al., 2021) mostraron que el AM a una concentración de 20  $\mu\text{M}$  y una dosis de luz de 10  $\text{J}/\text{cm}^2$ , reducían la viabilidad de células MDA-MB231 (cáncer de mama humano) en un 60% con respecto a células MCF10A (de mama no tumorales), estos resultados dieron la pauta para continuar con el estudio de este FS aplicado sobre tumores de mama generados en un modelo murino. En este trabajo se pudo observar que la combinación de la dosis de luz a 40  $\text{J}/\text{cm}^2$  y una concentración de 10 y 20  $\mu\text{M}$  de AM, generaban una mayor respuesta citotóxica sobre la línea celular 4T1. Lo cual es una aportación importante ya que no se ha reportado el uso de AM en TFD con la línea celular 4T1.

Si bien no se determinaron los mecanismos de la disminución de la viabilidad celular. el análisis de los cambios morfológicos de los cultivos celulares expuestos a cada uno de los componentes de la TFD y de la TFD misma, nos orientó a concluir que dichos cambios son compatibles con la muerte celular por apoptosis, debido a la presencia de indicadores de característicos de este tipo de muerte celular (pérdida de interacción tanto célula-célula, citoplasma-núcleo y célula-substrato, formación de grandes protuberancias en la superficie de la célula y la presencia de cuerpos apoptóticos). Lo cual se pudo generar debido a que el AM se une a las mitocondrias y al ser irradiadas se genera  $^1\text{O}_2$ , lo cual induce la permeabilización de la membrana mitocondrial, despolarización e hinchazón de la membrana interna, provocando la liberación de moléculas de señalización de apoptosis (citocromo c, factor inductor de apoptosis (AIF), SMAC/DIABLO) al citosol, lo que conlleva a la formación del apoptosoma, el cual activa las caspasas responsables de la apoptosis (E. J. Lim et al., 2013; Tardivo et al., 2005). Sin embargo, es importante considerar que otros autores han mencionado que el uso de altas dosis de luz (30 – 100  $\text{J}/\text{cm}^2$  dependiendo de la longitud de onda) al



interactuar con los cultivos celulares puede inactivar proteínas celulares o generar un efecto directo sobre la membrana celular, induciendo la muerte celular por necrosis (A. F. dos Santos et al., 2017b).

Por lo cual diversos estudios han concluido que el tipo de muerte celular que se induce por la TFD se ve influida por la línea celular y las dosis empleadas (Wyld et al., 2001). La evaluación del efecto de la TFD en la línea celular 4T1, permitió verificar si la TFD efectivamente era capaz de generar un efecto citotóxico sobre estas células y continuar entonces con su evaluación en tumores generados en un modelo murino. Lo cual nos permitió extrapolar los aspectos de esta enfermedad y evaluar la respuesta terapéutica de la TFD en ratones.

En el desarrollo de este trabajo pudimos observar que el uso de la TFD implica un análisis cuidadoso de todas las posibles variables como similitud del fondo genético entre la línea celular y la cepa de animales la cual es vital para el desarrollo tumoral, de lo contrario se generara un rechazo inmunológico impidiendo el desarrollo tumoral (Barrera et al., n.d.). En este proyecto nos enfrentamos a este problema debido a que la cepa de ratón Balb/c adquirida del bioterio "Claude Bernard" de la BUAP posiblemente no contenía las mismas características genéticas que la línea celular 4T1, ya que a partir del día 8 se mostró un rechazo de los tumores implantados lo que llevó a la remisión de estos, así como lo han reportado (Barrera et al., n.d.; Garrido, n.d.; Velásquez et al., 2014; *Vigilancia Inmunológica Contra Los Tumores*, n.d.).

Al utilizar ratones con las características genéticas similares a la línea celular 4T1, se generó el modelo tumoral siguiendo la metodología reportada por Pularki (BA & S, 2001). Sin embargo, es importante considerar que el número de células a utilizar depende del tiempo en el que se desea trabajar el tumor, ya que se ha observado que con un mayor número de células los tumores crecen en un periodo de tiempo corto (Alejandro Sandoval et al., 2013) que les permitió alcanzar un tamaño difícil de emplear para TFD. Este trabajo permitió establecer las condiciones óptimas para la estandarización del modelo tumoral de cáncer de mama, debido



a que se determinó el número de células adecuadas para la inoculación con la finalidad de trabajar con tumores de  $80 \text{ mm}^3$ , reduciendo la presencia de necrosis en los tumores.

Con respecto al estudio de la TFD-AM en modelos murinos se pueden encontrar estudios como el desarrollado por (Orth et al., 2000) donde estudiaron el efecto del FS AM en una dilución al 1% que fue administrada de manera intratumoral, posteriormente el tumor fue irradiado con una dosis de luz de  $100 \text{ J/cm}^2$ . Los tumores empleados en dicho estudio fueron seleccionados al alcanzar un volumen de  $400 \text{ mm}^3$ , siendo este un modelo tumoral singénico-heterotópico de cáncer colorrectal. Entre los resultados de este estudio se menciona que la TFD generó una remisión total del tumor a partir de la 2da semana postratamiento, en donde las ratonas tratadas con TFD se consideraron curadas a la 3ra semana después de la remisión.

Dichos resultados se trataron de migrar al modelo tumoral empleado en esta tesis. Sin embargo, no se lograron igualar a pesar de que se utilizó un volumen tumoral 5 veces menor al empleado por Orth. Esto se pudo ver influido tanto por el tipo de cáncer y el tipo de modelo que se empleó, ya que en nuestro trabajo se generó un modelo singénico-ortotópico a diferencia del reportado en Orth et quien empleo un modelo alogénico-heterotópico. Sin embargo, nuestros resultados presentan similitudes a los presentados en el trabajo de (Lemos et al., 2016), donde emplea el uso de TFD mediada con ftalocianina de zinc tetrasulfonada para tratar tumores alogénicos-heterotópicos generados con células A431 (Carcinoma invasivo de células escamosas humanas). En dicho estudio se observó una reducción del tumor en los primeros 5 días postratamiento, posteriormente se observó un ligero crecimiento del tumor hasta triplicar su tamaño en el día 15 postratamiento, pero manteniendo una diferencia significativa con los tumores control, cuya respuesta similar también se presenta en el trabajo de (Li et al., 2017) en donde se reporta un retraso significativo en el crecimiento tumoral entre los tumores control los cuales alcanzaron un volumen 7.25 veces mayor al volumen inicial en el día 28 postratamiento, mientras los tratados con TFD solo crecieron un promedio de 3.24 veces más en comparación con el volumen inicial.

Los estudios *in vitro* y en modelo murino realizados en esta tesis permitieron incrementar el conocimiento del efecto de la TFD al emplear AM. Con anterioridad el AM ya se había empleado en diversas neoplasias, sin embargo, no se encontraron reportes con el solo uso de AM en la línea celular 4T1. La Tabla 7 presenta artículos los cuales mencionan el uso de AM en TFD con las células 4T1. Sin embargo, los estudios reportados hasta el momento hablan del uso de nanopartículas para el transporte del AM.

Tabla 7. Estudios de TFD-AM en células 4T1

Referencia	Tipo de estudio	FS	Resultado
(M. S. C. dos Santos et al., 2018)	<i>in vitro e in vivo</i>	Nanopartículas de óxido de grafeno cargadas con AM	El tratamiento con terapias combinadas TFD / PTT usando NanoGO-MB indujo más toxicidad en las células del carcinoma de mama que en las células normales. In vivo, las terapias combinadas promovieron la ablación completa del tumor y la prevención de la metástasis, mientras que solo la TFD o la PTT no pudieron detener el desarrollo del tumor.
(Wu et al., 2018)	<i>in vitro</i>	Liposomas encapsulados con azul de metileno	El uso de liposomas encapsulados AM a una concentración de 8 $\mu$ M, genero una reducción de la viabilidad celular del 100 % al compararse con las celulas control.
(Zhai et al., 2018)	<i>in vitro</i>	Nanovesícula con caparazón derivado de la membrana celular y un núcleo de nanogel cargado con AM y cisplatino	Los resultados mostraron una liberación de la toxina intracelular específica del tumor y desencadenada por estímulos con ventajas en la acumulación y activación rastreables, alta penetración del tumor y terapia de combinación triple, y por lo tanto puede ser una nanomedicina eficaz para combatir el cáncer de mama metastásico.

# Capítulo 7

## Conclusiones

## 7.1. Conclusiones

- El sistema de irradiación desarrollado para la aplicación de la TFD permite irradiar áreas de 1 cm<sup>2</sup> con una potencia de 100 mW, con un rango de longitud de onda de 650 – 700 nm, presentando un pico máximo de emisión en 670 nm. De igual forma, el software desarrollado permitió determinar los tiempos de irradiación a partir de la dosis deseada.
- La prueba de captación del FS *in vitro*, permitió demostrar la capacidad del AM para infiltrarse en las células de cáncer de mama 4T1, donde se observó una mayor concentración del FS al emplear la dosis de 20 µM.
- El efecto citotóxico generado por los estudios *in vitro* de la TFD en células 4T1 con 10 y 20 µM de AM y con dosis de luz de 40 J/cm<sup>2</sup>, causaron una pérdida significativa en la viabilidad celular del 72.9% y del 96.7% respectivamente, al compararse con el grupo de células control que no fueron interaccionada con FS ni con luz.
- El análisis morfológico de la línea celular 4T1 mostró la pérdida de interacción tanto célula-célula, célula-substrato y pérdida de la relación citoplasma-núcleo ya que se observaron espacios libres en la monocapa y la presencia de cuerpos apoptóticos, en los grupos tratados con TFD (10 y 20 µM de AM y con dosis de luz de 40 J/cm<sup>2</sup>) a las 24 h después de haber aplicado el tratamiento.
- En este trabajo no solo se comprobó el efecto citotóxico y terapéutico que se genera al fotoactivar el AM para el tratamiento del cáncer de mama con la línea celular 4T1, sino que también se estableció el protocolo para la aplicación de la TFD en modelo murino la cual no ha sido reportado en la literatura.
- El uso de 100 x10<sup>3</sup> células 4T1 para la generación de los modelos de cáncer favoreció la aparición de necrosis en el área de los tumores, en comparación con el uso de 50x10<sup>3</sup> células, donde la mayoría de los tumores no presentaron necrosis. De igual manera,

las ratonas inoculadas con  $50 \times 10^3$  células 4T1 presentaron un tiempo de desarrollo tumoral que permitió el manejo de volúmenes pequeños (60-80 mm<sup>3</sup>).

- La aplicación de la TFD en el modelo murino mostró un retraso del 63% en el crecimiento de los tumores tratados con AM al 1% y 100 J/cm<sup>2</sup> de luz roja en comparación con las ratonas control.
- Los pulmones y el bazo extraídos de las ratonas tratadas con TFD no presentaron signos macroscópicos de metástasis en comparación con las ratonas empleadas en los distintos controles que presentaron nodulaciones en los pulmones y esplenomegalia.

## **7.2. Trabajo futuro**

La TFD-AM como tratamiento para el cáncer de mama, es un tema multidisciplinario complejo que da lugar a mucho material de investigación y los resultados obtenidos en este trabajo de tesis abre el camino al grupo de trabajo para continuar con investigación de TFD en la línea celular 4T1, donde en un futuro se podrán investigar a fondo los mecanismos de muerte celular acompañados del uso de diversas dosis de luz y de FS que permitirán comprender de mejor manera la respuesta citotóxica de este tratamiento. Por tal motivo, se enlistan diversas propuestas que dan continuación al desarrollo y mejora de este proyecto.

Estudios *in vitro*:

- Estudio de la muerte celular generada por la TFD-AM en la línea celular 4T1 por medio de tinción de giemsa, western blot, citometría de flujo.
- Evaluación de la actividad celular postratamiento (24 h, 48 h y 72 h).
- Medición de las especies reactivas de oxígeno y/u oxígeno molecular singulete generados.

Estudios en animales:

- Análisis de los cortes histológicos del tejido de tumor y tejidos circundantes.



- Aplicación de la TFD intersticial.
- Análisis y evaluación del efecto de la TFD con AM por administración intravenosa.

Dispositivo para aplicación *in vitro*:

- Desarrollo de un dispositivo automatizado conformado de una matriz de 12 LED's, cuya potencia óptica promedio sea de 50 mW, que permita elegir los pozos a utilizar.

Dispositivo para aplicación en ratones:

- Implementación de una pantalla touch que permita utilizar el dispositivo sin la necesidad de una computadora.
- Diseño y desarrollo de un sistema óptico que permita un acoplamiento eficiente a fibras ópticas.
- Implementación de un fotodiodo para la calibración de potencia del dispositivo.
- Desarrollo de una simulación Monte Carlo sobre la geometría de irradiación.

# Referencias

- Abdel-kader, M. H. (2016). *CHAPTER 1. The Journey of PDT Throughout History: PDT from Pharos to Present* (pp. 1–21). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781782626824-00001>
- Age standardized (World) incidence rates, breast, all ages.* (n.d.). <https://doi.org/10.8>
- Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Hahn, S. M., Hamblin, M. R., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B. C., & Golab, J. (2011). Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(4), 250–281. <https://doi.org/10.3322/caac.20114>
- Alejandro Sandoval, T., Urueña, C., & Fiorentino, S. (2013). Estandarización de una metodología para la obtención Y caracterización de células madre tumorales en el modelo murino 4T1. *Revista Colombiana de Cancerología*, 17(4), 175. [https://doi.org/10.1016/S0123-9015\(13\)70187-2](https://doi.org/10.1016/S0123-9015(13)70187-2)
- Allervato, M. A. (2006). TERAPIA FOTODINÁMICA. In *Act Terap Dermatol* (Vol. 29). [http://www.atdermae.com/pdfs/atd\\_29\\_05\\_01.pdf](http://www.atdermae.com/pdfs/atd_29_05_01.pdf)
- Allison, R. R., Downie, G. H., Cuenca, R., Hu, X. H., Childs, C. J. H., & Sibata, C. H. (2004). Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1(1), 27–42. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(04\)00007-9](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(04)00007-9)
- AP, S., CL, N., EDA, S., TCL, P., RS, I., B, C., D, S., MDS, B., MLZ, D., FJH, B., & JRMCD, S. (2018). Effects of methylene blue-mediated photodynamic therapy on a mouse model of squamous cell carcinoma and normal skin. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 23, 154–164. <https://doi.org/10.1016/J.PDPDT.2018.06.012>
- Arias, G. A. M., Luna, A. E., Delgadillo, A. A., Camps-Fresneda, A., & Arias, G. M. (2007). Terapia fotodinámica. *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*, 6, 255–268. <https://www.medigraphic.com/pdfs/cutanea/mc-2007/mc076b.pdf>
- Aspiroz, C., Sevil, M., Toyas, C., & Gilaberte, Y. (2017). Terapia fotodinámica con azul de metileno en úlceras cutáneas infectadas con *Pseudomonas aeruginosa* y *Fusarium* spp. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 108(6), e45–e48. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2016.11.020>
- Atenco Cuautle, J. C., Spezzia Mazzocco, T., & Delgado López, M. G. (2019). *Evaluación de la terapia fotodinámica en líneas celulares de cáncer de mama con los fotosensibilizadores azul de metileno y rosa de bengala.* <https://inaoe.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1009/1777>
- BA, P., & S, O.-R. (2001). Mouse 4T1 breast tumor model. *Current Protocols in Immunology*, Chapter 20(1). <https://doi.org/10.1002/0471142735.IM2002S39>
- Barrera, R., Peralta, O., & Madrid Vicente. (n.d.). *Vista de Bases moleculares de la inmunología del cáncer | Salud Pública de México.* Retrieved September 21, 2021, from [https://saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/5855/6570?\\_\\_cf\\_chl\\_jschl\\_tk\\_\\_=pmd\\_s38MR9QP7lzzr2CV72jVYJid.uDNRy1CXyKld.YnBF8-1631835423-0-gqNtZGzNAfujcnBszQeR](https://saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/5855/6570?__cf_chl_jschl_tk__=pmd_s38MR9QP7lzzr2CV72jVYJid.uDNRy1CXyKld.YnBF8-1631835423-0-gqNtZGzNAfujcnBszQeR)
- Blass, N., & Fung, D. (1976). Dyed but not dead: methylene blue overdose. *Anesthesiology*, 45(4), 458–459. <https://doi.org/10.1097/0000542-197610000-00020>

- Boucher, D. (2011a). The tools of PDT: light sources and devices. Can they help in getting better therapeutic results? *AIP Conference Proceedings*, 1364(1), 73. <https://doi.org/10.1063/1.3626915>
- Boucher, D. (2011b). The tools of PDT: Light sources and devices. Can they help in getting better therapeutic results? *AIP Conference Proceedings*, 1364(1), 73–86. <https://doi.org/10.1063/1.3626915>
- Brancaleon, L., & Moseley, H. (2002). Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers in Medical Science*, 17(3), 173–186. <https://doi.org/10.1007/s101030200027>
- Brandan, M. E., & Navarro, Y. V. (2006). Detección del Cáncer de Mama: Estado de la Mamografía en México. In *Cancerología* (Vol. 1).
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2021, November). *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA: A Cancer Journal for Clinicians; Wiley. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21492>
- Calzavara-Pinton, P. (2001). *Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnosis in Dermatology* (1st ed., Vol. 2). Elsevier Science.
- Cáncer. (n.d.). Retrieved October 11, 2020, from <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Cancer>
- Cáncer de mama - Diagnóstico y tratamiento - Mayo Clinic. (n.d.). Retrieved October 24, 2020, from <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/breast-cancer/diagnosis-treatment/drc-20352475>
- Cáncer mañana. (n.d.). Retrieved October 15, 2020, from [https://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-isotype?type=1&type\\_sex=0&mode=population&sex=2&populations=484&cancers=20&age\\_group=value&apc\\_male=0&apc\\_female=0&single\\_unit=1000&print=0#collapse-by\\_country](https://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-isotype?type=1&type_sex=0&mode=population&sex=2&populations=484&cancers=20&age_group=value&apc_male=0&apc_female=0&single_unit=1000&print=0#collapse-by_country)
- Capella, M. A. M., & Capella, L. S. (2003). A light in multidrug resistance: Photodynamic treatment of multidrug-resistant tumors. *Journal of Biomedical Science*, 10(4), 361–366. <https://doi.org/10.1007/bf02256427>
- Chen, Y., Zheng, W., Li, Y., Zhong, J., Ji, J., & Shen, P. (2008). Apoptosis induced by methylene-blue-mediated photodynamic therapy in melanomas and the involvement of mitochondrial dysfunction revealed by proteomics. *Cancer Science*, 99(10), 2019–2027. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00910.x>
- Clifton, J., & Leikin, J. B. (2003). Methylene blue. In *American journal of therapeutics* (Vol. 10, Issue 4, pp. 289–291). Am J Ther. <https://doi.org/10.1097/00045391-200307000-00009>
- Corral, L. (n.d.). *Tomografía óptica difusa por transiluminación*.
- Daniell, M. D., & Hill, J. S. (1991). *A History of Photodynamic Therapy*. 61, 340–348. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-39629-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-39629-8_1)
- de Jesús-Monge, W. E. (n.d.). *El ratón como base de modelos de cáncer humano: una valiosa herramienta en investigación oncológica*.
- Definición de glándula mamaria. (n.d.). Retrieved October 11, 2020, from <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/glandula-mamaria>
- Del valle, ramiro, perez, miguel, ortiz, juan, ruiz, salvador, de anda, salvador, jaramillo, josé, martínez, manuel, corona, roberto, vivas, ingrid, facha, ma. teresa, olmos, rosario, arrieta, arturo, bizarrete, karla, diaz, carlos, & estrada, josué. (2004). medición volumétrica estereotáxica no invasiva vs volumetría geométrica para la

- indicación y evaluación de los tratamientos con radiocirugía. *archivos de neurociencias (mexico, d.f.)*, 9(1), 14-17. recuperado en 20 de abril de 2022, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=s0187-47052004000100004&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0187-47052004000100004&lng=es&tlng=es).
- Disanto, A. R., & Wagner, J. G. (1972). Pharmacokinetics of highly ionized drugs II: Methylene blue—absorption, metabolism, and excretion in man and dog after oral administration. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 61(7), 1086–1090. <https://doi.org/10.1002/jps.2600610710>
- dos Santos, A. F., Terra, L. F., Wailemann, R. A. M., Oliveira, T. C., de Moraes Gomes, V., Mineiro, M. F., Meotti, F. C., Bruni-Cardoso, A., Baptista, M. S., & Labriola, L. (2017a). Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells. *BMC Cancer*, 17(1), 194. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3179-7>
- dos Santos, A. F., Terra, L. F., Wailemann, R. A. M., Oliveira, T. C., de Moraes Gomes, V., Mineiro, M. F., Meotti, F. C., Bruni-Cardoso, A., Baptista, M. S., & Labriola, L. (2017b). Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells. *BMC Cancer*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3179-7>
- dos Santos, M. S. C., Gouvêa, A. L., de Moura, L. D., Paterno, L. G., de Souza, P. E. N., Bastos, A. P., Damasceno, E. A. M., Veiga-Souza, F. H., de Azevedo, R. B., & Bão, S. N. (2018). Nanographene oxide-methylene blue as phototherapies platform for breast tumor ablation and metastasis prevention in a syngeneic orthotopic murine model. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/S12951-018-0333-6>
- Factores de riesgo del cáncer de mama*. (n.d.). Retrieved October 15, 2020, from <https://www.breastcancer.org/es/riesgo/factores>
- Fda, & Cder. (n.d.). *HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION*. Retrieved November 22, 2020, from [www.fda.gov/medwatch](http://www.fda.gov/medwatch).
- Ferriols Lisart, F., & Pitarch Molina, J. (2004). Principios de la fototerapia y su aplicación en el paciente oncológico. *Farmacia Hospitalaria*, 28(3), 205–213. <https://medes.com/publication/14437>
- Fitzpatrick, T. B., & Pathak, M. A. (1959). *Part IV: Basic Considerations of the Psoralens: Historical Aspects of Methoxsalen and Other Furocoumarins*. <https://doi.org/10.1038/jid.1959.40>
- Garrido, F. (n.d.). *Respuesta inmune y cáncer*.
- Giannelli, M., & Bani, D. (2018). Appropriate laser wavelengths for photodynamic therapy with methylene blue. In *Lasers in Medical Science* (Vol. 33, Issue 8, pp. 1837–1838). Springer London. <https://doi.org/10.1007/s10103-018-2566-x>
- Grille, S. J., Bellacosa, A., Upson, J., Klein-Szanto, A. J., van Roy, F., Lee-Kwon, W., Donowitz, M., Tschlis, P. N., & Larue, L. (2003). The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. *Cancer Research*, 63(9), 2172–2178.
- Guan, J., Lai, X., Wang, X., Leung, A. W., Zhang, H., & Xu, C. (2014). Photodynamic action of methylene blue in osteosarcoma cells in vitro. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 11(1), 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2013.09.003>
- Hamblin, M. R., & Huang, Y. Y. (2013). Handbook of photomedicine. In *Handbook of Photomedicine*. <https://doi.org/10.1201/b15582>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. In *Cell* (Vol. 144, Issue 5, pp. 646–674). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

- Hernandez-Quintanar, L., Stolik, S., & de La Rosa, J. M. (2011). Development of an irradiation system for photodynamic therapy with dosimetric control. *CONIELECOMP 2011 - 21st International Conference on Electronics Communications and Computers, Proceedings*, 34–38. <https://doi.org/10.1109/CONIELECOMP.2011.5749334>
- Hernández-Quintanar, L., Stolik, S., & de La Rosa, J. M. (2012). Experimental tests in tissue phantoms of a photoirradiation system with optical dosimetry for photodynamic therapy. *CONIELECOMP 2012 - 22nd International Conference on Electronics Communications and Computing*, 45–49. <https://doi.org/10.1109/CONIELECOMP.2012.6189879>
- J, G., X, L., X, W., AW, L., H, Z., & C, X. (2014). Photodynamic action of methylene blue in osteosarcoma cells in vitro. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 11(1), 13–19. <https://doi.org/10.1016/J.PDPDT.2013.09.003>
- Jackson, E. L., & Lu, H. (2016). Three-dimensional models for studying development and disease: Moving on from organisms to organs-on-a-chip and organoids. *Integrative Biology (United Kingdom)*, 8(6), 672–683. <https://doi.org/10.1039/c6ib00039h>
- Johansson, A. (2007). *Spectroscopic techniques for photodynamic therapy dosimetry*. Department of Physics, Lund University. [https://portal.research.lu.se/portal/en/publications/spectroscopic-techniques-for-photodynamic-therapy-dosimetry\(015f8a6f-0457-4fa3-a5e0-5510e8f70c87\)/export.html](https://portal.research.lu.se/portal/en/publications/spectroscopic-techniques-for-photodynamic-therapy-dosimetry(015f8a6f-0457-4fa3-a5e0-5510e8f70c87)/export.html)
- Jori, G., Fabris, C., Soncin, M., Ferro, S., Coppellotti, O., Dei, D., Fantetti, L., Chiti, G., & Roncucci, G. (2006). Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications. *Lasers in Surgery and Medicine*, 38(5), 468–481. <https://doi.org/10.1002/lsm.20361>
- Khanal, A., Ngoc Bui, M. P., & Seo, S. S. (2014). Microgel-encapsulated methylene blue for the treatment of breast cancer cells by photodynamic therapy. *Journal of Breast Cancer*, 17(1), 18–24. <https://doi.org/10.4048/jbc.2014.17.1.18>
- Kim, M. M., & Darafsheh, A. (2020a). Light Sources and Dosimetry Techniques for Photodynamic Therapy. In *Photochemistry and Photobiology* (Vol. 96, Issue 2, pp. 280–294). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/php.13219>
- Kim, M. M., & Darafsheh, A. (2020b). Light Sources and Dosimetry Techniques for Photodynamic Therapy. In *Photochemistry and Photobiology* (Vol. 96, Issue 2, pp. 280–294). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/php.13219>
- Lemos, C. N., Souza, J. G. de, Simão, P. S., & Lopez, R. F. V. (2016). Iontophoresis Improved Growth Reduction of Invasive Squamous Cell Carcinoma in Topical Photodynamic Therapy. *PLOS ONE*, 11(1), e0145922. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0145922>
- Li, M.-M., Cao, J., Yang, J.-C., Shen, Y.-J., Cai, X.-L., Chen, Y.-W., Qu, C.-Y., Zhang, Y., Shen, F., & Xu, L.-M. (2017). Effects of arginine–glycine–aspartic acid peptide-conjugated quantum dots-induced photodynamic therapy on pancreatic carcinoma in vivo. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 2769. <https://doi.org/10.2147/IJN.S130799>
- Lim, C. K., Heo, J., Shin, S., Jeong, K., Seo, Y. H., Jang, W. D., Park, C. R., Park, S. Y., Kim, S., & Kwon, I. C. (2013). Nanophotosensitizers toward advanced photodynamic therapy of Cancer. In *Cancer Letters* (Vol. 334, Issue 2, pp. 176–187). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.09.012>

- Lim, E. J., Oak, C. H., Heo, J., & Kim, Y. H. (2013). Methylene blue-mediated photodynamic therapy enhances apoptosis in lung cancer cells. *Oncology Reports*, *30*(2), 856–862. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2494>
- McPherson, K., Steel, C. M., & Dixon, J. M. (2000). ABC of breast diseases: Breast cancer - Epidemiology, risk factors, and genetics. In *British Medical Journal* (Vol. 321, Issue 7261, pp. 624–628). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7261.624>
- Mexico. (n.d.).
- Mordon, S., Martínez-Carpio, P. A., Vélez, M., Alves, R., & Trelles, M. A. (2012). Terapia fotodinámica (PDT) en piel y estética: Procedimiento, materiales y método en base a nuestra experiencia. *Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana*, *38*(3), 287–295. <https://doi.org/10.4321/S0376-78922012000300012>
- Mordon, S., Thécuá, E., Ziane, L., Lecomte, F., Deleporte, P., Baert, G., & Vignion-Dewalle, A.-S. (2020). Light emitting fabrics for photodynamic therapy: Technology, experimental and clinical applications. *Translational Biophotonics*, *2*(3), e202000005. <https://doi.org/10.1002/TBIO.202000005>
- Mudarra, I., & Pastor Alberto. (2011). *Guía Anestesia y Analgesia en Ratas*.
- Nyokong, T., & Ahsen, V. (2012). *Photosensitizers in Medicine, Environment, and Security*. Springer.
- Obstoy, B., Salaun, M., Bohn, P., Veresezan, L., Sesboué, R., & Thiberville, L. (2016a). Photodynamic therapy using methylene blue in lung adenocarcinoma xenograft and hamster cheek pouch induced squamous cell carcinoma. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, *15*, 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.03.003>
- Obstoy, B., Salaun, M., Bohn, P., Veresezan, L., Sesboué, R., & Thiberville, L. (2016b). Photodynamic therapy using methylene blue in lung adenocarcinoma xenograft and hamster cheek pouch induced squamous cell carcinoma. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, *15*, 109–114. <https://doi.org/10.1016/J.PDPDT.2016.03.003>
- O'Connor, A. E., Gallagher, W. M., & Byrne, A. T. (2009). Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*, *85*(5), 1053–1074. <https://doi.org/10.1111/J.1751-1097.2009.00585.X>
- Olvera, B. (n.d.). *Guía Tecnológica No. 3*. Retrieved August 27, 2020, from [http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/biomedica/guias\\_tecnologicas/3gt\\_fototerapia.pdf](http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/biomedica/guias_tecnologicas/3gt_fototerapia.pdf)
- Orth, K., Beck, G., Genze, F., & Rück, A. (2000). Methylene blue mediated photodynamic therapy in experimental colorectal tumors in mice. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *57*(2–3), 186–192. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(00\)00105-6](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(00)00105-6)
- Orth, K., Rück, A., Beck, G., Stanescu, A., & Beger, H. G. (1995). [Photodynamic therapy of small adenocarcinomas with methylene blue]. *Der Chirurg; Zeitschrift Fur Alle Gebiete Der Operativen Medizin*, *66*(12), 1254–1257. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8582171>
- Orth, K., Russ, D., Beck, G., Rück, A., & Beger, H. G. (1998). Photochemotherapy of experimental colonic tumours with intra-tumorally applied methylene blue. *Langenbeck's Archives of Surgery*, *383*(3–4), 276–281. <https://doi.org/10.1007/s004230050132>

- Pacheco, L., Stolik, S., de La Rosa, J., & de La Cadena, A. (2014). Laser diode system for interstitial photodynamic therapy. *IEEE Latin America Transactions*, 12(4), 574–579. <https://doi.org/10.1109/TLA.2014.6868857>
- Pérez Laguna, V. (2019). *Terapia fotodinámica antimicrobiana frente a agentes causantes de infecciones en piel y/o mucosas*. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=257808&info=resumen&idioma=SPA>
- Pérez Pérez, N. F., Spezzia Mazzocco, T., & Delgado López, M. G. (2021). *Caracterización de la Muerte Celular Generada por la Terapia Fotodinámica en una Línea Celular de Cáncer de Mama*. <https://inaoe.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1009/1987/1/Tesis%20Maestr%C3%ada%20Nayeli%20firmada.pdf>
- Perelló, D. y Fasulo, A. (2001). Comparación de las transmitancias de policarbonatos y vidrio. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente*, 5. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/79868>
- Peter, C., Hongwan, D., Küpfer, A., & Lauterburg, B. H. (2000). Pharmacokinetics and organ distribution of intravenous and oral methylene blue. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 56(3), 247–250. <https://doi.org/10.1007/s002280000124>
- Pires, F., Coelho, M., Ribeiro, P. A., & Raposo, M. (2016). *Methylene blue: A Trendy Photosensitizer in Medicine and in Solar-Energy Conversion Systems* (pp. 381–385). SciTePress. <https://novaresearch.unl.pt/en/publications/methylene-blue-atrendy-photosensitizer-in-medicine-and-in-solar->
- ¿Qué es el cáncer de mama?* (n.d.). Retrieved October 11, 2020, from [https://www.breastcancer.org/es/sintomas/cancer\\_de\\_mama/que\\_es\\_cancer\\_mama](https://www.breastcancer.org/es/sintomas/cancer_de_mama/que_es_cancer_mama)
- Ramón, E. (2015). *Terapia fotodinámica: teoría y práctica*. In *Instituto Politécnico Nacional* (1st ed., Vol. 1).
- Robertson, C. A., Evans, D. H., & Abrahamse, H. (2009). Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 96(1). <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.04.001>
- Rong, P., Yang, K., Srivastan, A., Kiesewetter, D. O., Yue, X., Wang, F., Nie, L., Bhirde, A., Wang, Z., Liu, Z., Niu, G., Wang, W., & Chen, X. (2014). Photosensitizer Loaded Nano-Graphene for Multimodality Imaging Guided Tumor Photodynamic Therapy. *Theranostics*, 4(3), 229. <https://doi.org/10.7150/THNO.8070>
- Ruddon, R. (2007). *CANCER BIOLOGY* (Cuarta edición). Oxford University Press, Inc.
- Sellera, F. P., Nascimento, C. L., & Ribeiro, M. S. (Eds.). (2016). *Photodynamic Therapy in Veterinary Medicine: From Basics to Clinical Practice*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-45007-0>
- Sharman, W. M., Allen, C. M., & van Lier, J. E. (1999). Photodynamic therapeutics: Basic principles and clinical applications. In *Drug Discovery Today* (Vol. 4, Issue 11, pp. 507–517). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(99\)01412-9](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(99)01412-9)
- Tardivo, J. P., del Giglio, A., de Oliveira, C. S., Gabrielli, D. S., Junqueira, H. C., Tada, D. B., Severino, D., de Fátima Turchiello, R., & Baptista, M. S. (2005). Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2(3), 175–191. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00097-9](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00097-9)

- Tipos de tratamiento - Instituto Nacional del Cáncer.* (n.d.). Retrieved October 24, 2020, from <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>
- Velásquez, Y., Liuzzi, J. F., Tejada, A., Godoy, A., & Quintero, C. (2014). CÁNCER DE MAMA MODELO EXPERIMENTAL EN RATAS INDUCIDO MEDIANTE ADMINISTRACIÓN DE 1-METHYL-1 NITROSOUREA Artículo original. *Rev Venez Oncol*, 26(2), 85–97.
- Velpula, N., & Lingam, S. (2014). Photodynamic therapy: A new modality treatment in pre-cancer and cancer patients. *International Journal of Case Reports and Images*, 5, 1. <https://doi.org/10.5348/ijcri-201554-RA-10009>
- Vigilancia Inmunológica contra los Tumores.* (n.d.).
- Wagner, M., Suarez, E. R., Theodoro, T. R., Machado Filho, C. D. A. S., Gama, M. F. M., Tardivo, J. P., Paschoal, F. M., & Pinhal, M. A. D. S. (2012). Methylene blue photodynamic therapy in malignant melanoma decreases expression of proliferating cell nuclear antigen and heparanases. *Clinical and Experimental Dermatology*, 37(5), 527–533. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2011.04291.x>
- Wang, M., & Dai, Z. (2017). Advances in equipment for tumor photodynamic therapy. *Chinese Science Bulletin*, 62(15), 1591–1601. <https://doi.org/10.1360/N972017-00150>
- Welsh, J. (2013). Animal Models for Studying Prevention and Treatment of Breast Cancer. In *Animal Models for the Study of Human Disease*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415894-8.00040-3>
- Wilson, B. C., & Patterson, M. S. (2008). The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. In *Physics in Medicine and Biology* (Vol. 53, Issue 9). Phys Med Biol. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/53/9/R01>
- Wu, P. T., Lin, C. L., Lin, C. W., Chang, N. C., Tsai, W. B., & Yu, J. (2018). Methylene-Blue-Encapsulated Liposomes as Photodynamic Therapy Nano Agents for Breast Cancer Cells. *Nanomaterials* 2019, Vol. 9, Page 14, 9(1), 14. <https://doi.org/10.3390/NANO9010014>
- Wyld, L., Reed, M. W. R., & Brown, N. J. (2001). Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type. *British Journal of Cancer*, 84(10). <https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.1795>
- Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kędzierska, E., Knap-Czop, K., Kotlińska, J., Michel, O., Kotowski, K., & Kulbacka, J. (2018). Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 1098–1107. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.049>
- Zubair, H., & Ahmad, A. (2017). Cancer Metastasis: An Introduction. In *Introduction to Cancer Metastasis* (pp. 3–12). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804003-4.00001-3>

# **Anexo A. Análisis y modificación del dispositivo empleado en la TFD con cultivos celulares**

---

Como se comentó en la sección 5.2. tras observar una gran reducción en la viabilidad celular en el grupo que fue tratado con solo luz a una dosis de  $30 \text{ J/cm}^2$ , se comenzó a estudiar las posibles causas de este efecto, para esto se analizó el dispositivo lumínico utilizado en el experimento de TFD en cultivo celulares. Inicialmente se analizó la potencia del dispositivo con el medidor de energía y potencia óptica PM100D de THORLABS®, este dispositivo se utilizó con un sensor S120C (fotodiodo de silicio) cuyos parámetros de detección en longitud de onda van de los  $400 - 1100 \text{ nm}$  con una resolución de  $1 \text{ nm}$ . Este sensor presenta un diámetro de apertura configurable a partir de  $0.010 \text{ mm}$  hasta  $9.5 \text{ mm}$ . Para este experimento se configuró el medidor a  $630 \text{ nm}$  con un diámetro de apertura del sensor de  $6.3 \text{ mm}$ , el detector se colocó en paralelo al dispositivo con una separación de  $1 \text{ cm}$ , con la finalidad de obtener de manera exacta la cantidad de luz que reciben las células.

Se registró la potencia óptica de todos los LED's, las mediciones se realizaron cada 30 segundos por un periodo de 4 minutos. Estas mediciones se promediaron por cada LED y por tiempo, como resultado se observó una diferencia en la potencia de los LED's, registrando una potencia mínima de  $13.5 \text{ mW}$  y máxima de  $19 \text{ mW}$  (Figura2a), debido a esta irregularidad, la dosis suministrada a cada grupo de células no fue homogénea. Por otro lado, en la Figura2b se muestra la potencia promedio de todo el dispositivo, en esta figura se logra observar el decaimiento de la potencia a lo largo del tiempo. La pérdida de potencia se ve afectada de manera inversa por la temperatura del LED, debido a esta pérdida la dosis de luz también disminuye, teniendo como consecuencia que no se alcance la dosis deseada.

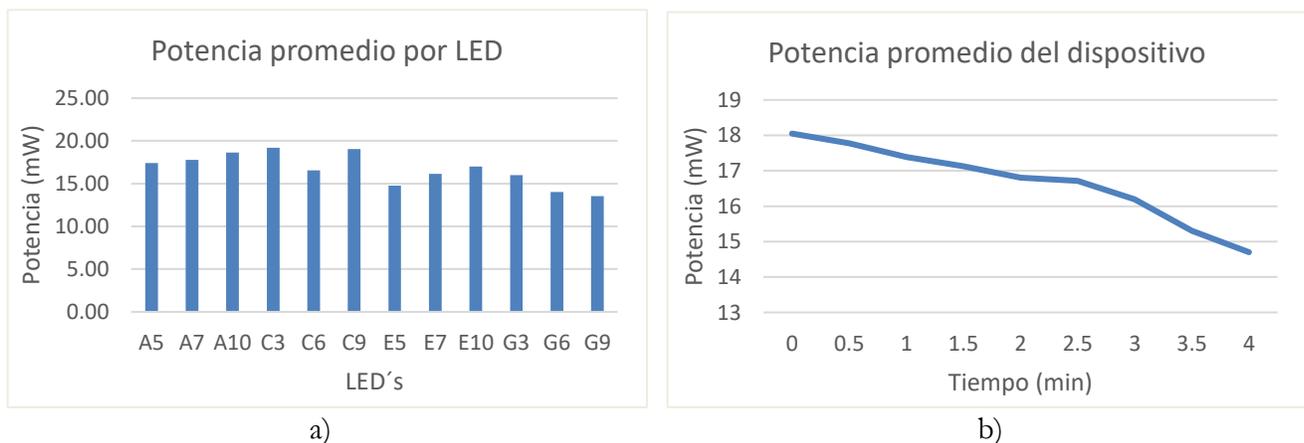


Figura 55. Potencia promedio del dispositivo lumínico utilizado en cultivos celulares.  
(a) Potencia promedio por LED (b) Potencia del dispositivo/tiempo.

Posteriormente se midió la temperatura que generaba el dispositivo en la placa de cultivos, para esto se atemperó una placa de cultivo de 96 pozos con 100  $\mu\text{l}$  de PBS a  $37^{\circ}\text{C}$ , después se irradió por 9 minutos con 54 segundos con la finalidad de alcanzar la dosis de  $30 \text{ J}/\text{cm}^2$ , la temperatura se registró cada 30 segundos con la ayuda de un termopar y un multímetro (Xtron® MU-225).

La Figura 56 muestra el incremento gradual de la temperatura en suministrada al cultivo celular, donde se puede observar que la temperatura máxima ( $37^{\circ}\text{C}$ ) recomendada para la línea celular 4T1 se rebasa a partir del minuto 2, alcanzando una temperatura promedio de  $43.90^{\circ}\text{C}$ . Este resultado permite explicar la reducción en la viabilidad celular en el grupo control de luz durante el experimento de TFD explicado en la sección 5.2, ya que se comprueba que el daño se generó por la temperatura y no por la dosis de luz administrada.

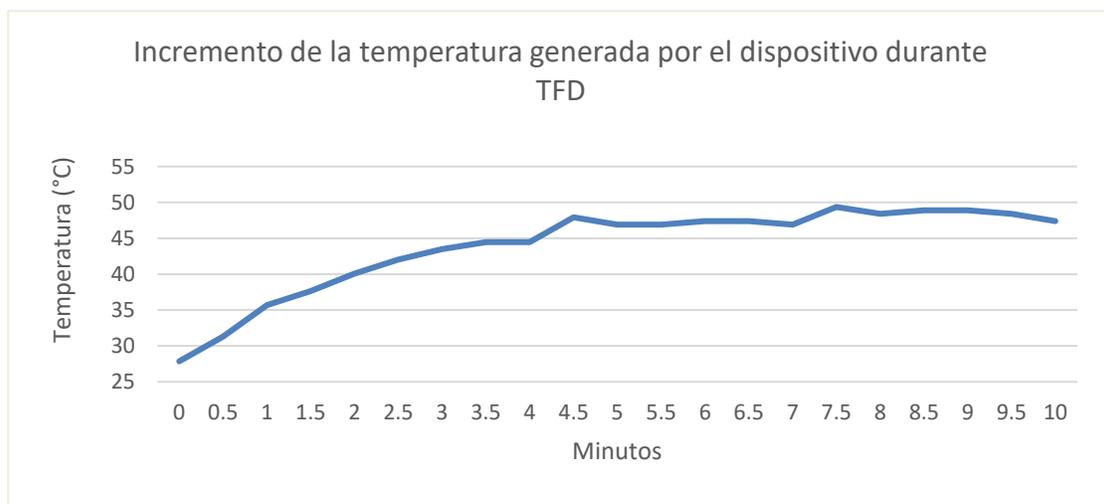


Figura 56. Incremento de temperatura en el dispositivo utilizado en la TFD con cultivos celulares.

Con el fin de solucionar estos inconvenientes se remplazaron los LED's del dispositivo y se aplicó pasta térmica (Steren® lim-ter) la cual tiene la función de ayudar en la disipación de calor. Después de realizar estas modificaciones se volvieron a evaluar los parámetros antes mencionados. Donde se presentó una mejora en la potencia óptica promedio, pasando de  $16.67 \text{ mW}$  a  $26.66 \text{ mW}$  (Figura 57) lo que disminuyó el tiempo de aplicación de la TFD y mejoró la estabilidad de la irradiación en la dosis de  $40 \text{ J}/\text{cm}^2$ . Dado que a menor tiempo de activación de los LED's menos riesgo de que exista un aumento en la temperatura. Sin embargo, también

se reemplazó el disipador por una placa de aluminio con un grosor de 13 mm. Al analizar la temperatura que genera el dispositivo en las células, se encontró que esta temperatura se mantuvo en el rango de 37°C (

Figura 58) por lo cual podemos descartar que este factor intervenga en los resultados obtenidos en la aplicación de la TFD. Por último, se midió el espectro de emisión con un espectrómetro (Ocean Optics® USB 2000) donde se registró un espectro de 600 – 650 nm con un pico de emisión en 635 nm (Figura 59

Figura ).

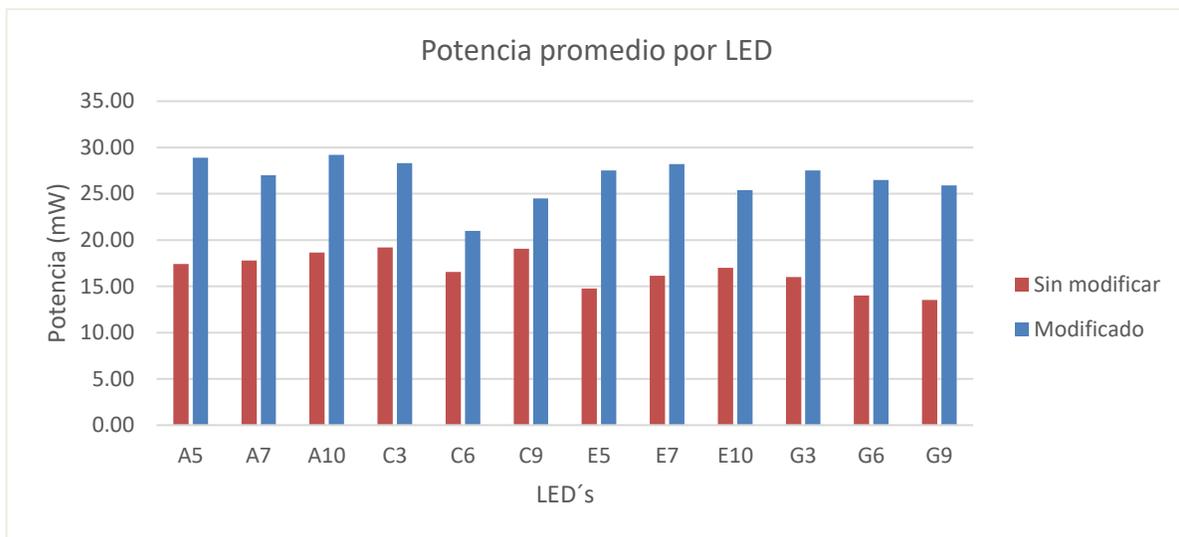


Figura 57. Comparación del parámetro de potencia en dispositivo sin modificar y modificado.

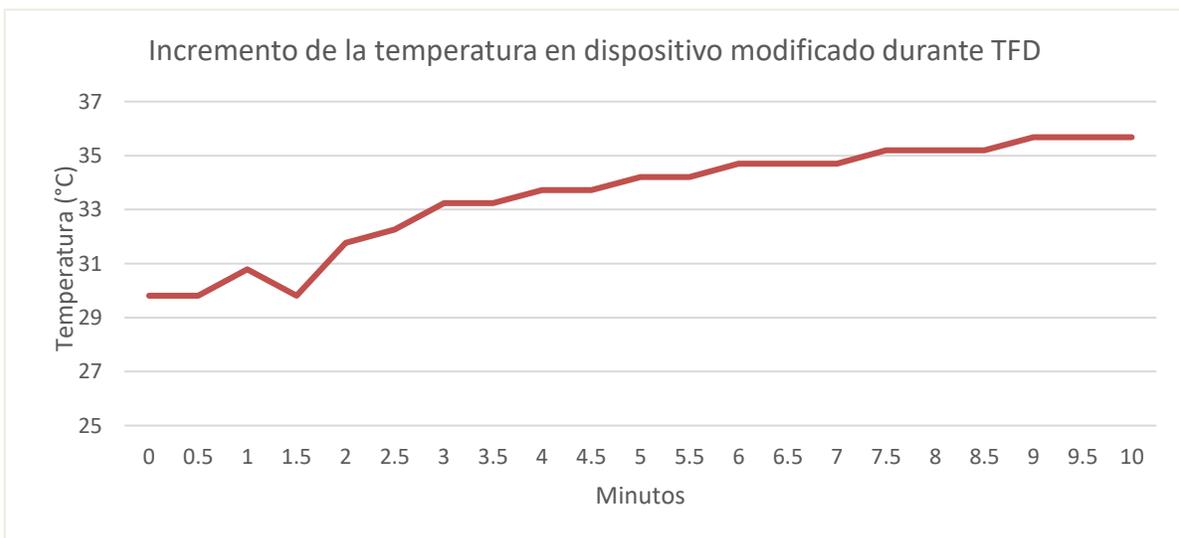


Figura 58. Parámetros de temperatura en dispositivo modificado.

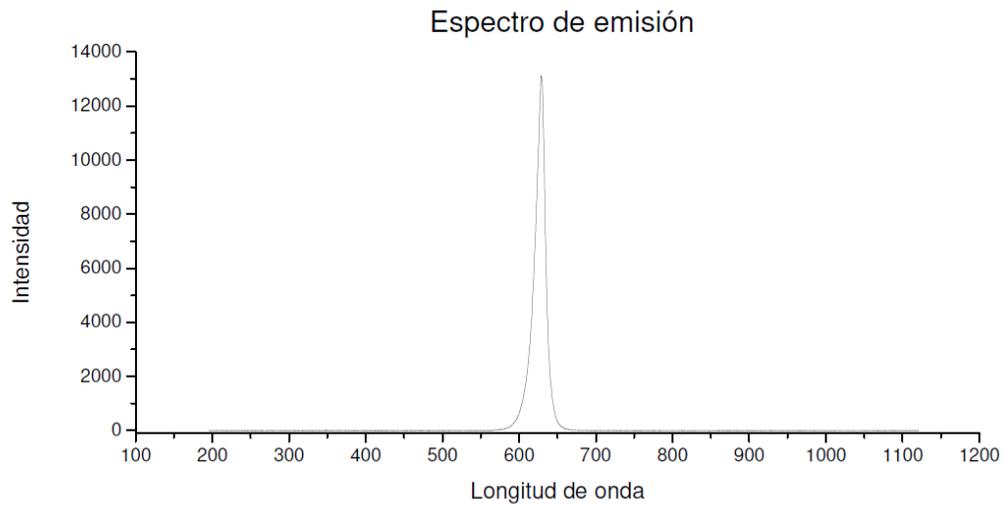


Figura 59. Espectro de emisión en dispositivo para cultivo celular.

# **Anexo B. Programas desarrollados en LabVIEW para el sistema de irradiación**

---

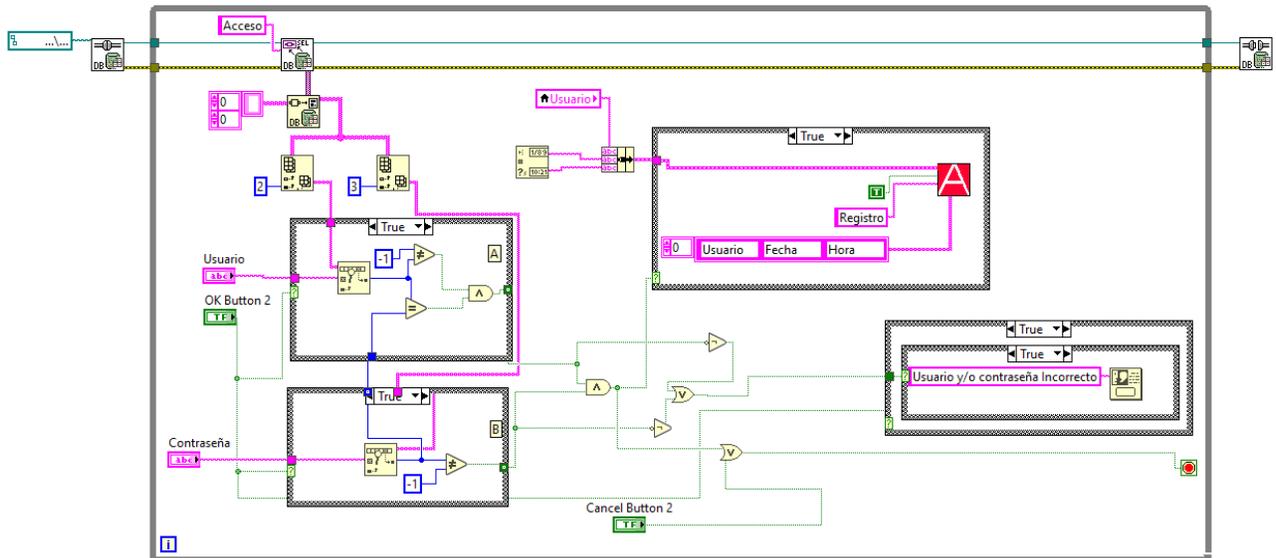


Figura 60. Diagrama a bloques de la pantalla acceso de la interfaz grafica

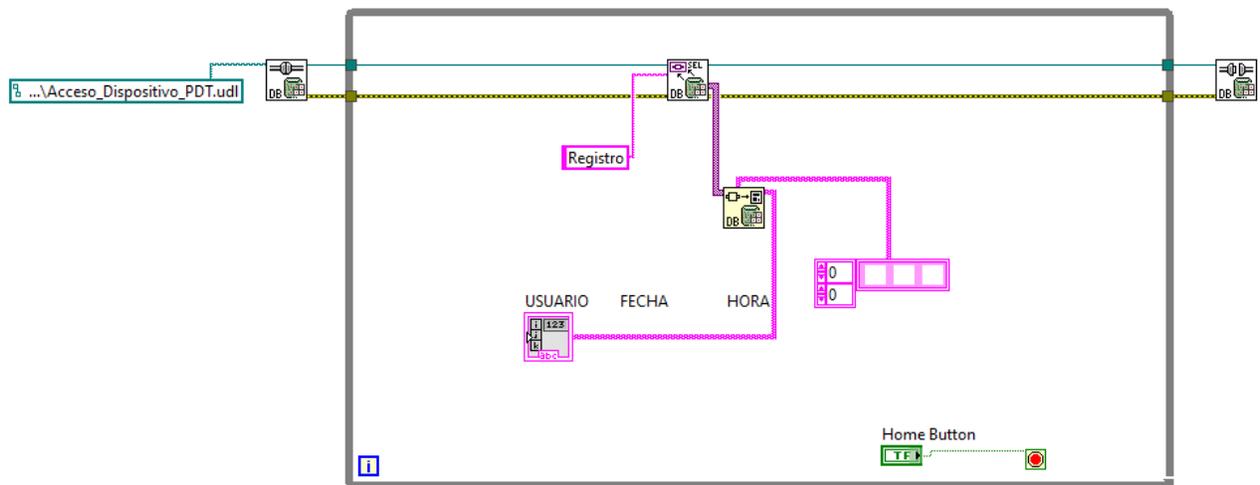


Figura 61. Diagrama a bloques de la pantalla historial de la interfaz grafica

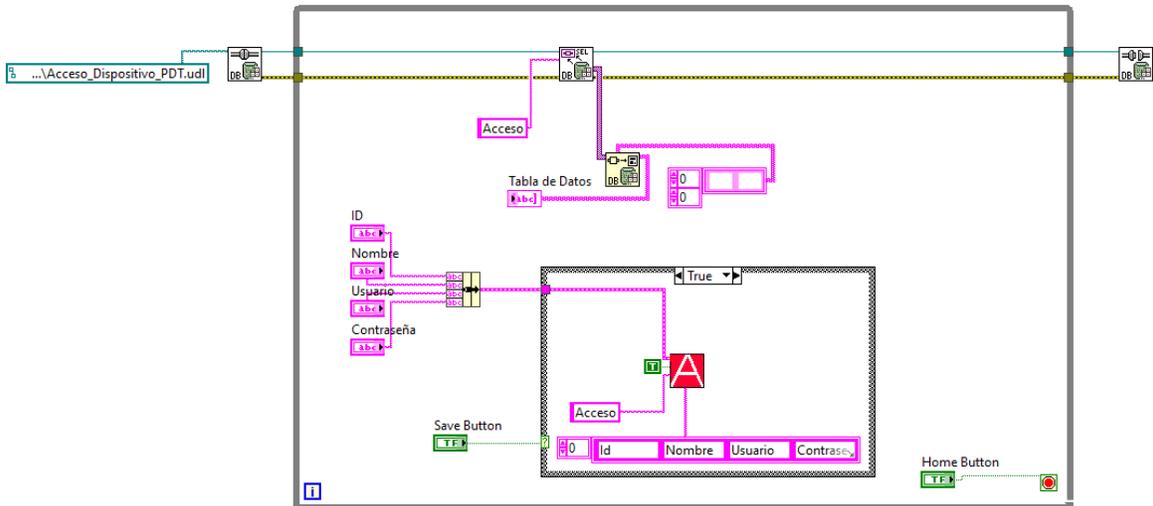


Figura 70. Diagrama a bloques de la pantalla registros de nuevos usuarios en la interfaz grafica  
En esta pantalla de inserta una subrutina presentada en la figura 24

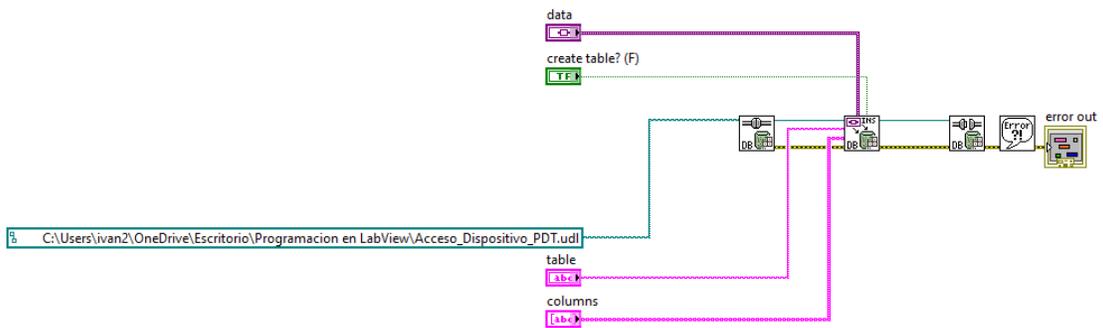


Figura 62. Diagrama a bloques de la subrutina de registro de usuarios  
Esta subrutina nos ayuda a leer las posiciones en la base de datos y nos permite escribir los datos de los nuevos usuarios



## **Anexo C. Diagramas desarrollados en kicad para el sistema de irradiación**

---

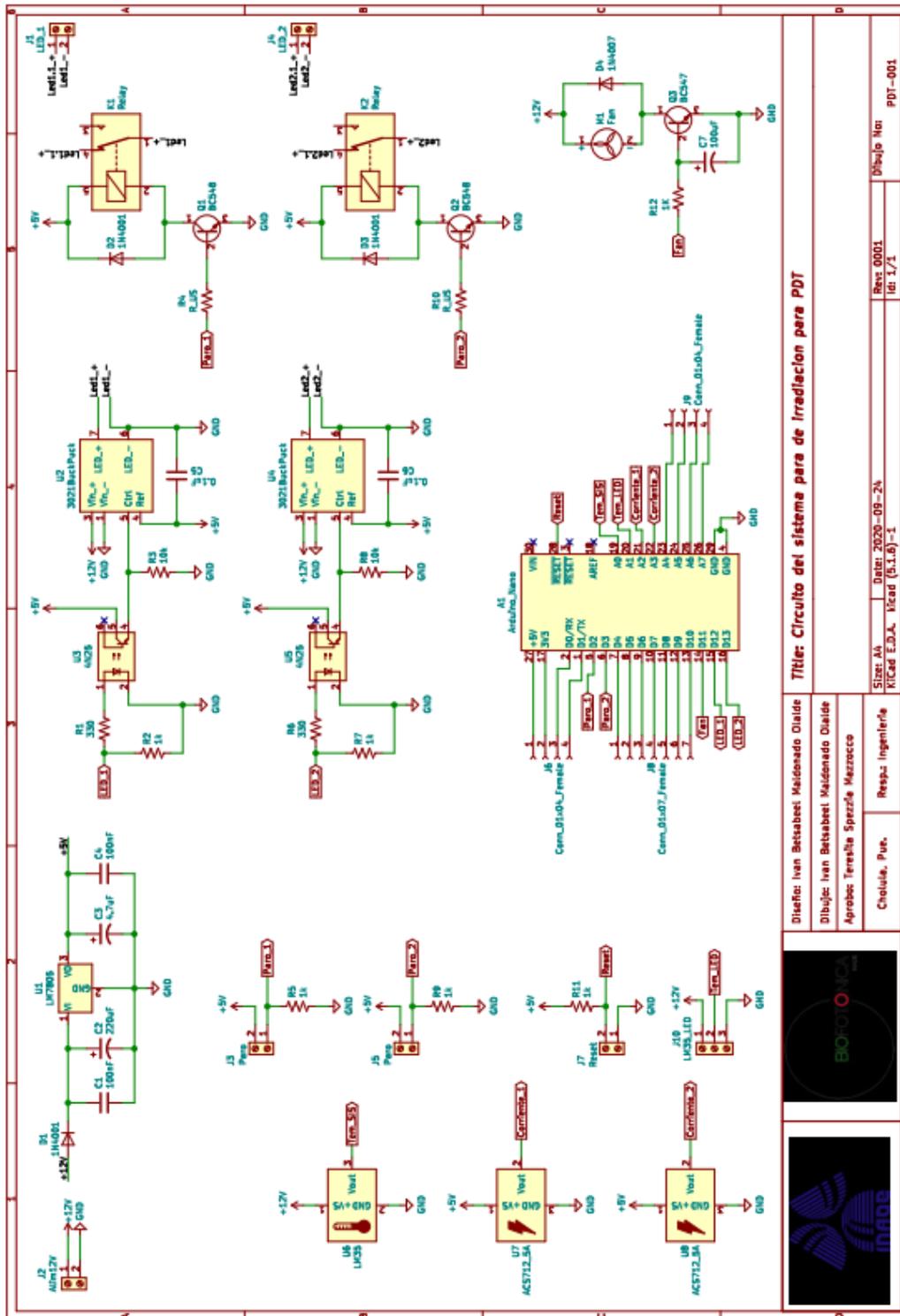


Figura 65. Diagrama eléctrico del sistema de irradiación

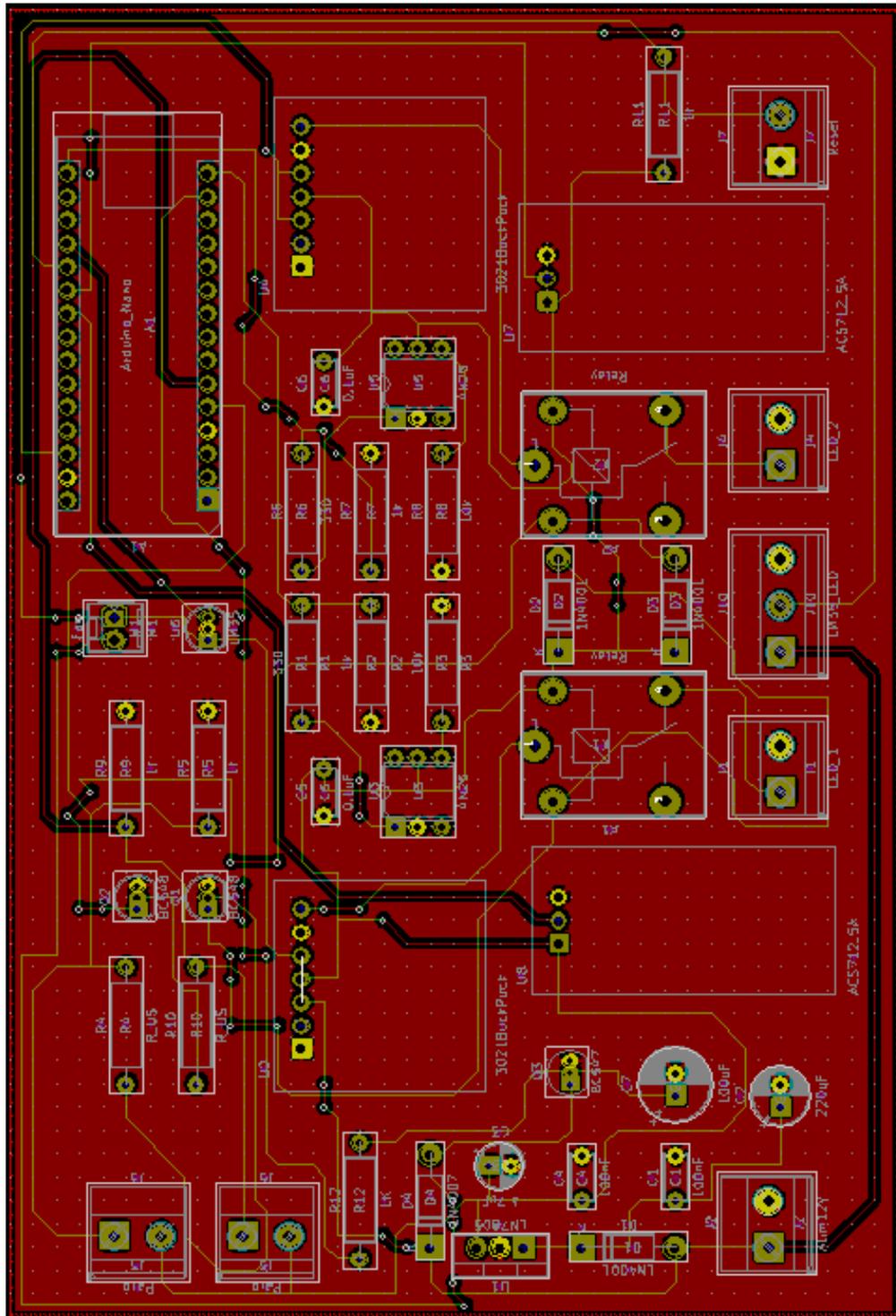


Figura 66. Diagrama PCB del sistema de irradiación

# **Anexo D. Análisis Estadístico**

---

En el presente anexo describe el análisis estadístico desarrollado a partir de los datos adquiridos durante el experimento in vitro, como se describe en la sección xx. Se optó por emplear el método Kruskal-Wallis de para determinar la diferencia entre varianzas y el método de DUNCAN para determinar la diferencia en tres grupos.

En primera instancia se agruparon los resultados obtenidos por la prueba de MTT (porcentaje de células viables) por grupos y e acomodados por el número de experimento y obteniendo su mediana, quedando de la siguiente forma:

Tabla 8. Porcentaje de células viables obtenidas tras los experimentos

N. Experimento	Control	Azul de Metileno 10uM	Azul de Metileno 20uM	Control luz 40 J/cm <sup>2</sup>	TFD (AM 10 uM y 40 J/cm <sup>2</sup> )	TFD (AM 20 uM y 40 J/cm <sup>2</sup> )
1	100.0	74.4	81.1	77.2	35.3	7.2
2	100.0	89.2	98.3	71.9	32.2	2.1
3	100.0	78.5	95.2	96.8	13.7	0.6
$\tilde{x}$	100	78.47	95.19	77.16	32.19	2.11

Posteriormente se graficaron los valores de las medianas donde se obteniendo el siguiente gráfico.



Figura 676. Medianas de los grupos empleados en TFD

La prueba de kruskal-wallis nos permite contrasta si las diferentes muestras están equidistribuidas y que por lo tanto pertenecen a una misma distribución (población). Bajo ciertas simplificaciones puede considerarse que la prueba de Kruskal-Wallis compara las medianas.

- Ho: todas las muestras provienen de la misma población (distribución).
- HA: Al menos una muestra proviene de una población con una distribución distinta.

Este estadístico esta dado por:

$$H = \left( \frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^k \frac{R_j^2}{n_j} \right) - 3(N + 1)$$

- $n_j$  es el número de observaciones en el grupo j
- $r_j$  es el rango (entre todas las observaciones) de la observación j en el grupo
- N es el número total de observaciones entre todos los grupos

De esta forma la información correspondiente a nuestros experimentos se presenta de la siguiente forma:

Tabla 9. Datos empleados para la aplicación de kruskal-wallis

	Control	AM 10 $\mu$ M	AM 20 $\mu$ M	Luz 40 J/cm <sup>2</sup>	TFD Dosis 1	TFD Dosis 2	N=
$n_j$	3	3	3	3	3	3	18
$R_j$	51	30	39	30	15	6	
$R_j^2$	2601	900	1521	900	225	36	
$R_j^2/n_j$	867	300	507	300	75	12	2061

Por lo que como resultado obtenemos que el valor de H es 15.32, y con esto se obtiene el p-valor el cual nos da como resultado 0.009095, y debido a que el p-valor es menor que el nivel de significancia  $\alpha= 0.05$ , concluiremos con la hipótesis alternativa y rechazamos la hipótesis nula, lo que indica que existe una diferencia significativa entre los grupos. Por lo cual optamos

por elaborar la prueba de Duncan para determinar entre que grupos hay diferencia. Para ello se calcula la suma de cuadrados, el error estándar y la razón de posibilidades con las fórmulas que se muestran a continuación

$$\text{Suma de cuadrados} = ss = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

$$\text{Error estandar} = se = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n}}$$

$$\text{Razon de posibilidad} = Rp = se * rp * \sqrt{\frac{1}{n}}$$

Posteriormente se arreglan los grupos en orden ascendente según sus medias y se obtiene la diferencia entre grupos.

Tabla 10. Tabla de datos arreglados para el uso del método de DUNCAN

		TFD (AM 20 uM y 40 J/cm <sup>2</sup> )	TFD (AM 10 uM y 40 J/cm <sup>2</sup> )	Azul de Metileno 10 uM	Control luz 40 J/cm <sup>2</sup>	Azul de Metileno 20 uM	Control
		3.3	27.1	80.7	82.0	91.5	100.0
Control	100.0	96.7	72.9	19.3	18.0	8.5	0.0
Azul de Metileno 20uM	91.5	88.3	64.5	10.8	9.6	0.0	
Control luz 40 J/cm <sup>2</sup>	82.0	78.7	54.9	1.2	0.0		
Azul de Metileno 10uM	80.7	77.4	53.6	0.0			
TFD (AM 10 uM y 40 J/cm <sup>2</sup> )	27.1	23.8	0.0				
TFD (AM 20 uM y 40 J/cm <sup>2</sup> )	3.3	0.0					

Posteriormente se compara la diferencia entre grupos con la razón de probabilidad y si esta última es mayor a la diferencia se considera que los grupos comparados no tienen diferencia significativa.

Tabla 11. Resultados de la prueba de Duncan (comparación entre grupos)

Grupos		Diferencia entre grupos	Rp	Resultado
Control	TFD (AM 20 uM y 40 J/cm <sup>2</sup> )	96.7	17.2	Significativa
Azul de Metileno 20uM	TFD (AM 20 uM y 40 J/cm <sup>2</sup> )	88.3	17.0	Significativa
Control luz 40 J/cm <sup>2</sup>	TFD (AM 20 uM y 40 J/cm <sup>2</sup> )	78.7	16.9	Significativa
Azul de Metileno 10uM	TFD (AM 20 uM y 40 J/cm <sup>2</sup> )	77.4	16.4	Significativa
Control	TFD (AM 10 uM y 40 J/cm <sup>2</sup> )	72.9	17.0	Significativa
Azul de Metileno 20uM	TFD (AM 10 uM y 40 J/cm <sup>2</sup> )	64.5	16.9	Significativa
Control luz 40 J/cm <sup>2</sup>	TFD (AM 10 uM y 40 J/cm <sup>2</sup> )	54.9	16.4	Significativa
Azul de Metileno 10uM	TFD (AM 10 uM y 40 J/cm <sup>2</sup> )	53.6	15.6	Significativa
TFD (AM 10 uM y 40 J/cm <sup>2</sup> )	TFD (AM 20 uM y 40 J/cm <sup>2</sup> )	23.8	15.6	Significativa
Control	Azul de Metileno 10 uM	19.3	16.9	Significativa
Control	Control luz 40 J/cm <sup>2</sup>	18.0	16.4	Significativa
Azul de Metileno 20uM	Azul de Metileno 10 uM	10.8	16.4	No Significativa
Azul de Metileno 20uM	Control luz 40 J/cm <sup>2</sup>	9.6	15.6	No Significativa
Control	Azul de Metileno 20 uM	8.5	15.6	No Significativa
Control luz 40 J/cm <sup>2</sup>	Azul de Metileno 10 uM	1.2	15.6	No Significativa