ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

FACULTAD DE CIENCIAS

MODELACIÓN Y SIMULACIÓN DE LA DOSIMETRÍA EXPLÍCITA EN TERAPIA FOTODINÁMICA. INFLUENCIA SOBRE EL OXÍGENO TRIPLETE POR CONSIDERACIONES FISIOLÓGICAS

TRABAJO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE FÍSICO

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

VÍCTOR JESÚS SÁNCHEZ GUACHAMÍN
victor.sanchez01@epn.edu.ec

Directora: MARÍA PAULINA ROMERO OBANDO, PH.D.
maria.romerom@epn.edu.ec

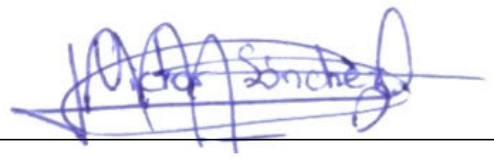
Codirector: CÉSAR AUGUSTO COSTA VERA, PH.D.
cesar.costa@epn.edu.ec

QUITO, ABRIL 2017

DECLARACIÓN

Yo VÍCTOR JESÚS SÁNCHEZ GUACHAMÍN, declaro bajo juramento que el trabajo aquí escrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedo mis derechos de propiedad intelectual, correspondientes a este trabajo, a la Escuela Politécnica Nacional, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normatividad institucional vigente.



Víctor Jesús Sánchez Guachamín

.

CERTIFICACIÓN

Certificamos que el presente trabajo fue desarrollado por VÍCTOR JESÚS SÁNCHEZ GUACHAMÍN, bajo nuestra supervisión.

María Paulina Romero Obando, Ph.D.
Directora

César Augusto Costa Vera, Ph.D.
Codirector

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a mis padres Víctor y Mariana por creer en mi, y brindarme en todo momento su apoyo y amor incondicional de padres. A mis hermanos y hermanas, especialmente a Miguel que comparte conmigo la afición al conocimiento.

A mi novia Caren por hacer estos últimos tres años de mi vida una hermosa aventura que deseo vivirla por el resto de mis días. Agradezco también, a su madre Blanca por brindarme el calor de un hogar ajeno al mio.

A mis directores de tesis, Dra. Paulina Romero y Dr. Cesar Costa por su apoyo, por sus consejos y por orientarme en la terminación de este trabajo.

A los profesores de la Facultad de Ciencias por su aporte en mi formación profesional. Y finalmente, a todos los buenos amigos que hice en mi paso por la universidad.

Eternamente agradecido.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a todas aquellas personas que trabajan arduamente para hacer su sueño realidad, a las que con esfuerzo propio sin herir a segundas personas no se dejan vencer.

Índice de contenido

Índice de figuras x

Índice de tablas xi

Resumen xiii

Abstract xv

1. Introducción 1

2. Bases de la TFD y dosimetría 3

2.1. Terapia Fotodinámica 3

2.1.1. Historia de la Terapia Fotodinámica 4

2.2. Fotosensibilizante 5

2.2.1. Ácido δ-aminolevulínico 6

2.3. Interacción de la luz con el tejido 7

2.3.1. Coeficiente de absorción 8

2.3.2. Coeficiente de dispersión 9

2.3.3. Coeficiente de anisotropía 10

2.4. Interacción de la luz con moléculas 10

2.5. El rol del oxígeno en TFD 12

2.5.1. Oxígeno singlete 13

2.6. Modelo dinámico para TFD 13

2.6.1. Mecanismo tipo I 14

2.6.2. Mecanismo tipo II 14

2.7. Dosimetría en Terapia Fotodinámica 17

2.7.1. Dosimetría directa 17

2.7.2. Dosimetría implícita 17

2.7.3. Dosimetría explícita 17

3. Cálculo de la dosis de $^1O_2$ generado en TFD con consideraciones fisiológicas sobre el $^3O_2$ 19
3.1. Formaciones instantáneas de $[S_1]$, $[T]$ y $[^1O_2]$ 19
3.1.1. Evolución temporal de $[S_0]$ 21
3.1.2. Evolución temporal de $[^3O_2]$ 21
3.1.3. Evolución temporal de $[A]$ 22
3.2. Incremento de $^3O_2$ por el mecanismo de la respiración 22
3.3. Disminución del $^3O_2$ por consumo metabólico y por TFD 24
3.3.1. Consumo metabólico 24
3.3.2. Consumo por TFD 24
3.4. Difusión de la de luz en el tejido 25
3.5. Dosis de $^1O_2$ con dosimetría explícita 28

4. Simulación del modelo dosimétrico, resultados y discusiones 29
4.1. Difusión de la luz en la dermis 30
4.2. Evolución espacial y temporal de la PpIX 31
4.2.1. Concentración de PpIX vs profundidad 33
4.2.2. Concentración de PpIX vs tiempo 34
4.3. Evolución espacial y temporal del oxígeno triplete 35
4.3.1. Concentración de $^3O_2$ vs profundidad 37
4.3.2. Concentración de $^3O_2$ vs tiempo 38
4.4. Evolución espacial y temporal para la dosis de oxígeno singlete 39
4.4.1. Dosis de $^1O_2$ vs profundidad 40
4.4.2. Dosis de $^1O_2$ vs tiempo 41

5. Conclusiones 43

Referencias 45

A. Anexos 49

Índice de figuras

2.1. Mecanismo de acción en TFD. Adaptada de [25]. 4
2.2. Espectros de absorción e intensidad de fluorescencia para la PpIX. Adaptada de [34]. 7
2.3. Capas de la piel. Adaptada de [7]. 7
2.4. Propiedades ópticas del tejido. 8
2.5. Espectro de absorción de los principales cromóforos del tejido en función de la longitud de onda. La oxihemoglobina tiene tres picos de absorción, uno a 418 nm, a 542 nm, y otro alrededor de los 900 nm, similarmente a la desoxihemoglobina. El agua constituye gran cantidad de los tejidos, es fuertemente absorbente entre 700 y 2000 nm. La melanina disminuye la absorción al aumentar la longitud de onda. Adaptada de [6] 9
2.6. Diagrama de Jablonski. 11
2.7. Configuraciones electrónicas relacionadas con el estado base y los estados excitados $^1\Delta$, $^1\Sigma$ del O_2. Adaptada de la referencia [7]. 13
2.8. Mecanismos tipo I y II de TFD: 1-absorción de la luz; 2-fluorescencia; 3-cruce intersistemas; 4-fosforescencia; 5-desactivación molecular; 6-fosforescencia. 14
2.9. Diagrama de Jablonski para el mecanismo tipo II en TFD. 15

3.1. Ejemplo de la curva de respuesta vascular dependiente del oxígeno singlete. Adaptada de [23]. 23
3.2. Haz incidente en un plano semi-infinito. 25

4.1. Tasa de fluencia de energía como una función de la profundidad con distintas irradiancias iniciales. 30
4.2. Distribución espacial y temporal de la concentración de PpIX a distintas irradiancias iniciales. 32
4.3. Concentración de PpIX como una función de la profundidad, con distintas irradiancias iniciales. 33
4.4. Concentración de PpIX como una función del tiempo, con distintas irradiancias iniciales. 34
4.5. Comportamiento del $[^3O_2]$ sin TFD. 35

4.6. Distribución espacial y temporal de $[^3O_2]$ a distintas irradiancias iniciales. 36
4.7. Concentración de $^3O_2$ como una función de la profundidad, a distintas irradiancias iniciales. 37
4.8. Concentración de $^3O_2$ como una función del tiempo de exposición, a distintas irradiancias iniciales. 38
4.9. Distribución espacial y temporal de la dosis de $^1O_2$ a distintas irradiancias iniciales. 39
4.10. Dosis de $^1O_2$ como una función de la profundidad para distintas irradiancias. 40
4.11. Dosis de $^1O_2$ como una función del tiempo de exposición para distintas irradiancias. 41

Índice de tablas

2.1. Agentes fotosensibilizantes que han sido utilizados en aplicaciones clínicas. Adaptada de [6]. 6
2.2. Definición de estados, constantes y términos de interés usadas en la obtención del modelo dinámico para TFD por el mecanismo tipo II. . . 16

3.1. Relación entre D_{50} y la irradiancia incidente. Adaptada de [23] 24

4.1. Valores de constantes para la PpIX con luz de 633 [nm] de longitud de onda. 29
4.2. Propiedades ópticas de la dermis de piel humana normal obtenidos al excitar la piel con una fuente de luz de 633 [nm]. 30

Resumen

Los pilares fundamentales de la Terapia Fotodinámica (TFD) son, el fotosensibilizante, una fuente de luz con una longitud de onda específica y el oxígeno molecular. Esta combinación adecuada tiene como resultado la producción de oxígeno citotóxico, que en un medio biológico producirá la muerte celular vía mecanismo tipo I, si se han producido sustancias reactivas del oxígeno (ROS), o vía mecanismo tipo II, si se ha producido oxígeno singlete. La cantidad de oxígeno singlete que se encuentra interactuando con una concentración de moléculas blanco es determinado por la dosis de oxígeno singlete.

Para este trabajo se ha utilizado como fotosensibilizante el ácido δ-aminolevulínico (ALA), que al introducirse en la mitocondria y al final del ciclo del Hemo, se tiene como producto la porfirina endógena protoporfirina IX (PpIX), la cual al ser un cromóforo absorbe luz en varias longitudes de onda. Como fuente de fotoexcitación de la PpIX se ha considerado una fuente de luz monocromática colimada de 633 [nm], se toma esta longitud de onda debido a la mejor penetración que presenta en el tejido. Se han considerado las irradiancias iniciales de 20, 60 y 150 $[mW/cm^2]$, para un tiempo de irradiación máximo de 20 [min] y el medio de estudio es la dermis de un tejido sano.

En este trabajo se ha simulado la distribución espacial y temporal para la protoporfirina IX, oxígeno molecular triplete y dosis de oxígeno singlete producido por la TFD en la dermis hasta 0.5 [cm] de profundidad.

Para el cálculo de la dosis de oxígeno singlete se utilizó la dosimetría explícita, haciendo uso de la dinámica producida en TFD por el mecanismo tipo II. En esta dinámica se acopló consideraciones fisiológicas que actúan sobre el oxígeno triplete, tales como el mecanismo de la respiración y el metabolismo celular. Se realizó un estudio de la interacción de la luz con el tejido, para lo cual se consideró la ecuación de difusión de la luz, cuya solución involucra la tasa de fluencia de energía. Se utilizó los coeficientes de absorción, de dispersión reducido y de anisotropía de un tejido humano normal en la región de la dermis.

En la simulación resultante se resuelve un sistema de tres ecuaciones diferenciales con respecto al tiempo, con concentraciones iniciales de 4.4, 39.9604 y 0 $[\mu M]$ para la PpIX, el oxígeno triplete y la dosis de oxígeno singlete respectivamente, con una

distribución homogénea en la dermis de cada uno de estas concentraciones.

Como resultado se tiene que, la tasa de fluencia de energía cerca de la superficie aumenta en 3 veces el valor de la irradiancia inicial, como consecuencia de la alta tasa de dispersión en la dermis. Se determina también que, casi el 100 % de la concentración de PpIX está envuelta en la dinámica de las reacciones de la TFD, y dichas reacciones compiten con la fisiología del paciente, dando como resultado que solo una parte del oxígeno del cuerpo esté disponible para realizar TFD. Finalmente, con la irradiancia de 60 $[mW/cm^2]$ se obtiene la mayor concentración de dosis de oxígeno singlete.

Abstract

The fundamental pillars of Photodynamic Therapy (PDT) are, the photosensitizer, a source of light with a specific wavelength and molecular oxygen. This suitable combination results in the production of cytotoxic oxygen, which in a biological medium will produce cell death via type I mechanism, whether oxygen reactive substances (ROS) have been produced, or via type II mechanism, if singlet oxygen has been produced . The amount of singlet oxygen that is interacting with a target molecule concentration is determined by the dose of singlet oxygen.

For this work, it has been used as a photosensitizer the acid δ-aminolevulinic (ALA), which when introduced into the mitochondria and at the end of the Hemo cycle, has the endogenous porphyrin protoporphyrin IX (PpIX), being a chromophore absorb light at various wavelengths. As a source of photoexcitation of the PpIX, a collimated monochromatic light source of 633 [nm] has been considered, this wavelength is taken due to the best penetration in the tissue and the initial irradiances of 20, 60 And 150 $[mW/cm^2]$, with a maximum irradiation time of 20 [min] and the study medium is dermis of a healthy weaving.

In this work we have simulated the spatial and temporal distribution for protoporphyrin IX, molecular oxygen triplet and dose of singlet oxygen produced by PDT in dermis up to 0.5 [cm] of depth.

For the calculation of the dose of singlet oxygen, explicit dosimetry was used, making use of the dynamics produced in PDT by the type II mechanism. In this dynamic was coupled physiological considerations that act on triplet oxygen, such as the mechanism of respiration and cellular metabolism. A study of the interaction of light with tissue was carried out, for which the light diffusion equation was considered, whose solution involves the rate of energy creep. Absorption, reduced dispersion and anisotropy coefficients of normal human tissue were used in the dermis region.

In the resulting simulation a system of three differential equations with respect to time are resolved, with initial concentrations of 4.4, 39.9604 and 0 $[\mu M]$ for the PpIX, the triplet oxygen and the singlet oxygen dose respectively, with a homogeneous distribution of each of the concentrations in the dermis.

As a result, the rate of energy fluence near the surface increases by 3 times the

value of the initial irradiance, as a consequence of the high rate of dispersion in the dermis. It is also determined that almost 100 % of the PpIX concentration is involved in the dynamics of PDT reactions, and these reactions compete with the physiology of the patient, resulting in only part of the oxygen in the body being available to perform PDT. Finally, with the irradiance of 60 $[mW/cm^2]$, the highest dose concentration of singlet oxygen is obtained.

Capítulo 1

Introducción

La Terapia Fotodinámica (TFD) es un procedimiento terapeutico utilizado en medicina para el tratamiento de diversas enfermedades de la piel, incluido el cáncer de piel no melanoma [1-3].

El mecanismo de acción de la TFD se basa en administrar al paciente un agente fotosensibilizante (FS), y posteriormente estimular la zona a tratar con luz de una longitud de onda específica. Este procedimiento se desarrolla en presencia de oxígeno triplete ($^3O_2$). El FS, la luz y el oxígeno constituyen los pilares fundamentales de la TFD [4-6].

Las reacciones químicas en TFD producen formas citotóxicas del oxígeno, una de las formas es que el oxígeno pase a un estado excitado, denominado oxígeno singlete ($^1O_2$), o también, se pueden producir sustancias reactivas del oxígeno (ROS) como por ejemplo; el O_{2^-}, el H_2O_2 y el OH. Si el producto es el $^1O_2$, el mecanismo se denomina tipo II, caso contrario se tendría el mecanismo tipo I [6, 12].

En TFD la dosimetría reconoce tres mecanismos destinados a evaluar el daño celular provocado por una concentración efectiva de FS. A la cuantificación del daño celular se lo conoce también como *dosis de* $^1O_2$, que por definición es igual al número total de sustratos biológicos consumidos por unidad de volumen durante el tratamiento con TFD [12]. La *dosimetría directa* se basa en la detección directa de la producción de $^1O_2$ a través de la fosforescencia del mismo, o de la fluorescencia de moléculas sensibles a este estado [17, 18, 20], en la *dosimetría implícita* se mide el decaimiento fluorescente del FS como indicador de la producción de $^1O_2$ [18, 20] y, en la *dosimetría explícita* se busca predecir la cantidad de $^1O_2$ generadodo en función de cantidades medibles, tales como; la distribución de la luz en el tejido y las concentraciones de oxígeno y de FS en estado base [18, 19].

En el presente trabajo se modeló la dosimetría explícita utilizando el mecanismo tipo II de la TFD. Fue considerado el mecanismo tipo II debido a que el daño ocacionado a las células anómalas y sanas con TFD depende principalmente de la cantidad de $^1O_2$

generado [19, 21, 22].

Para la interacción de la luz con el tejido se consideró la ecuación de difusión de la luz. Se propone una solución total que consta de una parte homogénea y una particular. Finalmente, la tasa de fluencia de energía que describe el comportamiento de la luz en el tejido, fue expresada en función de los coeficientes de absorción (μ_a), de dispersión reducido (μ'_s), de anisotropía (g), de términos derivados de estos tres coeficientes y de la irradiancia inicial (F_0).

Para el caso de la evolución temporal de la concentración de $^3O_2$, en la dinámica de las reacciones fotofísicas y fotoquímicas de TFD se añadió dos términos, P y Γ_{met}, los cuales representan respectivamente el incremento y la disminución en la concentración de $^3O_2$, ocacionados por el mecanismo de la respiración y por consumo metabólico.

Se realizó una simulación haciendo uso del software *Wolfram Mathematica 10.4 Student Edition*. Fue considerado el tejido humano normal como medio absorbente y dispersante de luz, lugar donde se estudian los efectos fotofísicos, fotoquímicos y biológicos de la TFD. La difusión de la luz con el tejido se dió únicamente en la segunda capa de la piel, la dermis. Se simuló la distribución espacial y temporal para las concentraciones de protoporfirina IX (PpIX) en estado base, de $^3O_2$ y de la dosis de $^1O_2$ con las irradiancias iniciales de 20, 60 y 150 [mW/cm^2], para un tiempo máximo de irradiación de 20 [min], y una profundidad máxima en la piel de 0.5 [cm].

Capítulo 2

Bases de la TFD y dosimetría

2.1. Terapia Fotodinámica

La TFD se encuentra entre las nuevas técnicas ópticas utilizadas en el área de la salud [1], es un método altamente selectivo en el tratamiento de carcinomas superficiales de la piel y otras enfermedades [2, 3]. Los aspectos fundamentales en TFD los constituyen el FS, las fuentes luminosas y el oxígeno del cuerpo [4].

Los pasos al realizar el tratamiento con TFD se los puede resumir de la siguiente manera [1-3]:

1. Administrar el FS en la lesión del paciente, ya sea de manera oral, intravenosa o tópica.

2. Esperar el tiempo de biodistribución, tal que, el FS sea absorbido por células anómalas y mínimamente por células sanas.

3. Irradiar con luz de una determinada longitud de onda sobre el área a ser tratada. Cuando el FS absorbe luz se producen reacciones químicas, cuyos productos son sustancias citotóxicas del oxígeno.

4. Finalmente, las sustancias citotóxicas del oxígeno destruyen a las células anómalas, con un mínimo daño a las células sanas. Y también, el FS es eliminado parcial o totalmente del cuerpo.

En la figura 2.1 se indica un esquema en la que se tiene que, el FS se encuentra absorbido tanto en células tumorales como sanas del tejido, y se irradia con luz roja solo la región a tratar. La luz con la que se irradia tiene como objetivo penetrar en el tejido, y activar al FS.

Los mecanismos de muerte celular que se relacionan con TFD son: apoptosis y necrosis celular [2]. La muerte de una célula provocada por estímulos extra e intracelulares se denomina apoptosis, en cambio, si la muerte de la célula ocurre a causa de

una disminución del flujo de sangre al tejido, la muerte celular se denomina necrosis [6, 7]. Una dosis de luz baja y una concentración baja de FS causan muerte celular por apoptosis, mientras que una concentración alta de FS y luz llevan a la muerte celular por necrosis [2, 6, 7].

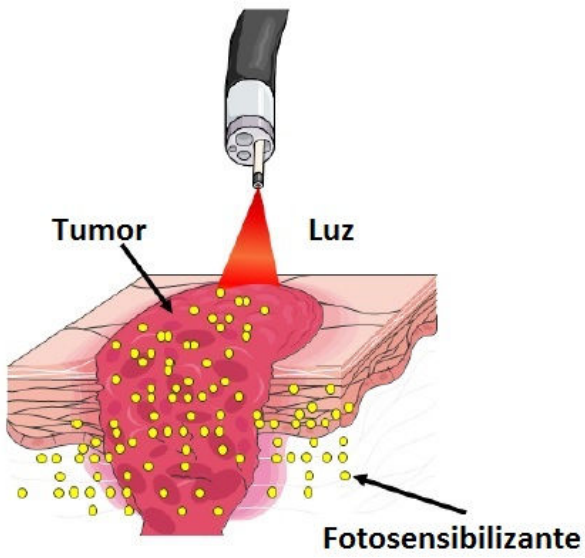


Figura 2.1: Mecanismo de acción en TFD. Adaptada de [25].

2.1.1. Historia de la Terapia Fotodinámica

El uso de la luz para fines terapeuticos se remonta hace cientos de años. Las culturas antiguas de Egipto, Grecia, India y China utilizaron la luz proveniente del Sol para sanar ciertos tipos de enfermedades. Su método consistía en exponer la región afectada a la acción de los rayos solares, este método era conocido como *helioterapia* [1, 2].

Tuvieron que pasar cientos de años para acoplar mecanismos menos rudimentarios y poder tener las técnicas ópticas con las que se cuenta actualmente. Es así que los eventos más relevantes en TFD inician en el año de 1924, cuando la hematoporfirina fué utilizada por primera vez por Policard, para el diagnóstico de tumores observando que la hematoporfirina producía fluorescencia rojiza en los tejidos tumorales, cuando el tejido era irradiado con luz ultravioleta [2, 5]. Cerca de 20 años después, en 1942 Auler y Banzer demostraron que los tumores fluorescentes necrosaban despues de ser expuestos a luz ultravioleta. En el año de 1948, Figge confirmó la afinidad que presentaba la hematoporfirina por los tejidos neoplásicos [2, 5]. A principios del año 1960, Lipson y Schwartz de la Clínica Mayo comprobaron también estos hechos, administraron hematoporfirina de manera intravenosa en pacientes con cáncer, y después de ser iluminados con luz ultravioleta aparecían puntos de luz fluorescentes en los tejidos tumorales. Lipson presentó derivados de la hematoporfirina (HpD) como FS que desde los años 80 se mantuvieron como los FSs más importantes en TFD, siendo un derivado

de hematoporfirina, el Photofrin, en ser el primer FS aprovado para uso clínico [2, 5, 7].

El primer caso tratado con TFD fué el de un cáncer de vejiga, en 1993 en Canadá, posteriormente, la TFD fue aprobada en Europa y Japón para el tratamiento del cáncer de pulmón, esófago, gástrico y cervical [2].

2.2. Fotosensibilizante

El efecto fototerapeutico en TFD se logra gracias al uso de un fármaco conocido como fotosensibilizante (FS), el cual puede ser administrado al paciente por vía intravenosa, oral o tópica. El FS es absorbido por células anómalas y sanas, con distinto tiempo de biodistribución. La absorción en las células anómalas ocurre en un menor tiempo, esto se debe principalmente a que las células anómalas (células tumorales por ejemplo) presentan un acelerado metabolismo [3], dando como resultado una mayor concentración de FS en ellas.

En el caso de lesiones en la piel, el FS se distribuye homogéneamente en la piel, es irradiado con luz de una determinada longitud de onda, cuyo propósito es dotar de energía al FS. Las moléculas del FS que absorben la radiación se llaman *cromóforos* [5]. La absorción de energía por parte del cromóforo dará como resultado el inicio de la dinámica de reacciones fotofísicas y fotoquímica en TFD, lo cual será discutido en la sección 2.6.

A lo largo de la historia los FSs han sido mejorados para su uso clínico. Un FS ideal es aquel que reúne las siguientes características [2, 4-6]:

- Que sea una sustancia químicamente pura.
- Que presente una síntesis a partir de precursores comúnmente disponibles, estable y soluble en fluidos corporales.
- Debe ser bajamente tóxico, con nula toxicidad en la oscuridad. Esta citotoxicidad debe darse exclusivamente en presencia de luz.
- Debe ser captado con mayor rapidez por células anómalas que por células sanas.
- Debe presentar una distribución homogénea en el tejido.
- Alta lipofilidad para difundirse a través de las membranas biológicas.
- Con un tiempo corto entre su administración y la acumulación máxima en las células anómalas.

- Debe ser activado por longitudes de onda que penetran en gran medida en el tejido.
- Debe ser capaz de producir grandes cantidades de producto citotóxico.

Algunos FSs que estan siendo utilizados en varias aplicaciones clínicas se indican en la siguiente tabla.

Nombre Genérico	**Nombre Químico**	**Uso Clínico**
Hexvix	Ácido hexilo δ-aminolevulínico	Cáncer de vejiga
Levulan	Ácido δ-Aminolevulínico (ALA)	Queratosis actínica
Metvix	Ácido metilo δ-aminolevulínico (MAL)	Carcinoma baso celular
Photofrin	Derivado de hematoporfirina	Cáncer de esófago
Photosense	Ftalocianina de aluminio	Cáncer de cabeza y cuello
Foscan	Meso-tetra hidroxifenil-cloro	Terapia paliativa de cáncer de cabeza y cuello

Tabla 2.1: Agentes fotosensibilizantes que han sido utilizados en aplicaciones clínicas. Adaptada de [6].

Los FSs frecuentemente utilizados en dermatología por vía tópica son: el ácido δ-aminolevulínico (ALA) y el ácido metilo δ-aminolevulínico (MAL), los cuales no son fotosensibles por sí mismo, sino, al ser absorbidos por células del tejido son transformados en moléculas sensibles a la luz [3, 5].

2.2.1. Ácido δ-aminolevulínico

La administración tópica del FS ALA estimula la síntesis del grupo hemo dentro de la célula, cuyo resultado final es la producción de porfirinas endógenas, principalmente de protoporfirina IX (PpIX) [2].

El ALA se sintetiza normalmente en el interior de la mitocondría por la reacción de condensación entre la glicina y el succinil Co A. Después de ser sintetizada, el ALA llega hasta la matriz citoplasmática (citosol), lugar donde se produce la formación de porfobilinógeno y posteriormente del uroporfirinógeno III, para finalmente retornar a la superficie interna de la membrana mitocondrial y formar la PpIX, a la cual se le incorporará Fe^{2+} por la acción de la enzima ferroquelatasa [25]. A todo este proceso se lo conoce como PpIX vía ALA o PpIX-ALA.

La PpIX es una molécula sensible a la luz, en la figura 2.2 se indican los espectros de absorción, donde se puede apreciar un pico máximo en 410 [nm] y cuatro picos pequeños en los alrededores de 510, 530, 580 y 633 [nm]. Este último pico de absorción puede ser utilizado para excitar a la PpIX en estado base, puesto que se encuentra dentro de la ventana terapeutica para TFD (figura 2.5).

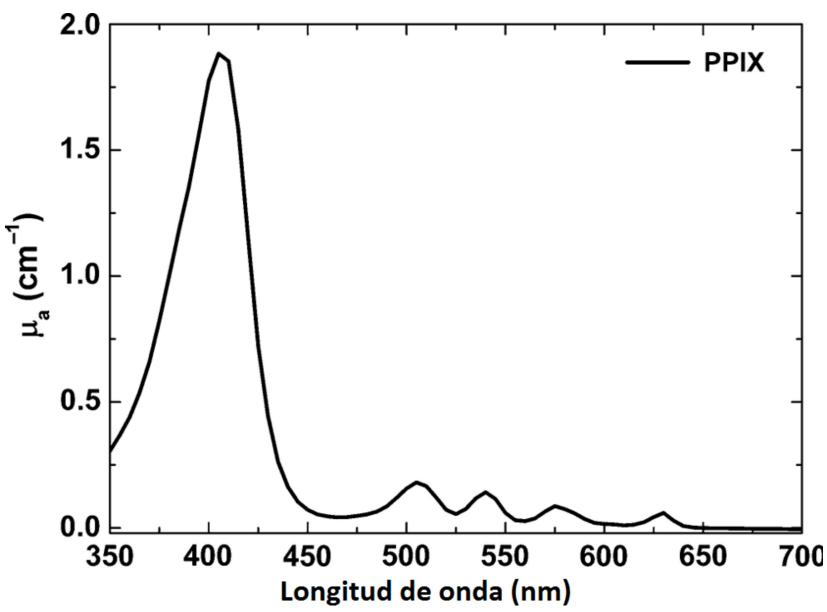


Figura 2.2: Espectros de absorción e intensidad de fluorescencia para la PpIX. Adaptada de [34].

El ALA presenta una buena solubilidad en las soluciones acuosas. Es absorbido rápidamente por células anómalas. Se elimina rápida y completamente del cuerpo después de 24 horas de haber sido colocado, haciendo posible un tratamiento diario con ALA [2, 25].

2.3. Interacción de la luz con el tejido

Como se indica en la figura 2.3, la piel presenta tres capas, siendo desde el exterior hacia el interior del cuerpo: la epidermis, la dermis y el tejido subcuténeo [23, 26].

Cada una de estas capas se componen de subcapas que a su vez se encuentran constituidas por células, de allí el hecho que los tejidos biológicos sean tratados como medios turbios [8, 9, 26]. En la epidermis se encuentran los melanocitos, los cuales son células encargadas de dar la pigmentación de la piel. En la dermis y en el tejido subcutáneo se encuentran los vasos sanguíneos, los cuales son de interés en TFD debido a que aportan con oxígeno a la región a tratar [23].

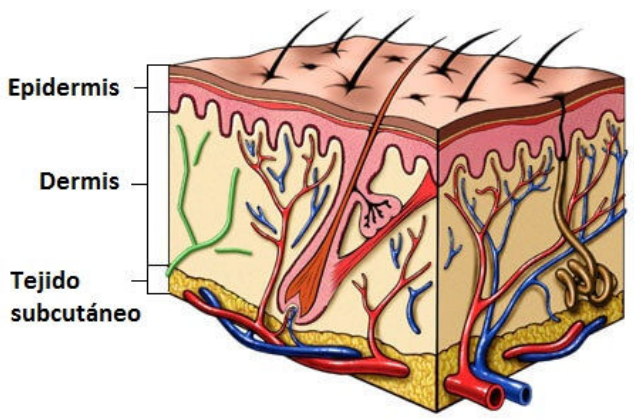
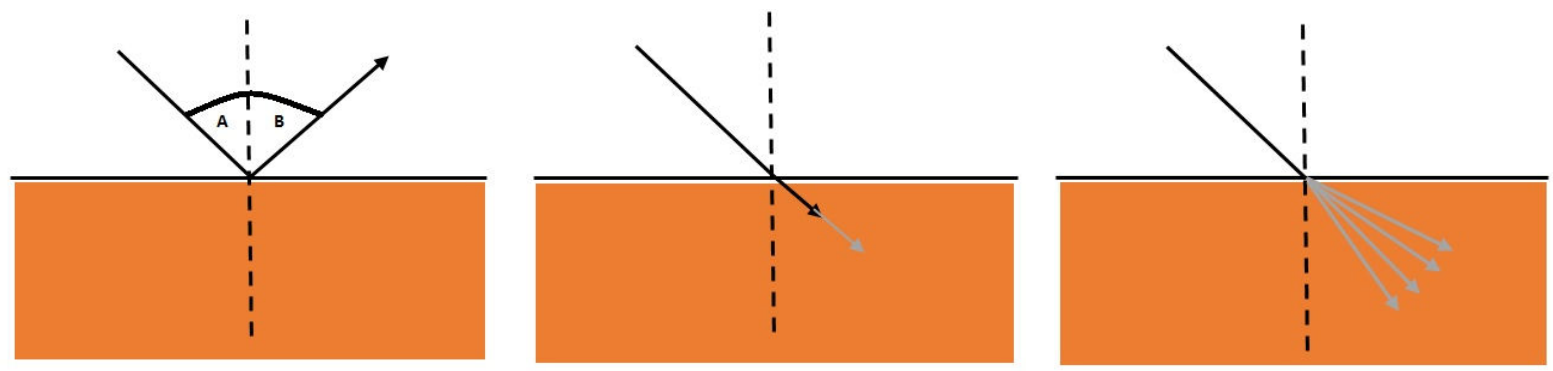


Figura 2.3: Capas de la piel. Adaptada de [7].

Cuando la luz incide sobre el tejido biológico experimenta principalmente efectos de reflexión, absorción y dispersión [6]. Como se indica en la figura 2.4.



(a) Reflexión (b) Absorción (c) Dispersión

Figura 2.4: Propiedades ópticas del tejido.

Aproximadamente el 70 % de fotones que impacta en la superficie son reflejados, este porcentaje varía de acuerdo a la longitud de onda de los fotones [7-10]. En TFD los fotones absorbidos son de mayor interés, dado que estos darán inicio a las reacciones fotofísicas, fotoquímicas y biológicas.

Las propiedades ópticas del tejido, y de interés en TFD son descritas por los coeficientes de absorción, de dispersión y de anisotropía [4, 6-10].

2.3.1. Coeficiente de absorción

La absorción es el proceso por el cual el cromóforo adquiere la energía del fotón incidente, dando como resultado la excitación del cromóforo. Si no existiera absorción no se daría el efecto terapéutico en TFD. El efecto terapéutico se produce en la región del rojo e infrarojo que es conocido como ventana óptica para TFD [6]. Esto es, longitudes de onda en el rango de 600 a 800 nm son considerados óptimas para TFD, dado que la energía de cada fotón es lo suficientemente alta para excitar al FS, y a la vez, es lo suficientemente baja para que la luz penetre en el tejido.

Los cromóforos del tejido de la piel más importantes que absorben luz en la región visible, y cercana al infrarrojo son: el agua, la oxihemoglobina (HbO_2), la deoxihemoglobina $Hb(H_2O)$ y la melanina [6, 10], figura 2.5.

El coeficiente de absorción denotado como μ_a, se expresa como la probabilidad de que un fotón que incide en el tejido sea absorbido en una distancia infinitesimal [8, 10]. La unidad de medida es el m^{-1}, aunque normalmente se utilizan los cm^{-1} o los mm^{-1}.

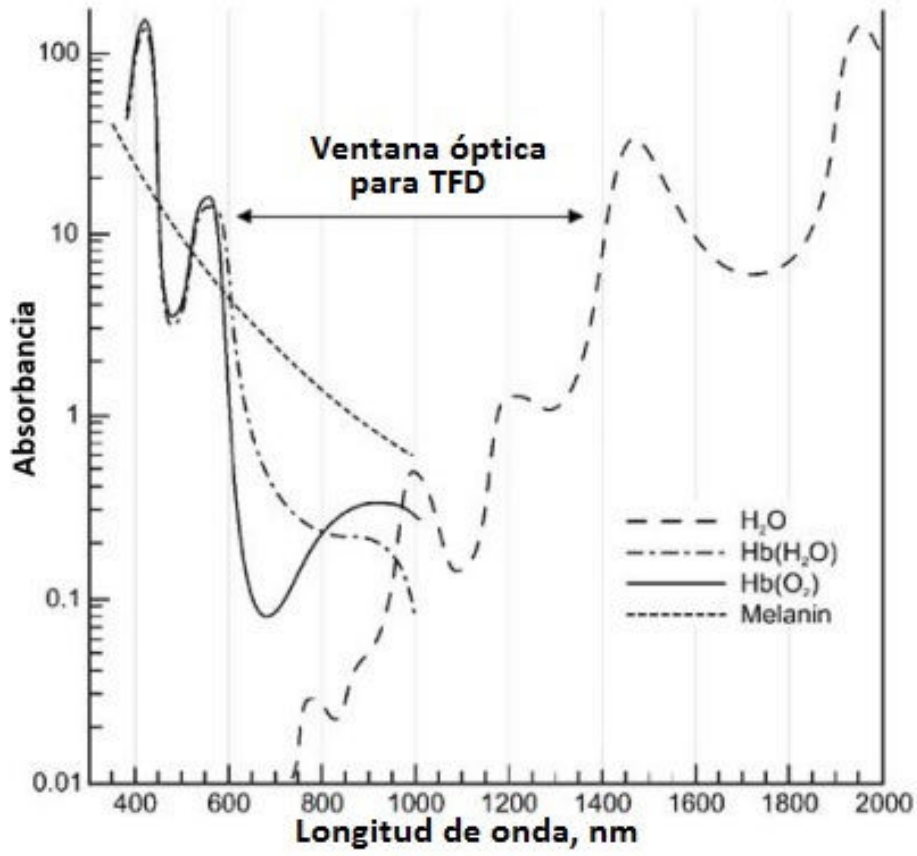


Figura 2.5: Espectro de absorción de los principales cromóforos del tejido en función de la longitud de onda. La oxihemoglobina tiene tres picos de absorción, uno a 418 nm, a 542 nm, y otro alrededor de los 900 nm, similarmente a la desoxihemoglobina. El agua constituye gran cantidad de los tejidos, es fuertemente absorbente entre 700 y 2000 nm. La melanina disminuye la absorción al aumentar la longitud de onda. Adaptada de [6]

2.3.2. Coeficiente de dispersión

El coeficiente de dispersión denotado como μ_s, está definido como la probabilidad de que un fotón sea dispersado en una distancia infinitesimal [8, 10]. Al igual que el coeficiente de absorción su unidad de medida es el m^{-1}.

La dispersión inelástica (dispersión de Brillouin y dispersión Raman) no tienen un rol importalte en la interacción de la luz con el tejido, en cambio, la dispersión elástica (dispersión Rayleigh y dispersión Mie) describe completamente los efectos observados en el tejido [6, 9]. La dispersión y refracción producen un cambio en la dirección de los fotones incidentes.

Por otra parte, conforme la luz penetra en las capas de la piel, tanto la dispersión como la absorción dan como resultado una disminución en la intensidad de luz. La reducción en la intensidad causada por estos procesos puede ser descrita por una función exponencial similar a la ley de Beer-Lambert [6].

$$I(z) = I_0 e^{-(\mu_a + \mu_s)z} \tag{2.1}$$

La intensidad a una profundidad z dada, puede ser calculada por la ecuación (2.1), donde $I(z)$ es la intensidad a una profundidad z, e I_0 es la intensidad en la superficie entre los dos medios.

2.3.3. Coeficiente de anisotropía

El coeficiente de anisotropía denotado por la letra g involucra el ángulo con el que se desvía un fotón, después de haber experimentado una dispersión. Se lo define como el promedio del coseno del ángulo de dispersión [9].

$$g =< cos(\theta) > \tag{2.2}$$

También, puede ser expresada en términos de una función de fase denotada como $p\left(\widehat{s}, \widehat{s}'\right)$, donde $\widehat{s}$ y $\widehat{s}'$ son vectores unitarios. La función de fase $p\left(\widehat{s}, \widehat{s}'\right)$ describe la cantidad de luz dispersada en la dirección con vector unitario $\widehat{s}'$ desde la dirección con vector unitario $\widehat{s}$ [9].

$$g = \frac{\int_{4\pi}(\widehat{s}, \widehat{s}')\, p\left(\widehat{s}, \widehat{s}'\right)\, ds'}{\int_{4\pi} p\left(\widehat{s}, \widehat{s}'\right)\, ds'} \tag{2.3}$$

El valor de g en el tejido está entre 0.75 a 0.95, siendo generalmente de alrededor de 0.9 [8-10].

Finalmente, se define el coeficiente de dispersión reducido como una función de g y de μ_s [9]:

$$\mu_s' = (1 - g)\mu_s \tag{2.4}$$

El cual expresa la probabilidad de que un fotón sea dispersado en un medio isotrópico por unidad de longitud y, este coeficiente es frecuentemente utilizado en la descripción de las propiedades ópticas de los tejidos.

2.4. Interacción de la luz con moléculas

La luz como una onda electromagnética interactúa con la materia a través de fotones o cuantos de luz. En esta interacción, un fotón puede ser absorbido o dispersado por la molécula, como se explicó en la sección anterior. Para el caso de la absorción, la molécula pasará desde un estado base de baja energía hacia un estado excitado de mayor energía [6, 8].

El estado excitado de una molécula es un estado inestable, en el que la molécula podría colisionar con moléculas de su alrededor, trasmitiendo parte de su energía o desactivarse cediendo energía a través de alguno de los siguientes procesos no radiativos [2, 7-10]:

- *Relajación vibracional* (RV). La molécula, al sufrir choques con otras moléculas, pierde energía rápidamente en el orden de $10^{-12}s$. La molécula pierde energía

hasta que se sitúa en el subnivel más bajo de energía del estado excitado en el que se encuentra.

- *Conversión interna* (CI). La molécula pasa de un nivel energético vibracional excitado a otro de menor energía, pero de mayor energía con relación al estado base.

- *Cruce entre sistemas* (CES). Se produce cuando la molécula pasa desde un estado excitado singlete hacia un estado excitado triplete, o viceversa. El estado triplete tiene menor energía que el singlete excitado. La transición singlete - triplete es prohibida, por lo cual ocurre en pocos nanosegundos.

- *Fluorescencia.* Es observada cuando la molécula retorna al estado basal desde un estado excitado singlete. En este proceso la molécula emite radiación de menor frecuencia que la absorbida durante la excitación.

- *Fosforescencia.* Es observada si la molécula retorna al estado base desde un estado triplete. En este proceso al igual que en la fluorescencia, la molécula emite radiación de menor frecuencia que la absorbida durante la excitación.

- *Desactivación molecular o quenching* es un proceso de transferecia de energía, en el que la molécula excitada choca con otra molécula que se encuentra en el estado base, transfiriendo de esta manera su energía. La primera molécula pasa al estado base, mientras que la molécula vecina pasa a un estado excitado.

Los procesos que ocurren entre los distintos niveles electrónicos de energía de una molécula son ilustrados en un diagrama de Jablonski (figura 2.6).

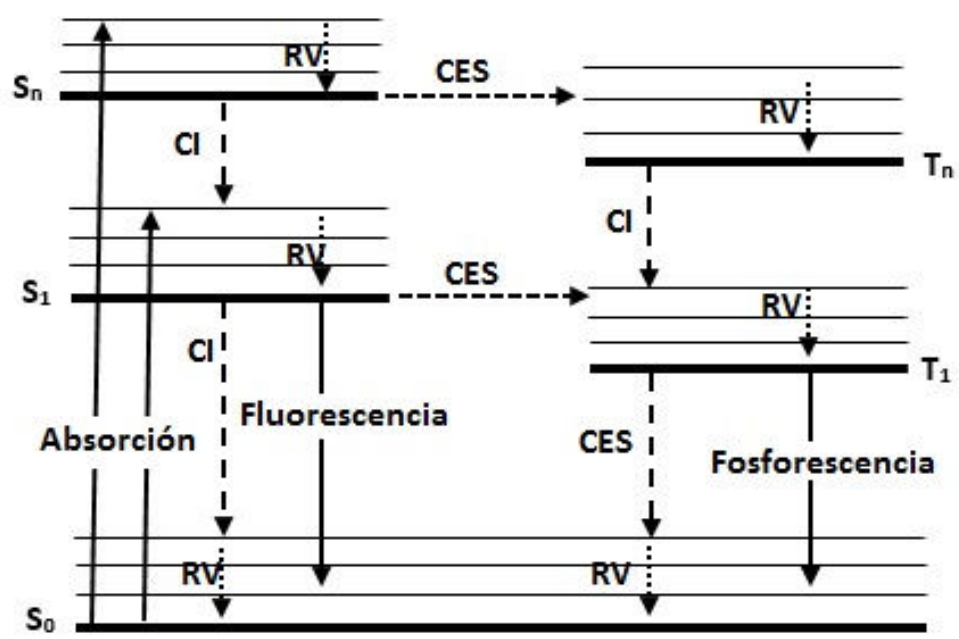


Figura 2.6: Diagrama de Jablonski.

En la figura 2.6 se indica que la absorción de un fotón por parte de una molécula que se encuentre en el estado base singlete (S_0), permite a dicha molécula pasar a un estado singlete excitado denotados por S_1 o S_n, dependiendo de la cantidad de energía que absorbió S_0. Si la molécula llega hasta el estado excitado S_n, la inestabilidad de este estado hará que la molécula sufra una relajación vibracional hasta llegar a un subnivel de menor energía del estado S_n, y se de una conversión interna hasta llegar al estado S_1. Desde S_1 puede retornar al estado base (S_0) emitiendo un fotón de fluorescencia, o por conversión interna acompañada de una relajación vibracional, también podría darse un cruce entre sistemas pasando a un estado excitado triplete (T_1), el cual es respectivamente de menor y mayor energía que los estados S_1 y S_0. El cruce intersistemas podría también observarse entre los estados S_n y T_n. Si la molécula se encuentra en en el estado T_1 podría retornar al estado base por fosforescencia o cruce entre sistemas nuevamente más una relajación vibracional.

2.5. El rol del oxígeno en TFD

El oxígeno molecular (O_2) es de gran interés por ser un elemento esencial en los procesos de respiración en las células vivas. El mecanismo de la respiración en los seres vivos es el medio por el cual cada célula del cuerpo adquiere oxígeno y elimina dióxido de carbono [26]. El O_2 es un elemento necesario en TFD, la presencia de O_2 en los tejidos condiciona su eficiencia. A su vez la TFD afecta los niveles de oxigenación al tejido, causando una depleción de la oxigenación tisular por consumo de O_2 en las reacciones fotoquímicas [11, 32, 33].

En la figura 2.7 se describen las configuraciones electrónicas para el oxígeno en estado base y estados excitados. La función de onda para el orbital molecular no ocupado de más baja energía es representado por el orbital LUMO a, o también conocido simplemente como LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital), y la función de onda para los orbitales ocupados de más alta engía están representados por el orbital LUMO b u HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) [7].

En la figura 2.7, el estado $^3\Sigma$ es el estado basal para el O_2, también se utiliza la notación $^3O_2$ para describir a este estado. Aquí cada uno de los orbitales degenerados p, con números magnéticos +1 y -1 son respectivamente π^*_{+1} y π^*_{-1}, se ocupan de manera separada de los espines de los electrones no apareados. Por lo tanto, el estado fundamental del O_2 es un estado triplete.

Por otro lado, si los dos electrones comparten el mismo orbital degenerado π^*_{+1}, los espines son opuestos, y a este estado excitado se lo conoce como $^1\Delta$. En cambio, si los dos electrones con espines opuestos se encuentran en diferentes orbitales degenerados π^*, es decir, un electrón se encuentra en π^*_{+1} y el otro en π^*_{-1}, generan un estado excitado

singlete, denominado $^1\Sigma$ [7]. De lo cual se habla a continuación.

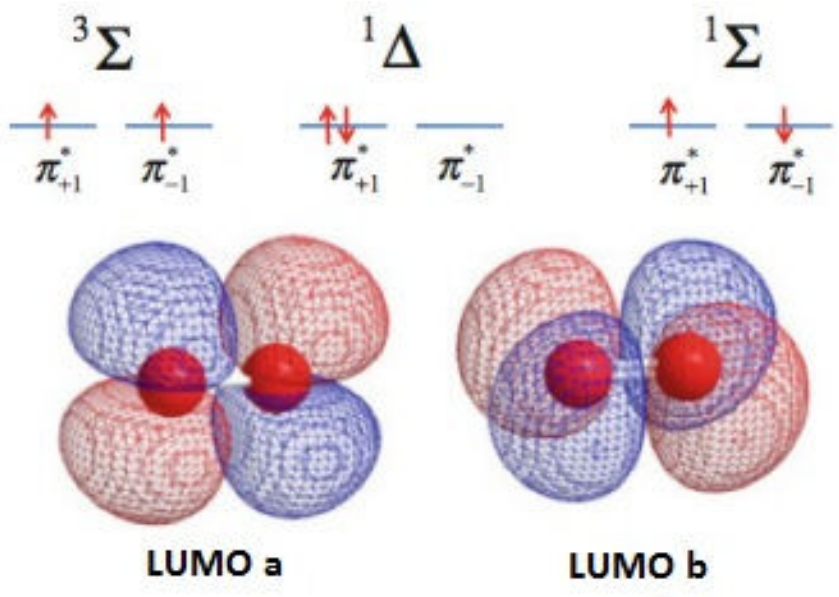


Figura 2.7: Configuraciones electrónicas relacionadas con el estado base y los estados excitados $^1\Delta$, $^1\Sigma$ del O_2. Adaptada de la referencia [7].

2.5.1. Oxígeno singlete

Las energías de los estados excitados más bajos del O_2 son 94 kJ/mol para $^1\Delta$ y 157 kJ/mol para $^1\Sigma$ por encima del estado basal $^3\Sigma$. El estado $^1\Sigma$ es de muy corta vida media (7-12 μs en fase gaseosa [6, 7]) y se relaja rápidamente al estado excitado $^1\Delta$, el cual es conocido frecuentemente como oxígeno singlete, denotado más frecuentemente como $^1O_2$.

El $^1O_2$ puede ser producido por la transferencia de energía de moléculas en estados excitados singlete o triplete. Si la molécula donante se encuentra en el estado singlete, como ya se comentó el oxígeno en estado base se encuentra en un estado triplete, y la relación singlete-triplete debe superar una energía mayor a 90 kJ/mol para que el $^3O_2$ sea tranferido a $^1\Delta$ [7], por otro lado, debido a la corta vida útil del singlete excitado de la molécula donante, la interacción singlete-triplete debe ocurrir en pocos nanosegundos, convirtiendose en una transición prohibida. Por lo tanto, los estados excitados tripletes de moléculas donante son el método habitual para generar $^1O_2$.

Finalmente, el $^1O_2$ es importante en TFD dado que es altamente citotóxico, causando daño a los tejidos y muerte celular por afectar a estructuras subcelulares. Su radio de acción es menor a 0.02 mm y el tiempo de vida está en alrededor de 0.04 ms [2, 10-12].

2.6. Modelo dinámico para TFD

En la sección 2.4 se explicó los procesos no radiativos que se dan en la interacción de la luz con moléculas. También en la sección 2.2 se mencionó que las moléculas del

FS que absorben energía en forma de luz son los cromóforos. En esta sección, en la figura 2.8 se representan los procesos no radiativos que sufre el cromóforo del FS, y las consecuentes reacciones químicas que se dan.

Las consecuencias de las interacciones del estado T con moléculas de su entorno y con el $^3O_2$ dan como resultado dos tipos de reacciones fotoxidativas [6, 12]. Las cuales serán descritas en las subseciones siguientes.

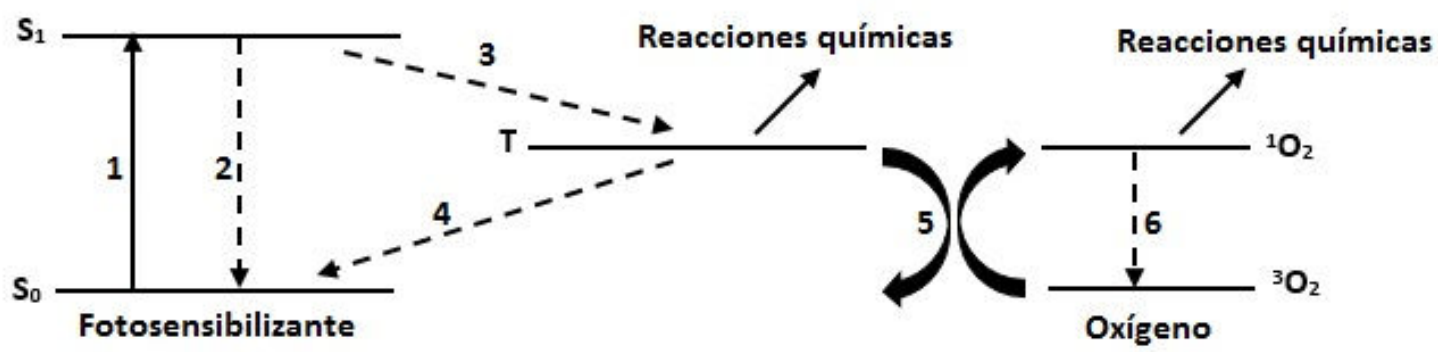


Figura 2.8: Mecanismos tipo I y II de TFD: 1-absorción de la luz; 2-fluorescencia; 3-cruce intersistemas; 4-fosforescencia; 5-desactivación molecular; 6-fosforescencia.

2.6.1. Mecanismo tipo I

En este mecanismo existe una reacción directa entre el cromóforo y la célula. Se lo obtiene cuando el estado triplete del cromóforo reacciona con un sustrato, como la membrana celular o la mitocondria por ejemplo, y existe transferencia de un electrón o protón formando un catión o anión respectivamente. Esto permite producir una forma radical del cromóforo [6]. Esta forma radical puede reaccionar con el $^3O_2$ resultando en productos tales como: radical superóxido O_{2-}, peróxido de hidrógeno H_2O_2 y radicales hidroxilos OH; los denominados radicales libres de oxígeno (ROS) [6, 12], y los cuales inician reacciones en cadena de radicales libres con moléculas de su alrededor.

2.6.2. Mecanismo tipo II

En este caso, el cromóforo en estado triplete (T) transfiere energía al $^3O_2$ para formar $^1O_2$, y el cromóforo en estado T retorna al estado base S_0. Como se mencionó en la sección 2.5, esta forma de oxígeno es altamente reactiva, atacando a la mayoría de moléculas de su entorno.

Tanto el mecanismo tipo I y II ocurren simultáneamente y en competición, sin embargo, el $^1O_2$ es el mayor responsable del daño tisular producido por TFD [12, 15, 16]. Por tal motivo, es de nuestro interés estudiar la dinámica de las reacciones en TFD provocadas por este mecanismo. A continuación se presenta un diagrama de

Jablonski para el mecanismo tipo II, del cual se partirá para describir la dinámica de las reacciones presentes en TFD.

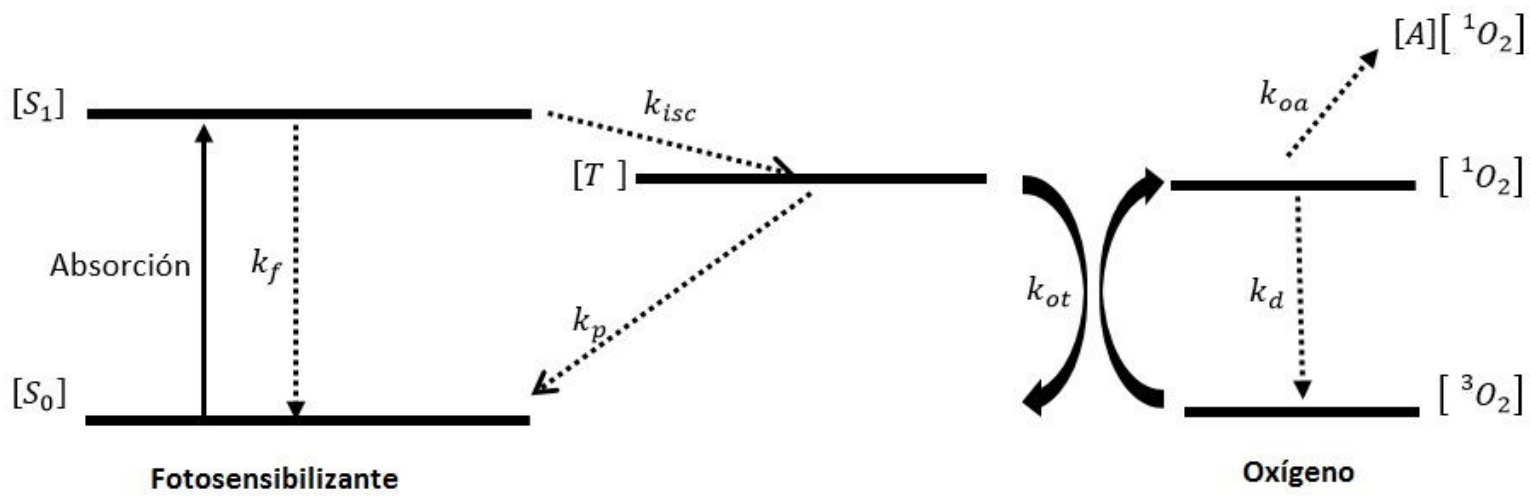


Figura 2.9: Diagrama de Jablonski para el mecanismo tipo II en TFD.

Es de interés estudiar la concentración molar de los estados S_0, S_1, T, $^3O_2$ y $^1O_2$. Por lo tanto, los términos entre corchetes representarán las concentraciones molares medidas en unidades de μM (micromolar). Las constantes k_f, k_{isc}, k_p, k_{ot}, k_d, y k_{oa} estan definidas en la tabla 2.2.

En la figura 2.9 se observan colocados los procesos no radiativos del cromóforo, en el cual se aprecia que una concentración de cromóforos en estado base absorben energía, para formar una concentración de cromóforo en estado singlete excitado. A partir de esta nueva concentración, los cromóforos pueden retornar al estado base por fluorescencia, o dar lugar a un cruce entre sistemas hasta el estado triplete. La concentración de cromóforo que se encuentran en el estado triplete pueden decaer al estado base por fosforescencia o, desactivarce cediendo energía a una concentración de oxígenos en estados tripletes, esta energía cedida se usará para producir una concentración de $^1O_2$, la cual interactuará con alguna concentración de biomoléculas blanco, denotadas por $[A]$.

A continuación se describe la dinámica de las reacciones fotoquímicas que están presentes en un modelo usual de TFD basado en el mecanismo tipo II. Esta dinámica está descrita por un sistema de ecuaciones diferenciales [13-15, 23, 24].

$$\frac{d[S_0]}{dt} = -\frac{\sigma F_{ex}}{h\nu}[S_0] + k_f[S_1] + k_p[T] + k_{ot}[T][^3O_2] - k_{os}([S_0] + \delta)[^1O_2], \tag{2.5}$$

$$\frac{d[S_1]}{dt} = \frac{\sigma F_{ex}}{h\nu}[S_0] - k_f[S_1] - k_{isc}[S_1], \tag{2.6}$$

$$\frac{d[T]}{dt} = k_{isc}[S_1] - k_p[T] - k_{ot}[T][^3O_2], \tag{2.7}$$

$$\frac{d[^3O_2]}{dt} = -S_\Delta k_{ot}[T][^3O_2] + k_d[^1O_2], \tag{2.8}$$

$$\frac{d[^1O_2]}{dt} = S_\Delta k_{ot}[T][^3O_2] - k_d[^1O_2] - k_{oa}[A][^1O_2] - k_{os}([S_0] + \delta)[^1O_2], \tag{2.9}$$

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_{oa}[A][^1O_2], \tag{2.10}$$

El primer término de la derecha en (2.5) y (2.6), representa la tasa de absorción de fotones, donde F_{ex} es la tasa de fluencia de energía medida en unidades de mW/cm^2, este término involucra la interacción de la luz con el tejido. S_Δ es la fracción de desactivación molecular, entre el estado triplete del FS con el estado triplete del oxígeno, que reaccionan para producir $^1O_2$. Las constantes de transición y concentraciones se encuentran descritos en la tabla 2.2.

Símbolo	**Definición**	**Unidad**
$[S_0]$	Concentración del cromóforo en estado base	$[\mu M]$
$[S_1]$	Concentración del cromóforo en el primer estado excitado	$[\mu M]$
$[T]$	Concentración del cromóforo en el estado triplete	$[\mu M]$
$[^3O_2]$	Concentración de oxígeno en el estado triplete	$[\mu M]$
$[^1O_2]$	Concentración de oxígeno en el estado singlete	$[\mu M]$
$[A]$	Concentración de biomoléculas	$[\mu M]$
δ	Concentración de S_0 donde la distancia intermolecular es igual a d	$[\mu M]$
k_f	Constante de velocidad para el decaimiento de S_1 a S_0	$[s^{-1}]$
k_p	Constante de velocidad para el decaimiento de T a S_0	$[s^{-1}]$
k_{isc}	Constante de velocidad para el decaimiento de S_1 a T	$[s^{-1}]$
k_d	Constante de velocidad para el decaimiento de $^1O_2$ a $^3O_2$	$[s^{-1}]$
k_{ot}	Bimolecular constante de velocidad para la reacción de $^3O_2$ con T	$[M^{-1}s^{-1}]$
k_{os}	Bimolecular constante de velocidad para la reacción de $^1O_2$ con S_0	$[M^{-1}s^{-1}]$
k_{oa}	Bimolecular constante de velocidad para la reacción de $^1O_2$ con A	$[M^{-1}s^{-1}]$
S_Δ	Fracción de T y $^3O_2$ que reaccionan para producir $^1O_2$	–
σ	Sección transversal de absorción	$[cm^2]$
$h\nu$	Energía de activación del cromóforo	$[J]$
F_{ex}	Tasa de fluencia de energía	$[\frac{mW}{cm^2}]$

Tabla 2.2: Definición de estados, constantes y términos de interés usadas en la obtención del modelo dinámico para TFD por el mecanismo tipo II.

Los últimos terminos de las ecuaciones (2.5) y (2.9), representan la reacción del estado base del coromóforo con el $^1O_2$. Dado que el $^1O_2$ es generado en las proximidades de la molécula de S_0 y, dada la corta distancia de difussión, hay una gran probabilidad que reaccione el $^1O_2$ con la molécula de S_0 que lo generó. Si la concentración de S_0

es baja entonces, la molécula de S_0 con la cual puede reaccionar el $^1O_2$ es únicamente la molécula de S_0 que lo generó [12, 15]. Este efecto es incorporado en (2.5) y (2.9) añadiendo la constante δ, la cual representa la concentración mínima efectiva de FS. Si el $^1O_2$ puede difundirse una distancia d antes de que este reaccione con una molécula adyacente del FS, el valor de δ viene dado por [15]:

$$\delta = \frac{1}{d^3 N_A}, \tag{2.11}$$

donde N_A el número de Avogadro. La distancia d está relacionada con el tiempo de vida media del $^1O_2$, τ_Δ, se la determina a partir de $d = \sqrt{6D^*\tau_\Delta}$, aquí D^* es el coeficiente de difusión para el $^1O_2$ en las células.

2.7. Dosimetría en Terapia Fotodinámica

El daño ocacionado a las células anómalas y sanas con TFD depende principalmente de la cantidad de $^1O_2$ generado [19, 21, 22]. Para el análisis de la Dosimetría en TFD se reconocen tres mecanismos destinados a evaluar el daño celular provocado por una concentración efectiva de FS [16-20]. Al daño celular en TFD, también se lo conoce como dosis de $^1O_2$, el cual será discutido en el siguiente capítulo.

2.7.1. Dosimetría directa

La dosimetría directa se basa en la detección inmediata de la producción de $^1O_2$ a través de la fosforescencia del mismo, o de la fluorescencia de moléculas sensibles a este estado. En dosimetría directa, la luminiscencia (fotones $cm^{-3}s^{-1}$) a 1270 nm (L_{1270}) es monitoreada durante el tratamiento. La colección de luminiscencia del $^1O_2$ con fines para dosimetria ha sido llamada SOLD (singlet oxygen luminescence dosimetry) [17, 18, 20].

2.7.2. Dosimetría implícita

La dosimetría implícita mide el decaimiento fluorescente del FS como indicador de la producción de $^1O_2$. La dosimetría implícita es la cuantificación del fotoblanqueamiento del FS. El fotoblanqueamiento es causado por el $^1O_2$ que se forma en las proximidades del FS en estado base [18, 20].

2.7.3. Dosimetría explícita

La dosimetría explícita busca predecir la cantidad de $^1O_2$ producido en función de cantidades medibles, tales como [18, 19]:

- La distribución de la luz en el tejido.
- La concentración de oxígeno en la región a tratar.
- Concentración del FS.

Esta última dosimetría será estudiada en el presente trabajo de titulación en los siguientes capítulos.

Capítulo 3

Cálculo de la dosis de $^1O_2$ generado en TFD con consideraciones fisiológicas sobre el $^3O_2$

Como se mencionó en la sección 2.7, la dosis de $^1O_2$ generada en TFD hace referencia a la concentración de $^1O_2$ que se encuentra atacando a una concentración de biomoléculas. La dosimetría explícita trata de predecir la cantidad de $^1O_2$ generado en TFD a partir de las concentraciones de oxígeno, de FS en estado base y de la difusión de la luz en el tejido.

Por tal motivo, en este capítulo se realiza un análisis más detallado a cerca del mecanismo tipo II de la TFD, en el cual se describen dos expresiones matemáticas relacionadas con consideraciones fisiológicas que se encuentran actuando sobre el oxígeno molecular triplete.

Por otro lado, para la interacción de la luz con el tejido, se encuentra una solución para la ecuación de difusión de la luz en el tejido.

Finalmente se determina la dosis de $^1O_2$ producido en TFD como una función de las concentraciones de $^3O_2$, de S_0 y de la difusión de la luz en el tejido.

3.1. Formaciones instantáneas de $[S_1]$, $[T]$ y $[^1O_2]$

Para los estados S_1, T y $^1O_2$ se considera un tiempo muy corto de vida media, de alrededor de los 10^{-11} a 10^{-7} segundos [6, 12], por tal razón para estudiar los cambios temporales en $[S_0]$, $[^3O_2]$ y $[A]$ se procederá a analizar el estado estacionario en las ecuaciones (2.6), (2.7) y (2.9). Los resultados reflejarán las formaciones instantáneas de $[S_1]$, $[T]$ y $[^1O_2]$.

Para $\frac{d[S_1]}{dt} = 0$, se tiene

$$[S_1] = \frac{1}{k_f + k_{isc}} \frac{\sigma F_{ex}}{h\nu} [S_0], \tag{3.1}$$

Para $\frac{d[T]}{dt} = 0$, se tiene

$$[T] = \frac{k_{isc}[S_1]}{k_p + k_{ot}[^3O_2]}, \tag{3.2}$$

introduciendo (3.1) en (3.2)

$$[T] = \frac{\phi_t}{k_p + k_{ot}[^3O_2]} \frac{\sigma F_{ex}}{h\nu} [S_0], \tag{3.3}$$

donde $\phi_t = \frac{k_{isc}}{k_f + k_{isc}}$. La fracción de estados tripletes que son retornados al estado S_0 por el $^3O_2$ es conocida como eficiencia de estados tripletes desactivados (triplet quenching efficiency) [12], y matemáticamente se expresa como (3.4).

$$T_{[^3O_2]} = \frac{[^3O_2]}{\frac{k_p}{k_{ot}} + [^3O_2]} \tag{3.4}$$

Para $\frac{d[^1O_2]}{dt} = 0$, se tiene

$$[^1O_2] = \frac{S_\Delta k_{ot}[T][^3O_2]}{k_d + k_{oa}[A] + k_{os}([S_0] + \delta)}, \tag{3.5}$$

Como $k_{os}([S_0] + \delta) << k_{oa}[A]$ debido a que la concentración de biomoléculas es exageradamente grande en relación a $[S_0]$ [12-15]. Razón por la cual un tratamiento con TFD suele durar varias sesiones médicas. Se obtiene la expresión:

$$[^1O_2] \approx \frac{S_\Delta k_{ot}[T][^3O_2]}{k_d + k_{oa}[A]}, \tag{3.6}$$

Reemplazando (3.3) en (3.6) y manipulando constantes, se obtiene

$$[^1O_2] = S_\Delta \phi_t \left(\frac{1}{k_d + k_{oa}[A]} \right) \left(\frac{[^3O_2]}{\frac{k_p}{k_{ot}} + [^3O_2]} \right) \frac{\sigma F_{ex}}{h\nu} [S_0] \tag{3.7}$$

Las ecuaciones (3.1), (3.3) y (3.7) representan las formaciones instantáneas de $[S_1]$, $[T]$ y $[^1O_2]$ respectivamente. Estas ecuaciones han sido desarrolladas de tal manera que dependan de $[S_0]$, $[^3O_2]$, $[A]$ y la tasa de fluencia de energía (F_{ex}).

Para el análisis del cambio temporal en $[S_0]$, $[^3O_2]$ y $[A]$ se procederá a reemplazar las ecuaciones (3.1), (3.3) y (3.7) en (2.5), (2.8) y (2.10) haciendo manipulaciones algebraicas. Para suprimir términos constantes, se utilizarán los siguientes coeficientes constantes [19, 23, 24]:

$$\mu = \frac{k_{os}}{k_{oa}[A]}, \tag{3.8}$$

$$\xi = S_{\Delta}\phi_t \frac{\sigma}{h\nu} \frac{k_{oa}[A]}{k_d + k_{oa}[A]}, \tag{3.9}$$

y

$$\beta = \frac{k_p}{k_{ot}} \tag{3.10}$$

3.1.1. Evolución temporal de $[S_0]$

Para la evolución temporal de la concentración del cromóforo en estado base, y que se encuentra interactuando con el $^1O_2$. Se utiliza (3.1) y (3.3) en (2.5), con lo cual se obtiene (3.11)

$$\frac{d[S_0]}{dt} = -k_{os}([S_0] + \delta)[^1O_2], \tag{3.11}$$

Ahora, reemplazando la ecuación (3.7) en (3.11) y manipulando coeficientes, se obtiene la ecuación (3.12)

$$\frac{d[S_0]}{dt} = -S_{\Delta}\phi_t \frac{\sigma F_{ex}}{h\nu} \left(\frac{k_{os}}{k_d + k_{oa}[A]} \right) \left(\frac{[^3O_2]}{\frac{k_p}{k_{ot}} + [^3O_2]} \right) ([S_0] + \delta)[S_0], \tag{3.12}$$

Utilizando (3.8), (3.9) y (3.10) en (3.12)

$$\frac{d[S_0]}{dt} = -\mu\xi F_{ex} \left(\frac{[^3O_2]}{\beta + [^3O_2]} \right) ([S_0] + \delta)[S_0], \tag{3.13}$$

La cual es una ecuación que solo depende de la tasa de fluencia de energía y, de $[S_0]$ y $[^3O_2]$, dado que μ, ξ y δ son considerados constantes.

3.1.2. Evolución temporal de $[^3O_2]$

Para el cambio temporal en la concentración de oxígeno triplete se reemplaza (3.6) en (2.8) y, realizando manipulaciones algebraicas se obtiene (3.14)

$$\frac{d[^3O_2]}{dt} = S_{\Delta}k_{ot}[T][^3O_2] \left(\frac{k_d}{k_d + k_{oa}[A]} - 1 \right) + P - \Gamma_{met}, \tag{3.14}$$

Adicionalmente, se han colocado dos nuevos términos, P y Γ_{met}, los cuales representan respectivamente el incremento y disminución de $[^3O_2]$ por unidad de tiempo, debido a factores fisiológicos, los cuales serán tratados en las secciones 3.2 y 3.3.

Introduciendo (3.3) en (3.14) y desarrollando el término entre paréntesis

$$\frac{d[^3O_2]}{dt} = -S_\Delta k_{ot} \frac{\phi_t}{k_p + k_{ot}[^3O_2]} \frac{\sigma F_{ex}}{h\nu} [S_0][^3O_2] \left(\frac{k_{oa}[A]}{k_d + k_{oa}[A]} \right) + P - \Gamma_{met}, \tag{3.15}$$

reacomodando términos,

$$\frac{d[^3O_2]}{dt} = -S_\Delta \phi_t \frac{\sigma F_{ex}}{h\nu} \left(\frac{k_{oa}[A]}{k_d + k_{oa}[A]} \right) \left(\frac{[^3O_2]}{\frac{k_p}{k_{ot}} + [^3O_2]} \right) [S_0] + P - \Gamma_{met}, \tag{3.16}$$

y utilizando las ecuaciones (3.9) y (3.10) en (3.16), se obtiene la expresión para la evolución temporal de $^3O_2$.

$$\frac{d[^3O_2]}{dt} = -\xi F_{ex} \left(\frac{[^3O_2]}{\beta + [^3O_2]} \right) [S_0] + P - \Gamma_{met}, \tag{3.17}$$

3.1.3. Evolución temporal de $[A]$

Para la evolución temporal de $[A]$, se sustituye (3.7) en (2.10)

$$\frac{d[A]}{dt} = -S_\Delta \phi_t \frac{\sigma F_{ex}}{h\nu} \left(\frac{k_{oa}[A]}{k_d + k_{oa}[A]} \right) \left(\frac{[^3O_2]}{\frac{k_p}{k_{ot}} + [^3O_2]} \right) [S_0], \tag{3.18}$$

utilizando nuevamente las ecuaciones (3.9) y (3.10), se obtiene

$$\frac{d[A]}{dt} = -\xi F_{ex} \left(\frac{[^3O_2]}{\beta + [^3O_2]} \right) [S_0], \tag{3.19}$$

Finalmente, las ecuaciones (3.13), (3.17) y (3.19) constituyen el modelo dinámico en TFD para el mecanismo tipo II, con consideraciones fisiológicas sobre el $^3O_2$, consideraciones que son desarrolladas a continuación.

3.2. Incremento de $^3O_2$ por el mecanismo de la respiración

El mecanismo de la respiración en los seres humanos permite que las personas adquieran O_2 del aire, y eliminen el CO_2 producido por el cuerpo.

El aire limpio que ingresa a los pulmones transporta el O_2 hasta los alveolos pulmonares, lugar donde se produce el intercambio gaseoso entre el aire inspirado y la sangre. No todo el aire que ingresa a los pulmones contiene O_2, la cantidad de O_2 presente en el aire o disuelto en un fluido se puede expresar en términos de una presión parcial, con unidades de milimetros de mercurio (mmHg) [26].

La presión parcial del O_2 descrita como P_{O_2} dentro de los alveolos es de 104 mmHg, mientras que el CO_2 que ingresa a los alveolos tiene una presión parcial de $P_{CO_2} = 40$ mmHg. La sangre procedente del corazón, en los extremos arteriales de los capilares pulmonares tiene una $P_{O_2} = 40$ mmHg y $P_{CO_2} = 45$ mmHg [26], por consiguiente debido a la diferencia en presiones parciales, el O_2 se difunde de los alveolos a la sangre, y el CO_2 de la sangre hacia los alveolos. Este proceso se dará hasta igualar las presiones parciales entre los alveolos y la sangre.

La hemoglobina presente en la sangre es la encargada de transportar el O_2 hasta cada célula del cuerpo, incluyendo la región de interés para el tratamiento con TFD, con lo cual se tendría un incremento del O_2 en la región a tratar. En las referencias [14], [20] y [23] se denomina a este incremento de O_2 como la razón de suministro de oxígeno por perfusión, descrito matemáticamente por la ecuación (3.20).

$$P = K_z([^3O_2]_v - [^3O_2]), \tag{3.20}$$

donde K_z es el parámetro dependiente de la dosis de $[^1O_2]$ acumulada y se expresa por la ecuación (3.21), $[^3O_2]_v$ es la concentración de oxígeno en los vasos sanguineos y que tiende a ser constante, (80 μM) [14, 23]. $K_z(t)$ puede ser descrita de la siguiente manera.

$$K_z(t) = K_0 \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-a(Dosis^1O_2 - D_{50})}}\right) \tag{3.21}$$

donde $K_0 = 0{,}037\ s^{-1}$ [23] y es el valor inicial de K_z, $a = 0{,}08\ \mu M^{-1}$ [23] es la pendiente de la función sigmoidal (figura 3.1). D_{50} es la dosis de $^1O_2$ requerida para reducir K_z a la mitad de su valor inicial, este término cambia según el valor de irradiancia incidente. En la tabla 3.1 se presenta los valores para distintas irradiancias.

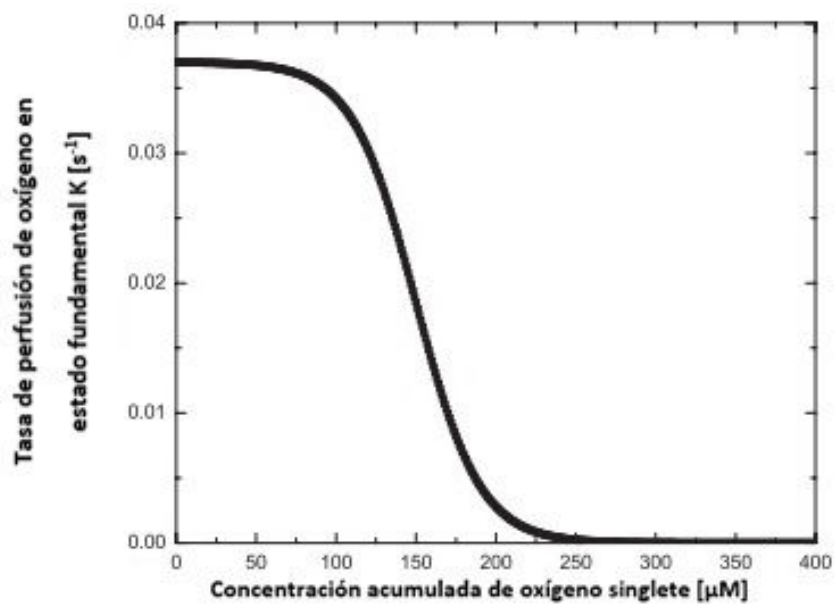


Figura 3.1: Ejemplo de la curva de respuesta vascular dependiente del oxígeno singlete. Adaptada de [23].

D_{50}	Irradiancia incidente
126 μM	10 mW/cm^2
191 μM	20-40 mW/cm^2
155 μM	50-60 mW/cm^2
108 μM	150 mW/cm^2

Tabla 3.1: Relación entre D_{50} y la irradiancia incidente. Adaptada de [23]

3.3. Disminución del $^3O_2$ por consumo metabólico y por TFD

En la sección 2.4 se introdujo el concepto de oxígeno, se mencionó que la concentración de oxígeno en el tejido sufrirá disminuciones provocadas por el metabolismo celular y por la propia TFD.

El consumo de oxígeno se refiere a la cantidad de oxígeno consumida por las células por unidad de tiempo, para garantizar la producción de energía y con ello el metabolismo celular [26]. Las necesidades metabólicas son las que determinan la cantidad del consumo de oxígeno por las células, y es limitada por la disponibilidad del oxígeno en los tejidos.

3.3.1. Consumo metabólico

La relación de Michaelis-Menten [31], expresada en la ecuación (3.22) será utilizada para describir el consumo metabólico, Γ_{met}. Esta relación describe la velocidad de reacción de muchas reacciones enzimáticas, entre ellas las reacciones químicas que ocurren en las células. Dando como resultado el metabolismo celular.

$$\Gamma_{met} = \Gamma_{met}^{max} \frac{[^3O_2]}{k_{50} + [^3O_2]}, \tag{3.22}$$

donde Γ_{met}^{max} es la razón del consumo metabólico maximo inicial de la piel humana en el estado estable, medida en unidades de $\mu M s^{-1}$, y k_{50} es la concentración de $[^3O_2]$ a la cual Γ_{met} está a la mitad de Γ_{met}^{max}. Tanto Γ_{met}^{max} como k_{50} son considerados constantes, $1{,}5 \pm 0{,}3[\mu M s^{-1}]$ y $0{,}5[\mu M]$ respectivamente [32, 33].

3.3.2. Consumo por TFD

En tanto que para el consumo por TFD, el primer término a la derecha de la ecuación (3.17) es la representación matemática de la disminución de $^3O_2$ causado por

las reacciones presentes en TFD. Dicho término está implícito en el desarollo de la dinámica en TFD por el mecanismo tipo II.

Se tiene entonces la siguiente expresión para la evolución temporal del $[^3O_2]$, donde se ha denotando como Γ_{TFD} al consumo por TFD.

$$\frac{d[^3O_2]}{dt} = -\Gamma_{TFD} + P - \Gamma_{met}, \tag{3.23}$$

La razón de cambio en la concentración de $^3O_2$ a una profundidad z es la suma del suministro por perfusión, consumo metabólico y el consumo fotofísico y fotoqímico causado por la TFD, tal como se expresa en (3.23).

3.4. Difusión de la de luz en el tejido

La Teoría de Transporte de Radiación es aplicada a varios campos de la física, como por ejemplo, en la física atmosférica, la teoría de transporte de neutrones y la propagación de la luz en medios turbios [9].

La Ecuación de Transporte de Radiación, ecuación fundamental de la teoría de transporte de radiación describe el comportamiento de la luz en el tejido [8, 9, 28]. Esta ecuación es un balance de energía que ingresa a un elemento de volumen de un medio, en el cual se consideran fotones absorbidos, dispersados y reflejados.

Una aproximación a la resolución de la ecuación de transporte de radiación es la ecuación de difusión. En esta sección se encontrará una solución a la ecuación de difusión de la luz en el tejido.

Considerando luz colimada de una fuente, cuyos rayos inciden en un volumen que contiene particulas distribuidas aleatoriamente, como se indica en la figura 3.2.

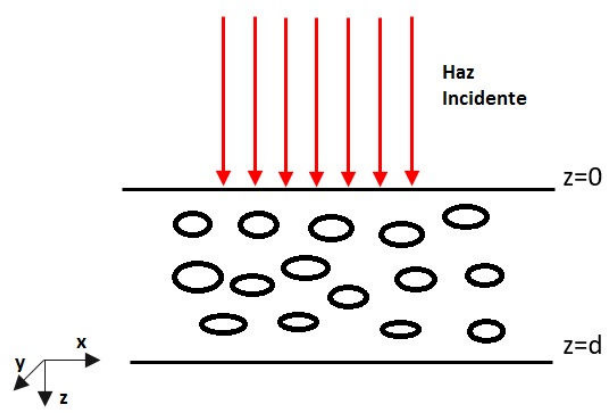


Figura 3.2: Haz incidente en un plano semi-infinito.

La ecuación unidimensional de difusión de la luz en el tejido es [9, 28]:

$$\nabla^2\phi(z) - \mu_{eff}^2\phi(z) = -Q_0 e^{-\mu_t z} \tag{3.24}$$

donde $\phi(z)$ es la radiancia promedio difusa y

$$\mu_{eff} = \sqrt{3\mu_a\mu_T} \tag{3.25}$$

es el coeficiente de atenuación efectivo. Q_0 está definido como

$$Q_0 = 3\mu_s(\mu_T + g\mu_t)\frac{F_0}{4\pi}, \tag{3.26}$$

siendo $\mu_T = \mu_a + \mu_s'$ el coeficiente de transporte, $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ el coeficiente de atenuación total y F_0 es la densidad de flujo de fotones (irradiancia inicial), con unidades de $[Wm^{-2}]$. La ecuación (3.24) es válida si el coeficiente de dispersión reducido (μ_s') es mucho mayor que el de absorción (μ_a) [9, 28].

Como se puede apreciar en (3.24) se ha escojido el estado estacionario, esto es debido a que en TFD existe una mayor contribución de la parte espacial de la distribución de la luz, que de la parte temporal [4-7].

Para $\phi(z)$ se desea encontrar una solución homogénea y una particular, tal que la solución total sea la suma de estas. Así

$$\phi(z) = \phi_h(z) + \phi_p(z) \tag{3.27}$$

Para el caso homogéneo, igualamos a cero la ecuación (3.24).

$$\frac{d^2\phi_h(z)}{dz^2} - \mu^2{}_{eff}\phi_h(z) = 0, \tag{3.28}$$

Cuya solución es del tipo exponencial

$$\phi_h(z) = C_1 e^{\mu_{eff} z} + C_2 e^{-\mu_{eff} z}, \tag{3.29}$$

Para la solución particular, tomando en cuenta que se tiene una fuente de luz colimada, lo que da lugar a la emisión de ondas planas, entonces la densidad de flujo no presenta dependencia radial, por lo cual se propone una solución particular de la forma:

$$\phi_p(z) = C_3 e^{-\mu_t z}, \tag{3.30}$$

Queda por determinar las constantes C_1, C_2 y C_3.

Para C_3 se reemplaza (3.30) y su segunda derivada en (3.24), con lo cual se obtiene

$$\mu_t^2 C_3 e^{-\mu_t z} - \mu_{eff}^2 C_3 e^{-\mu_t z} = -Q_0 e^{-\mu_t z}, \tag{3.31}$$

$$C_3(\mu_t^2 - \mu_{eff}^2) = -Q_0, \tag{3.32}$$

$$C_3 = \frac{Q_0}{\mu_{eff}^2 - \mu_t^2} \tag{3.33}$$

Para calcular C_1 y C_2, se utilizaran las condiciones de frontera, que de acuerdo a la referencia [28], se debe satisfacer:

- Para z = d,

$$\phi(z) + h\frac{\partial \phi(z)}{\partial z} - \frac{Q_1(z)}{2\pi} = 0, \tag{3.34}$$

- Para z = 0,

$$\phi(z) - h\frac{\partial \phi(z)}{\partial z} + \frac{Q_1(z)}{2\pi} = 0, \tag{3.35}$$

donde $h = \frac{2}{3\mu_T}$, y $Q_1(z) = \frac{\mu_s g}{\mu_T} F_0 e^{-\mu_t z}$
Introduciendo las ecuaciones (3.29) y (3.30) en (3.27), se tiene:

$$\phi(z) = C_1 e^{\mu_{eff} z} + C_2 e^{-\mu_{eff} z} + C_3 e^{-\mu_t z} \tag{3.36}$$

- Para z = d, y para un medio semi-infinito $d \to \propto$, se tiene que $C_1 = 0$.

- Para z = 0, y con la ecuación (3.36)

$$(0) + C_2 + C_3 - h\left((0) - \mu_{eff} C_2 - \mu_t C_3\right) + \frac{Q_1(0)}{2\pi} = 0, \tag{3.37}$$

$$C_2(1 + h\mu_{eff}) + C_3(1 + h\mu_t) + \frac{\mu_s g}{2\pi\mu_T} F_0 = 0, \tag{3.38}$$

Despejando C_2, reemplazando el valor de C_3 encontrado en (3.33) y realizando algunas operaciones algebraicas, se tiene (3.39).

$$C_2 = \frac{-\mu_s F_0}{2\pi(1 + h\mu_{eff})} \left(\frac{3}{2} \frac{(\mu_T + g\mu_t)(1 + h\mu_t)}{\mu_{eff}^2 - \mu_t^2} + \frac{g}{\mu_T} \right) \tag{3.39}$$

Con lo cual finalmente, la solución para la ecuación de difusión de la luz en el tejido es de la siguiente forma:

$$\phi(z) = \frac{-\mu_s F_0}{2\pi(1 + h\mu_{eff})} \left(\frac{3}{2} \frac{(\mu_T + g\mu_t)(1 + h\mu_t)}{\mu_{eff}^2 - \mu_t^2} + \frac{g}{\mu_T} \right) e^{-\mu_{eff} z} + \frac{3}{4\pi} \frac{\mu_s(\mu_T + g\mu_t)}{\mu_{eff}^2 - \mu_t^2} F_0 e^{-\mu_t z} \tag{3.40}$$

Para obtener la tasa de fluencia de energía se multiplicará a (3.40) por 4π. Esto se debe ya que, la tasa de fluencia de energía está definida como la potencia radiante incidente en una pequeña esfera dividida por el área de la sección transversal de dicha esfera [9].

$$F_{ex}(z) = 4\pi\phi(z) \tag{3.41}$$

De esta forma, una vez obtenida la radiancia promedio difusa ecuación (3.40), y usando la ecuación (3.41), se halla la tasa de fluencia de energía.

$$F_{ex}(z) = \frac{-2\mu_s F_0}{1+h\mu_{eff}}\left(\frac{3}{2}\frac{(\mu_T+g\mu_t)(1+h\mu_t)}{\mu_{eff}^2-\mu_t^2}+\frac{g}{\mu_T}\right)e^{-\mu_{eff}z}+\frac{3\mu_s(\mu_T+g\mu_t)F_0}{\mu_{eff}^2-\mu_t^2}e^{-\mu_t z} \tag{3.42}$$

Esta última ecuación será introducida en las ecuaciones (3.13), (3.17) y (3.19) para distintas irradiancia iniciales.

3.5. Dosis de $^1O_2$ con dosimetría explícita

Una definición lógica para la dosis de $^1O_2$ es la siguiente, la dosis de $^1O_2$ se define como la cantidad de $^1O_2$ que reacciona por unidad de volumen [12]. Entonces, la concentración de $^1O_2$ que se genera en el tejido por TFD, y que se encuentra aniquilando a una concentración de biomoléculas es determinado por la equivalencia (3.43).

$$\frac{d(Dosis de^1O_2)}{dt} = -\frac{d[A]}{dt}, \tag{3.43}$$

La dosis de $^1O_2$ suele ser descrita también, como el número total de sustratos biológicos consumidos por unidad de volumen durante el tratamiento con TFD, o a la integral de la ecuación diferencial anterior desde el inicio del tratamiento ($t = 0$) hasta el final ($t = T$).

$$Dosis de^1O_2 = -\int_0^T \frac{d[A]}{dt}\,dt \tag{3.44}$$

Reemplazando (3.19) en (3.44), tenemos

$$Dosis de^1O_2 = \int_0^T \xi F_{ex}\left(\frac{[^3O_2]}{\beta+[^3O_2]}\right)[S_0]\,dt \tag{3.45}$$

o en forma diferencial

$$\frac{d(Dosis de^1O_2)}{dt} = \xi F_{ex}(z)\left(\frac{[^3O_2]}{\beta+[^3O_2]}\right)[S_0] \tag{3.46}$$

Capítulo 4

Simulación del modelo dosimétrico, resultados y discusiones

La PpIX-ALA, el oxígeno triplete y una fuente de luz contribuirán a la generación de $^1O_2$. El $^1O_2$ generado interactuará con la propia PpIX en estado base y con una concentración de biomoléculas, tal y como se mencionó en el capítulo 3.

La PpIX-ALA como se mencionó en el capítulo 2, tiene una banda de absorción en 633 nm; por lo tanto, se utilizó una fuente de luz de 633 [nm] para su excitación y generar los procesos fotofísicos y fotoquímicos de la TFD. Se consideró una concentración inicial de PpIX-ALA igual a 4.4 $[\mu M]$ [23], una concentración de $^3O_2$ igual a 80 $[\mu M]$ en los vasos sanguíneos y 83 $[\mu M]$ distribuido en toda la dermis, esta última concentración, por efectos fisiológicos pasará a una concentración igual a 39.9604 $[\mu M]$.

En la tabla 4.1 se encuentra el valor de δ, el cual representa la concentración de S_0 donde la distancia intermolecular es igual a d. En esta tabla también se encuentran incluidos y referenciados los valores de los coeficientes μ, ξ y β para la PpIX-ALA; los cuales como se describe respectivamente en las ecuaciones (3.8), (3.9) y (3.10) están determinados por las constantes k_{os}, $k_{oa}[A]$, S_Δ, ϕ_t, σ, hν, k_d, k_p y k_{ot}.

Símbolo	**Valor**	**Referencia**
δ	$128[\mu M]$	[12, 15]
ξ	$3{,}7x10^{-3}[cm^2mW^{-1}s^{-1}]$	[6, 11, 19, 21]
μ	$9x10^{-5}[\mu M^{-1}]$	[6, 11, 19, 21]
β	$11{,}9[\mu M]$	[6, 11, 19, 21]

Tabla 4.1: Valores de constantes para la PpIX con luz de 633 [nm] de longitud de onda.

En este capítulo se presentan los resultados de la simulación realizada para estudiar el comportamiento de la luz en el tejido, la distribución espacial y temporal para las concentraciones de PpIX-ALA, oxígeno triplete y dosis de oxígeno singlete. La simulación fué realizada en el software *Wolfram Mathematica 10.4 Student Edition*

[35].

4.1. Difusión de la luz en la dermis

En un tratamiento clásico con TFD se retira la capa superficial del tejido a tratar. Por tal motivo, se ha considerado únicamente a la segunta capa de la piel, la dermis, bajo el supuesto de que la capa epidérmica ha sido removida y que, la dispersión de la luz es alta, a tal modo que la luz no llega a interactuar con el tejido subcutáneo.

La dermis tiene una profundidad en algunas regiones del cuerpo de 0 a 0.25 o 0.3 [cm] [26, 29, 30], sin embargo, la simulación se desarrolla hasta una profundidad máxima de 0.5 [cm], dado que se conoce que la luz a 633 [nm] penetra hasta esta profundidad [9] y, se espera que a esta profundidad no existan procesos de TFD. Los coeficientes de absorción, dispersión reducido y de anisotropía para la dermis se encuentran descritos en la tabla 4.2.

Coeficiente	**Valor**	**Referencia**
μ_a	1.7 $[cm^{-1}]$	[29, 30]
μ'_s	25 $[cm^{-1}]$	[29, 30]
g	0.8	[8-10]

Tabla 4.2: Propiedades ópticas de la dermis de piel humana normal obtenidos al excitar la piel con una fuente de luz de 633 [nm].

Es de interés en este trabajo de titulación conocer el comportamiento de la tasa de fluencia de energía en la dermis, utilizando las irradiancias iniciales de 20, 60 y 150 $[mW/cm^2]$, para lo cual, se utilizó la ecuación (3.42) del capítulo anterior con los coeficientes de la tabla 4.2. El comportamiento de la tasa de fluencia de energía en la dermis se encuentra representado en la figura 4.1.

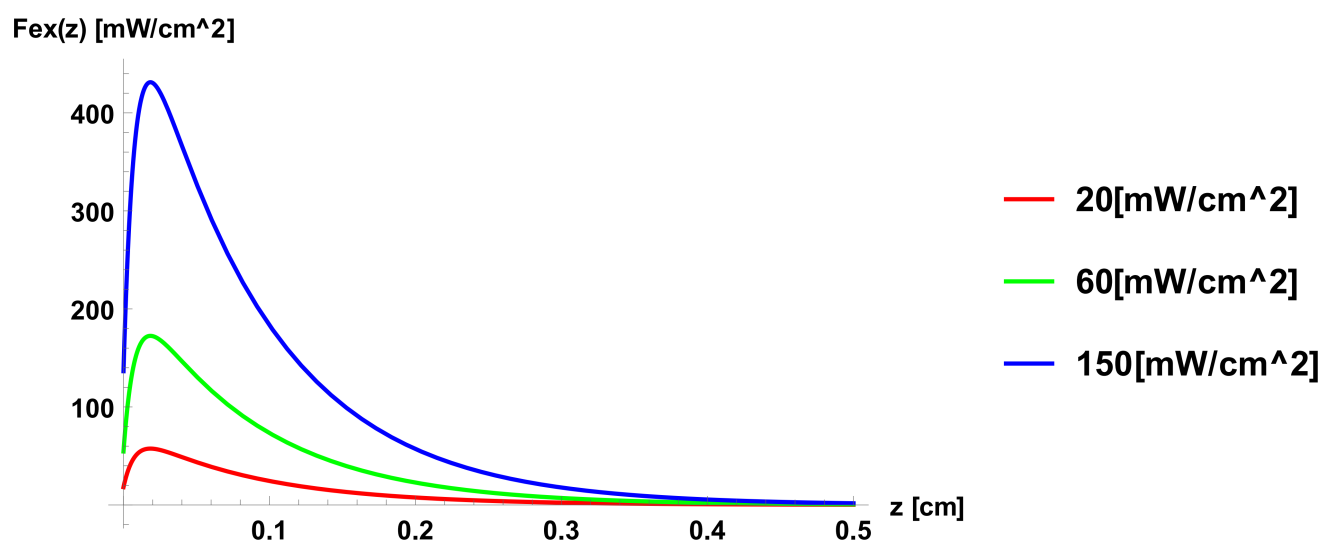


Figura 4.1: Tasa de fluencia de energía como una función de la profundidad con distintas irradiancias iniciales.

Durante todo el presente trabajo se tomará en cuenta el comportamiento de la luz en el tejido, es decir, ya que se tomo en cuenta efectos de absorción y dispersión, a $F_{ex}(z)$ se considerará como una distribución real de la luz, que excitará al FS que se encuentra en la dermis.

En la figura 4.1 se aprecia un incremento en $F_{ex}(z)$ en la región $0< z <0.02$ [cm], dicho incremento supera el valor de la irradiancia inicial, que aproximadamente se triplica. Este aumento de $F_{ex}(z)$ en los primeros centímetros de la piel se debe a la alta tasa de reflexión de la luz al pasar de un medio a otro, que depende principalmente del parámetro de anisotropía (g), dado que existe una relación directa entre $F_{ex}(z)$ y g, es decir, a mayor valor de g mayor será $F_{ex}(z)$, y lo cual estaría en correspondencia a la teoría descrita en [8, 9].

En la figura 4.1 se observa también que a la profundidad de $z = 0.02$ [cm], todas las curvas alcanzan un valor máximo, y cuya amplitud depende de la irradiancia inicial.

Para valores $z >0.02$ [cm] existe un decaimiento exponencial. Con la irradiancia inicial de 150 $[mW/cm^2]$ se tiene una mayor penetración en la piel, sin embargo, a la profundidad de 0.5 [cm] la tasa de fluencia de energía es independiente de la irradiancia inicial y tiende a ser cero.

4.2. Evolución espacial y temporal de la PpIX

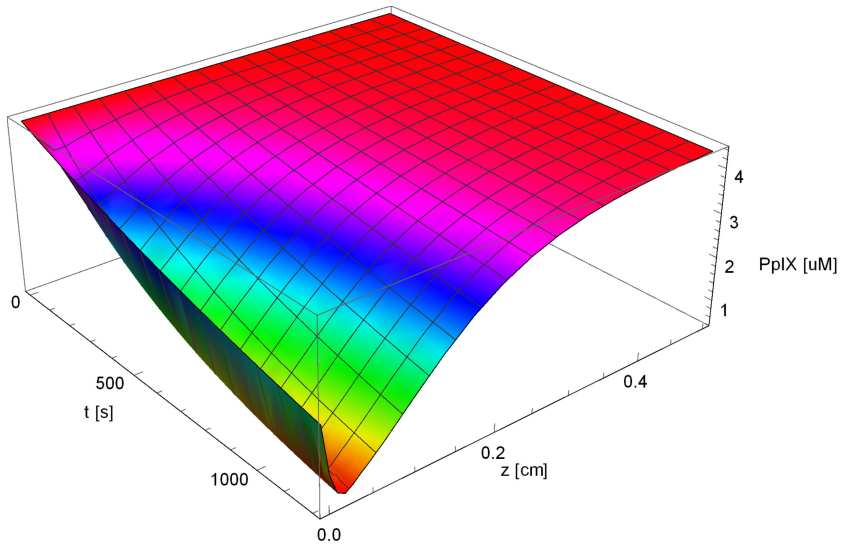
El comportamiento de la PpIX en estado base como una función del tiempo y la profundidad es descrito en la figura 4.2. Para lo cual se utilizó la ecuación (3.13), cuya solución representa el cambio en $[S_0]$ como una función del tiempo y la profundidad. Se consideró que $[S_0]$ está distribuida uniformemente en una profundidad de 0 a 0.5 [cm] con una concentración inicial de 4.4 $[\mu M]$ [23], y es fotoexitada con las irradiancias iniciales de 20, 60 y 150 $[mW/cm^2]$. Se consideró también un tiempo de irradiación en la que se realizan los procesos fotofísicos de la TFD de 20 [min] (1200 [s]).

En la figura 4.2 se observa que los 4.4 $[\mu M]$ de concentración inicial de PpIX están involucrados en la dinámica de las reacciones de TFD, lo cual implica que hay una mayor probabilidad de generar $^1O_2$, y con lo cual se estaría obteniendo una dosis de $^1O_2$ más eficiente.

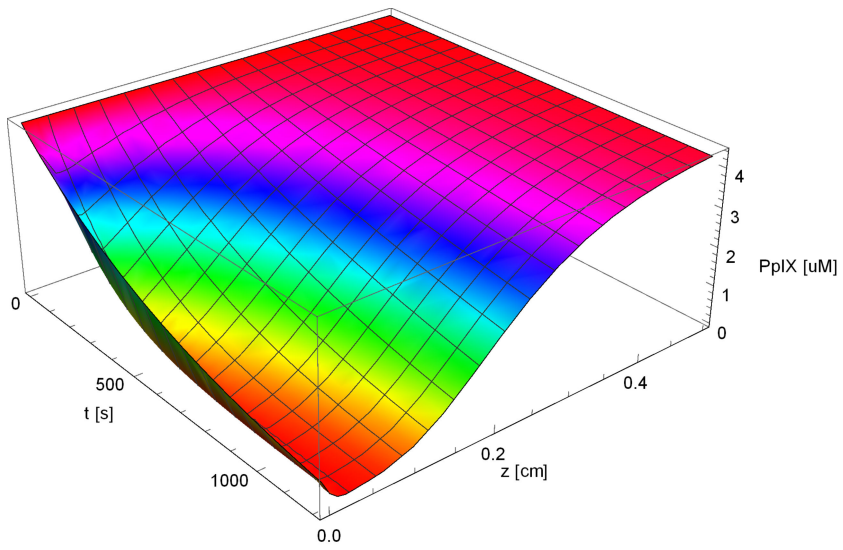
Se observa también que al incrementar el tiempo de 0 a 20 [min], la concentración de PpIX disminuye, siendo con la irradiancia de 150 $[mW/cm^2]$ la que requiere de un menor tiempo de exposición para reducir la concentración de PpIX hasta casi 0 $[\mu M]$. Dicho comportamiento es encontrado también para el FS Photofrin [13], en la que el fotoblanqueamiento fué más rápido a mayor radiación incidente.

Al aumentar la profundidad se observa que para la irradiancia de 20 $[mW/cm^2]$ hay una disminución en la concentración de PpIX, esta disminución se da en una

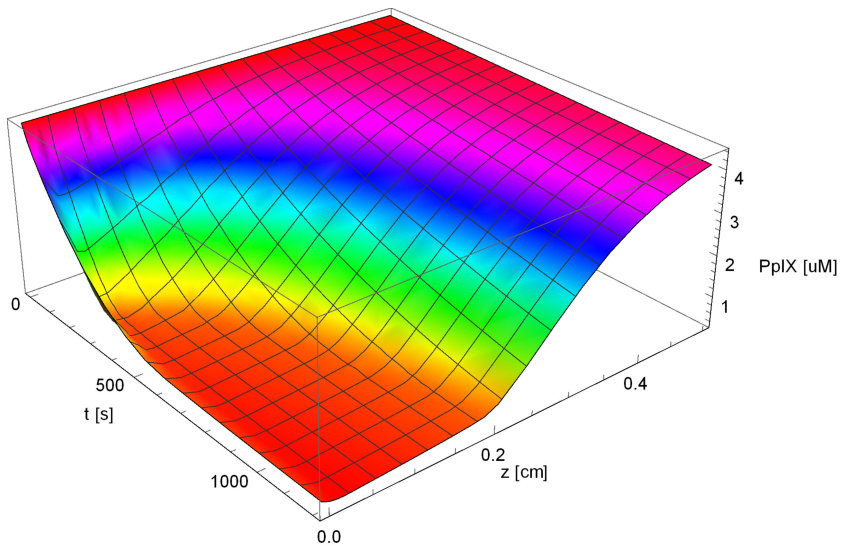
profundidad cercana a 0 [cm]. En regiones más profundas de la dermis, la concentración de PpIX crece hasta la concentración inicial. Para la irradiancia de 60 $[mW/cm^2]$ se observa un comportamiento combinado entre lo observado de las subfiguras (a) y (c), presentando ligeramente una disminución en una región cercana a la superficie.



(a) 20 mW/cm^2.



(b) 60 mW/cm^2.



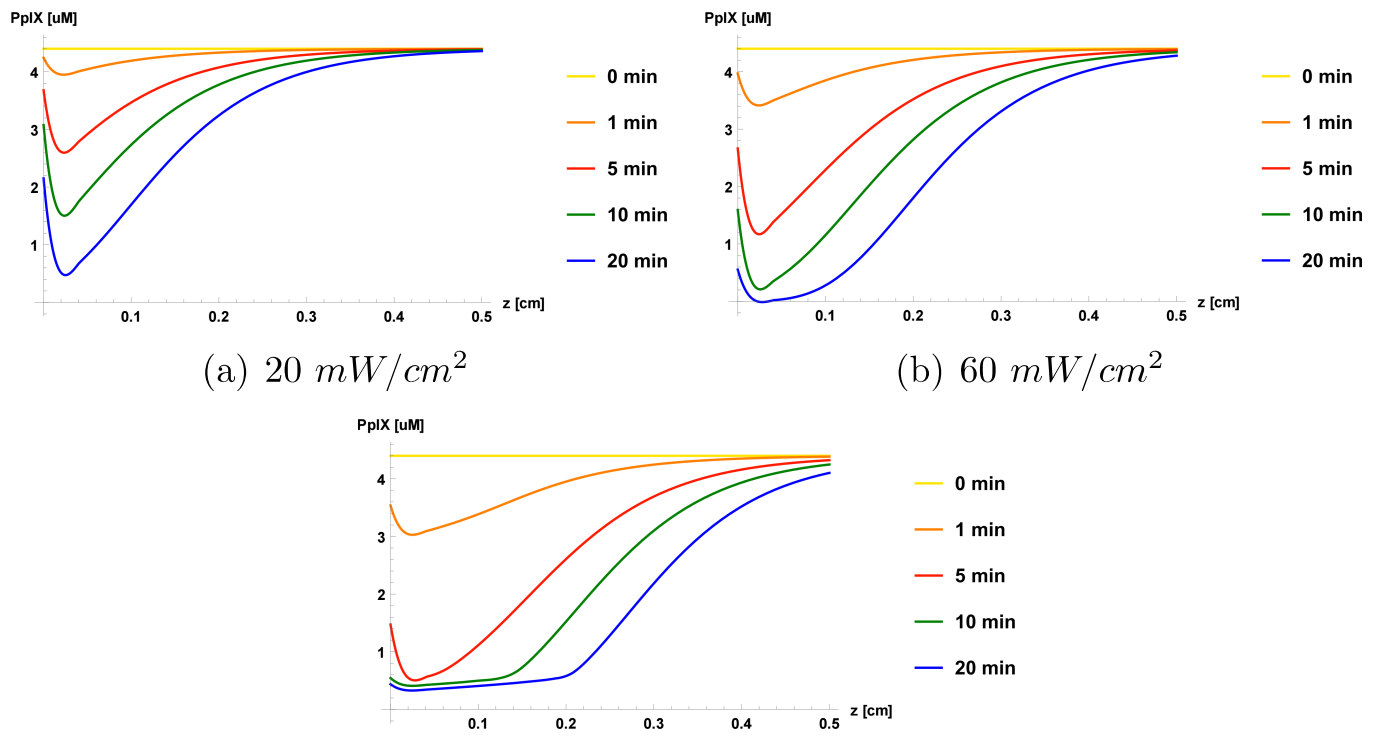
(c) 150 mW/cm^2.

Figura 4.2: Distribución espacial y temporal de la concentración de PpIX a distintas irradiancias iniciales.

En las siguientes subsecciones se analiza el comportamiento de la PpIX como una función de la profundidad, y el tiempo de exposición de manera separada.

4.2.1. Concentración de PpIX vs profundidad

Es este caso se estudia el comportamiento de la PpIX como una función de la profundidad en el intervalo de 0 a 0.5 [cm], tomando en cuenta los tiempos de exposición de 0, 1, 5, 10 y 20 [min].



(a) 20 mW/cm^2 (b) 60 mW/cm^2

(c) 150 mW/cm^2

Figura 4.3: Concentración de PpIX como una función de la profundidad, con distintas irradiancias iniciales.

Al tiempo 0 [min], el tratamiento con TFD aún no ha empezado, y por lo tanto, la concentración de PpIX está en su valor inicial, 4.4 [μM]. Para los tiempos de exposición 1, 5, 10 y 20 min, se observa que en todas las irradiancias, la concentración de PpIX disminuye hasta alcanzar la profundidad a la cual, la tasa de fluencia de energía alcanza su valor máximo, que es en 0.02 [cm], este comportamiento de la PpIX está indicando que conforme $F_{ex}(z)$ aumenta, $[S_0]$ disminuye. Se observa también, que con la irradiancia de 60 [mW/cm^2] y con el tiempo de 20 [min], la concentración de PpIX llega hasta los 0 [μM] en z=0.02 [cm].

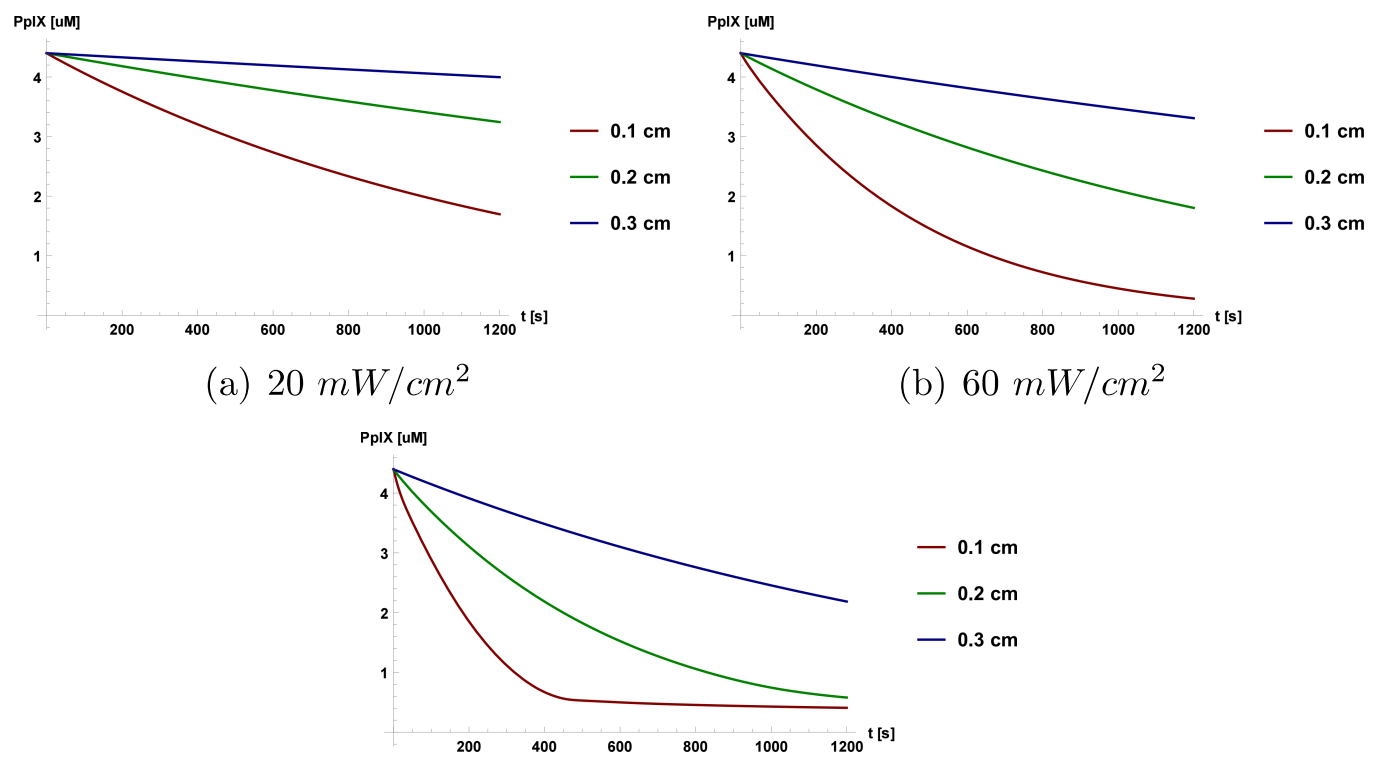
Para profundidades z >0.02 [cm] se observa que la concentración de PpIX comienza a crecer, hasta alcanzar nuevamente los 4.4 [μM], este comportamiento se debe a que la tasa de fluencia de energía, al interactuar con las moléculas de PpIX, lo hará mínimamente con moléculas que se encuentran en regiones más profundas de la dermis, dando como resultado que la PpIX en estado S_0 no absorba energía.

Nótese que para la irradiancia de 150 [mW/cm^2] en los tiempos de 10 y 20 [min], antes de que la concentración de PpIX comience a aumentar, existe un intervalo de profundida donde la concentración de PpIX se mantiene aparentemente constante, o aumenta en cantidades despreciables, este comportamiento se debería ya que la tasa de fluencia de energía al interactuar con la dermis, triplica el valor de la irradiancia

de 150 $[mW/cm^2]$, provocando que para que esta dismunuya requerirá de un mayor tiempo comparado con las otras dos irradiancias.

4.2.2. Concentración de PpIX vs tiempo

En la figura 4.4 se muestran los resultados para el caso en el que la profundidad del tejido es constante, y la concentración de PpIX es una función del tiempo de exposición. Las profundidades analizadas son: 0.1, 0.2 y 0.3 [cm].



(a) 20 mW/cm^2 (b) 60 mW/cm^2

(c) 150 mW/cm^2

Figura 4.4: Concentración de PpIX como una función del tiempo, con distintas irradiancias iniciales.

Nuevamente, al tiempo 0 [min] sin TFD, la concentración de PpIX tiene el valor inicial de la simulación, lo cual estaría en relación a lo indicado en la figura 4.3.

Al aumentar el tiempo de exposición, la concentración de PpIX disminuye, esto es lo que se espera que suceda en un tratamiento normal con TFD. La manera en la que la concentración de PpIX disminuye está relacionada con la irradiancia inicial, por ejemplo, con la irradiancia de 20 $[mW/cm^2]$ para disminuir $[S_0]$ se requiere de los 20 [min], y a la profundidad de 0.3 [cm] casi no existe disminución, para la irradiancia de 60 $[mW/cm^2]$ a los 20 [min] casi toda la concentración de PpIX ha desaparecido, y con la irradiancia de 150 $[mW/cm^2]$ a los 5 [min] de haber iniciado el tratamiento la concentración de PpIX disminuye hasta 0.5 $[\mu M]$, y para el resto de tiempo se mantiene en este valor.

4.3. Evolución espacial y temporal del oxígeno triplete

Para obtener el comportamiento de la concentración de $^3O_2$ como una función de la profundidad y el tiempo de exposición se utilizó la ecuación (3.17), en esta ecuación como se mencionó en el capítulo anterior, se tomó en consideración el suministro de oxígeno a las células dado por el mecanismo de la respiración y, la disminución del $^3O_2$ provocado por el consumo metabólico, se consideró también un consumo del $^3O_2$ causado por la propia dinámica de las reacciones producidas en TFD.

La concentración de $^3O_2$ en los vasos sanguíneos fue de 80 $[\mu M]$ [14, 23], y de 83 $[\mu M]$ en la dermis [19], sin embargo, los 83 $[\mu M]$ no es la concentración real de oxígeno que estaría disponible para el tratamiento con TFD, dado que sin TFD habrá efectos sobre el $^3O_2$ causados por el consumo metabólico y el suministro de oxígeno, provocando que la concentración de $^3O_2$ considerada en la dermis disminuya.

Sin TFD, la ecuación (3.17) quedaría modificada de la siguiente forma:

$$\frac{d[^3O_2]}{dt} = P - \Gamma_{met}, \tag{4.1}$$

remplazando las ecuaciones (3.20), (3.21) y (3.22) en (4.1) y tomando en cuenta que sin TFD no se estaría generando $^1O_2$ y por lo tanto no existe dosis de $^1O_2$, se tiene la ecuación (4.2)

$$\frac{d[^3O_2]}{dt} = K_0 \left(1 - \frac{1}{1 + e^{aD_{50}}}\right) ([^3O_2]_v - [^3O_2]) - \Gamma_{met}^{max} \frac{[^3O_2]}{k_{50} + [^3O_2]}, \tag{4.2}$$

Cuya solución se ve expuesta en la siguiente figura.

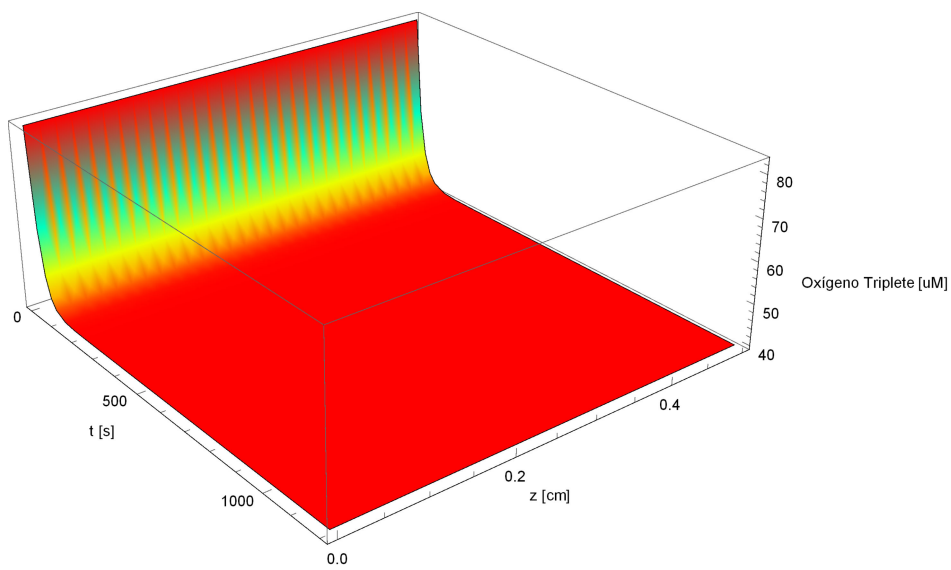
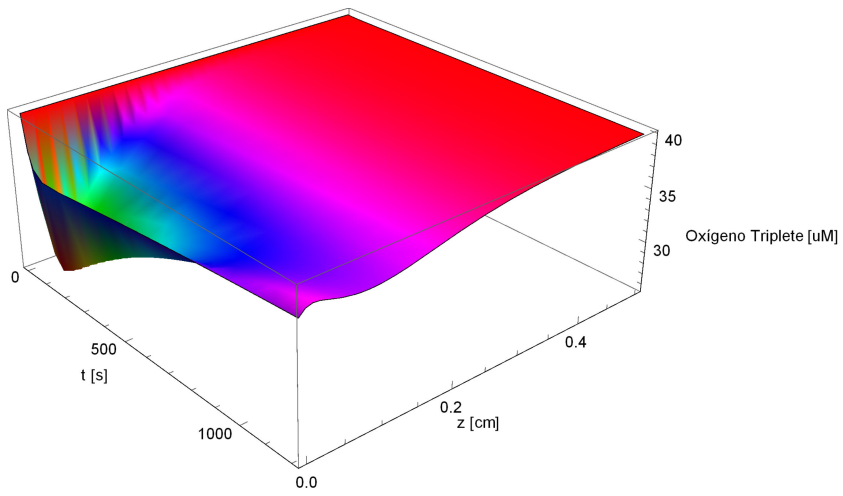


Figura 4.5: Comportamiento del $[^3O_2]$ sin TFD.

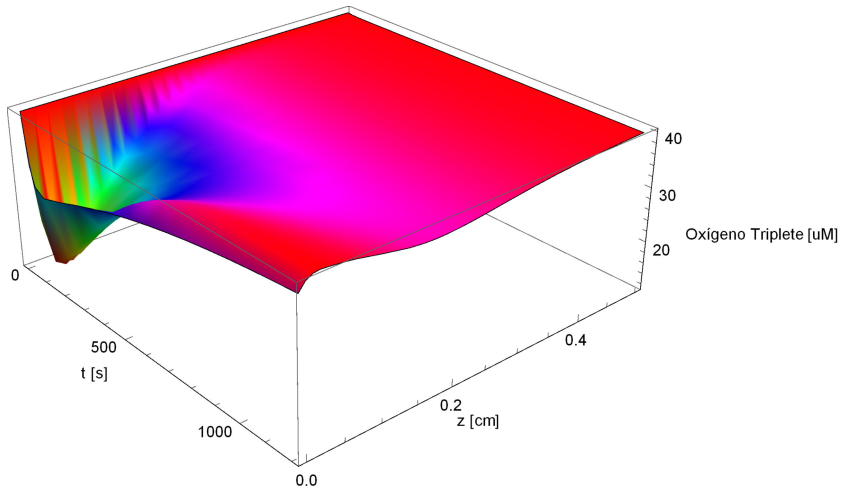
En esta figura se observa que en los primeros segundos hay una rápida disminución en la concentración de $^3O_2$, que llega a hasta los 39.9604 $[\mu M]$ y permanece constante

en la profundidad. Este valor determina la disponibilidad de $^3O_2$ para dar tratamiento con TFD y, refleja un balance entre el consumo metabólico y el suministro de oxígeno.

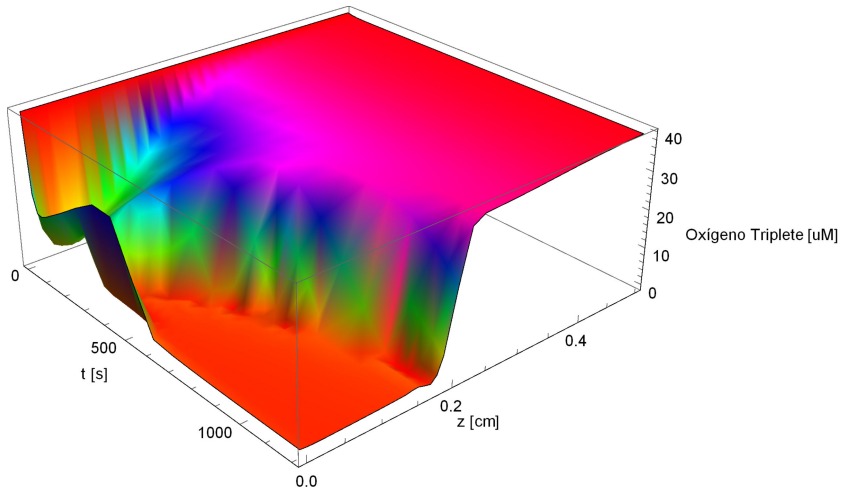
Por lo tanto, los 39.9604 $[\mu M]$ es la concentración de $^3O_2$ considerada en el tratamiento con TFD, esta concentración será distribuida homogéneamente hasta 0.5 cm de profundidad en la piel. Al igual que en los casos anteriores, las irradiancias iniciales fueron de 20, 60 y 150 $[mW/cm^2]$. Se consideró una profundidad máxima de 0.5 [cm] y un tiempo de tratamiento de 20 [min].



(a) 20 mW/cm^2



(b) 60 mW/cm^2



(c) 150 mW/cm^2

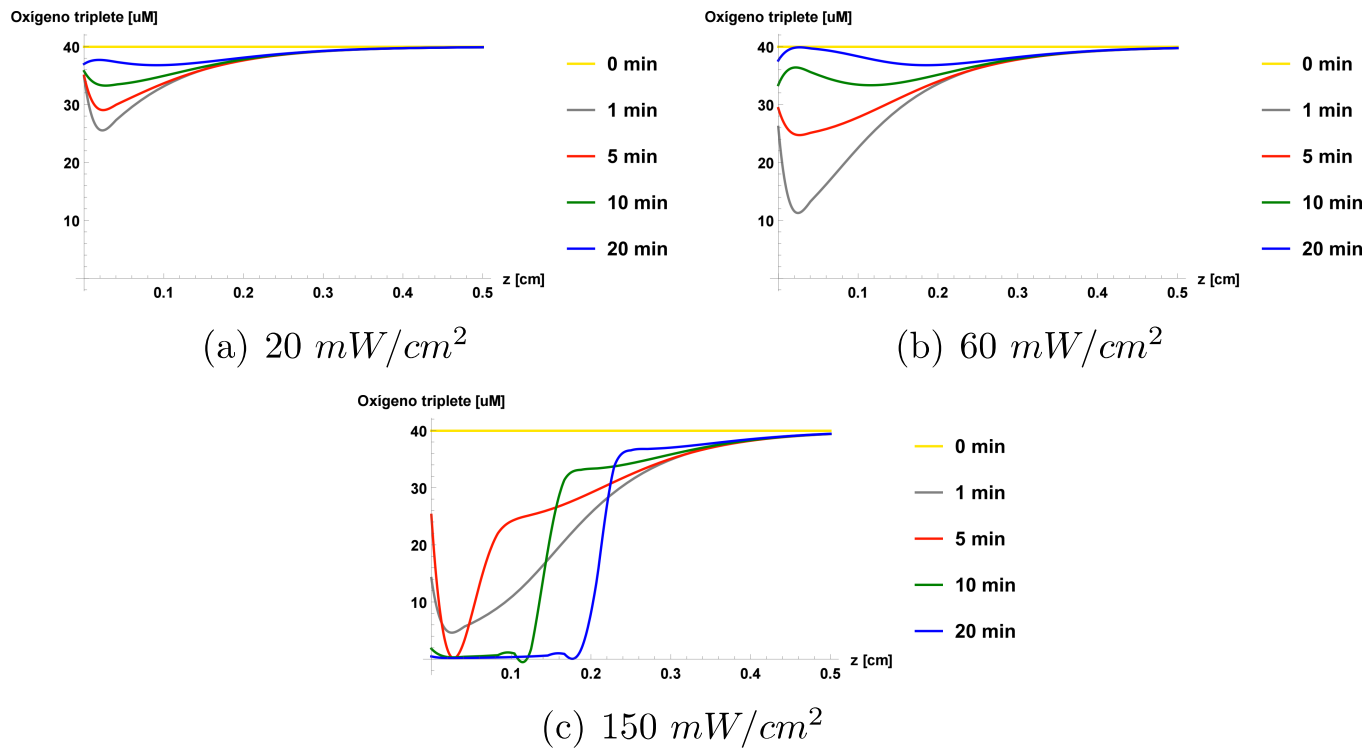
Figura 4.6: Distribución espacial y temporal de $[^3O_2]$ a distintas irradiancias iniciales.

En la figura 4.6 se observa que para todas la irradiancias al aumentar el tiempo de exposición la concentración de $^3O_2$ disminuye, siendo 0 $[\mu M]$ con la irradiancia de 150 $[mW/cm^2]$ para un tiempo de irradiación mayor a 10 minutos (600 [s]).

Al observar la variación de la concentración de $^3O_2$ con respecto a la profundidad se aprecia que para 0< z <0.2 [cm], con las irradiancias de 20 y 60 $[mW/cm^2]$ hay ligeramente un incremento en la concentración, que luego disminuye, y con z >0.2 [cm] la concentración de $^3O_2$ se mantiene aproximadamente constante en 39.9604 $[\mu M]$. Este comportamiento es reportado experimentalmente en [13], donde el medio de estudio fué la piel sana y considerando las tres capas de la piel. Para la irradiancia de 150 $[mW/cm^2]$ se observa que hasta 0.2 [cm] de profundidad, la concentración de $^3O_2$ es 0 $[\mu M]$, y para z >0.2 [cm] hay un incremento de $[^3O_2]$ hasta alcanzar nuevamente los 39.9604 $[\mu M]$, lo cual está indicando que para irradiancias grandes, toda la concentración de $^3O_2$ es consumida en regiones próximas a la superficie.

4.3.1. Concentración de $^3O_2$ vs profundidad

A continuación se presenta el comportamiento de la concentración de $^3O_2$ como una función exclusiva de la profundidad, evaluada para los tiempos 0, 1, 5, 10 y 20 [min]. Las irradiancias utilizadas fueron 20, 60 y 150 $[mW/cm^2]$.



(a) 20 mW/cm^2 (b) 60 mW/cm^2

(c) 150 mW/cm^2

Figura 4.7: Concentración de $^3O_2$ como una función de la profundidad, a distintas irradiancias iniciales.

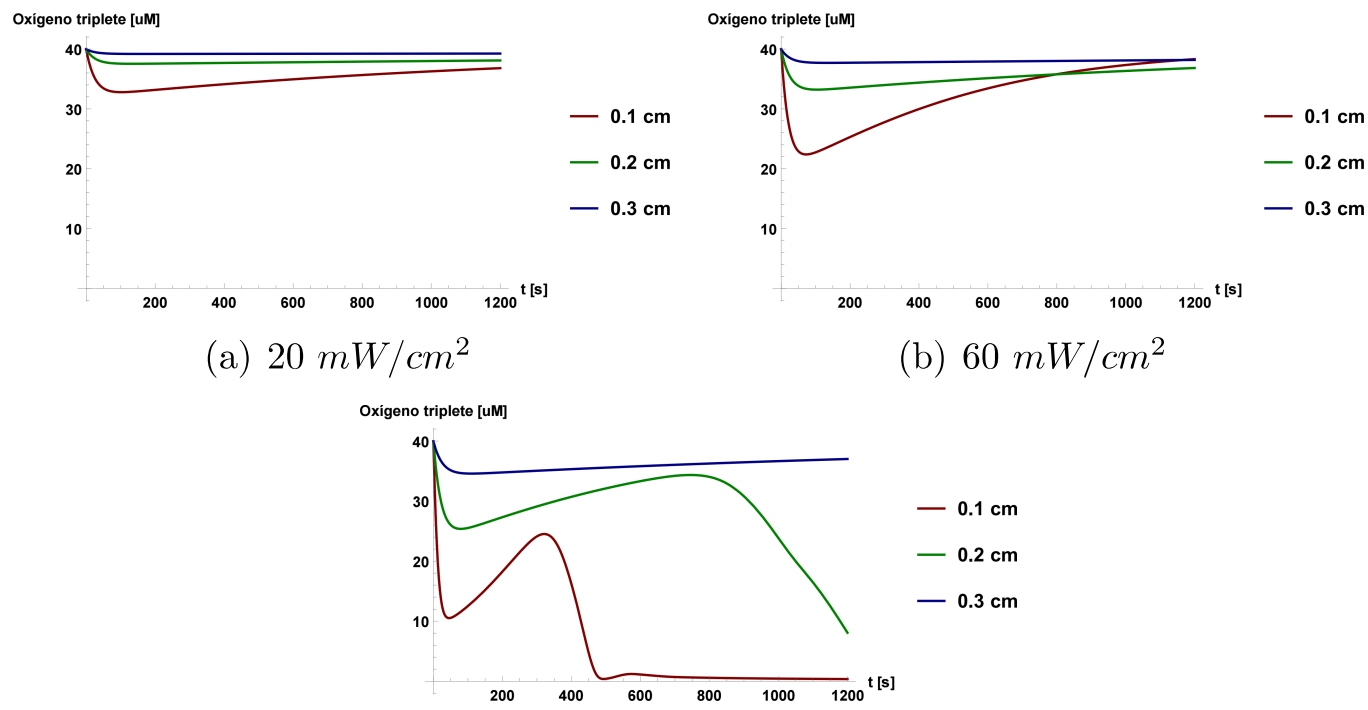
En la figura 4.7 se observa que a t=0 [min], como era de esperarse la concentración de $^3O_2$ es 39.9604 $[\mu M]$.

En el intervalo de tiempo de exposición de 1 a 5 min con las tres irradiancias se tiene una disminución en la concentración de $^3O_2$, que corresponde a la profundidad en la que la tasa de fluencia de energía crece, este comportamiento cambia para el tiempo de 20 [min] con la irradiancia de 20 $[mW/cm^2]$ y, en los tiempos 10 y 20 [min] con la irradiancia de 60 $[mW/cm^2]$, donde se observa que la concentración de $^3O_2$ aumenta, en tanto que para la irradiancia de 150 $[mW/cm^2]$ en los tiempos 10 y 20 [min] la

concentración de $^3O_2$ vale 0 $[\mu M]$ hasta las profundidades aproximadamente de 0.1 y 0.2 [cm] respectivamente. Se observa también que para $z > 0.3$ [cm] la concentración de $^3O_2$ tiende a ser constante en las proximidades de 40 $[\mu M]$, lo cual estaría indicando que a esta profundidad ya no hay mucho efecto de la TFD.

4.3.2. Concentración de $^3O_2$ vs tiempo

En la figura 4.8 se indican los resultados de la simulación para el comportamiento de la concentración de $^3O_2$ como una función del tiempo de exposición, el cual fue evaluado a las profundidades de 0.1, 0.2 y 0.3 [cm], y con las irradiancias iniciales de 20, 60 y 150 $[mW/cm^2]$.



(a) 20 mW/cm^2 (b) 60 mW/cm^2

(c) 150 mW/cm^2

Figura 4.8: Concentración de $^3O_2$ como una función del tiempo de exposición, a distintas irradiancias iniciales.

En esta figura se observa que al primer minuto de exposición, la concentración de $^3O_2$ disminuye, en todas las profundidades analizadas y para todas las irradiancias, siendo con 20 $[mW/cm^2]$ en la que la disminución se da mínimamente.

Se observa también que con 20 $[mW/cm^2]$ en las profundidades de análisis y a un tiempo de exposición de 20 [min], la concentración de $^3O_2$ tiende a ser 39.9604 $[\mu M]$.

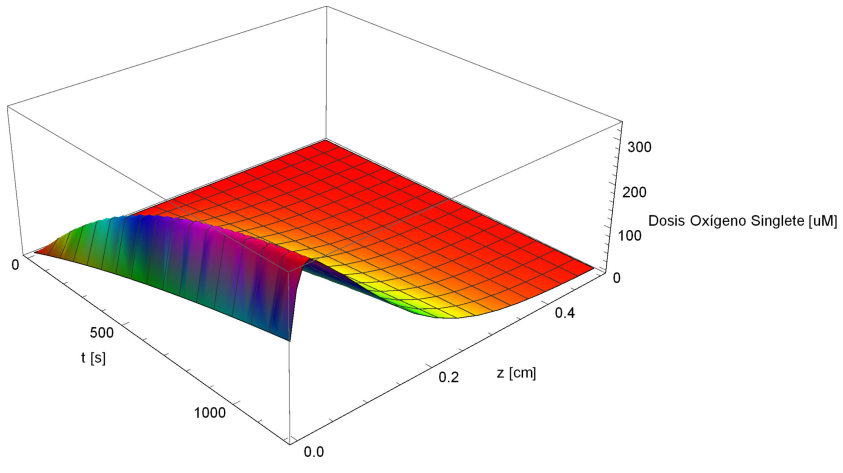
Con 60 $[mW/cm^2]$ en la profundidad de 0.1 [cm] y al primer minuto de exposición, se observa una disminución en la concentración de $^3O_2$ que llega hasta aproximadamente 22 $[\mu M]$.

Finalmente, para la irradiancia de 150 $[mW/cm^2]$ se aprecia que en la profundidad de 0.3 [cm] hay un comportamiento similar que con las irradiancias de 20 y 60, pero que a las profundidades de 0.1 y 0.2 [cm] cambia, se observa que la concentración de $^3O_2$ disminuye en el primer minuto, siendo para 0.1 [cm] la profundidad en la que se da la menor concentración de $^3O_2$, pasado el primer minuto de tratamiento con TFD,

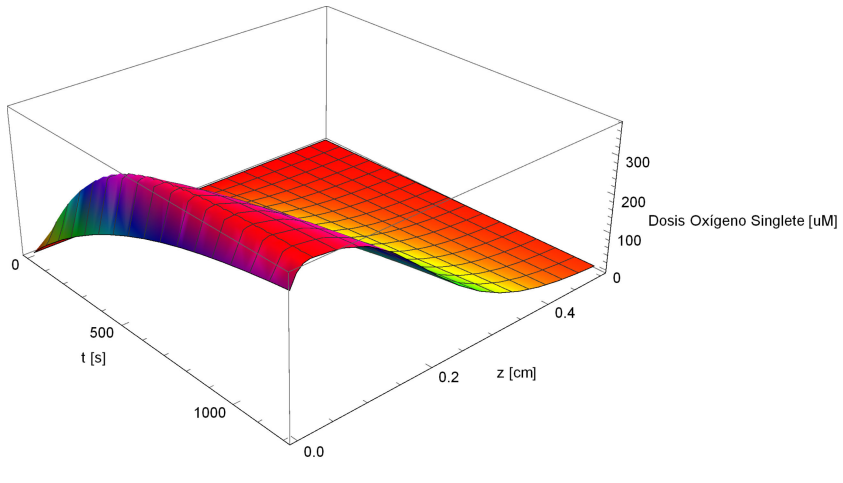
la concentración de $^3O_2$ vuelve a crecer hasta tiempos diferentes, para z=0.1 [cm] el aumento se da hasta los 5 [min] de exposición, y depués de este tiempo la concentración de $^3O_2$ disminuye hasta ser 0 [μM].

4.4. Evolución espacial y temporal para la dosis de oxígeno singlete

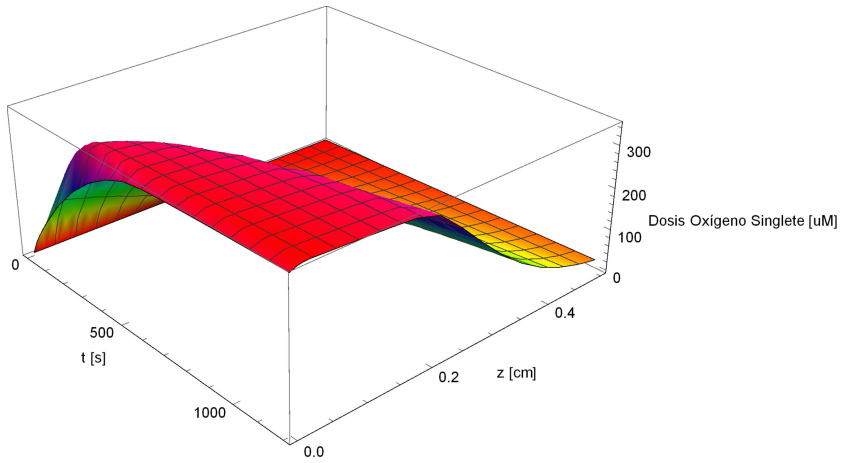
La figura 4.9 representa la distribución espacial y temporal de la dosis de $^1O_2$ para distintas irradiancias iniciales.



(a) 20 mW/cm^2



(b) 60 mW/cm^2



(c) 150 mW/cm^2

Figura 4.9: Distribución espacial y temporal de la dosis de $^1O_2$ a distintas irradiancias iniciales.

Para obtener el comportamiento de la dosis de $^1O_2$ en función de la profundidad

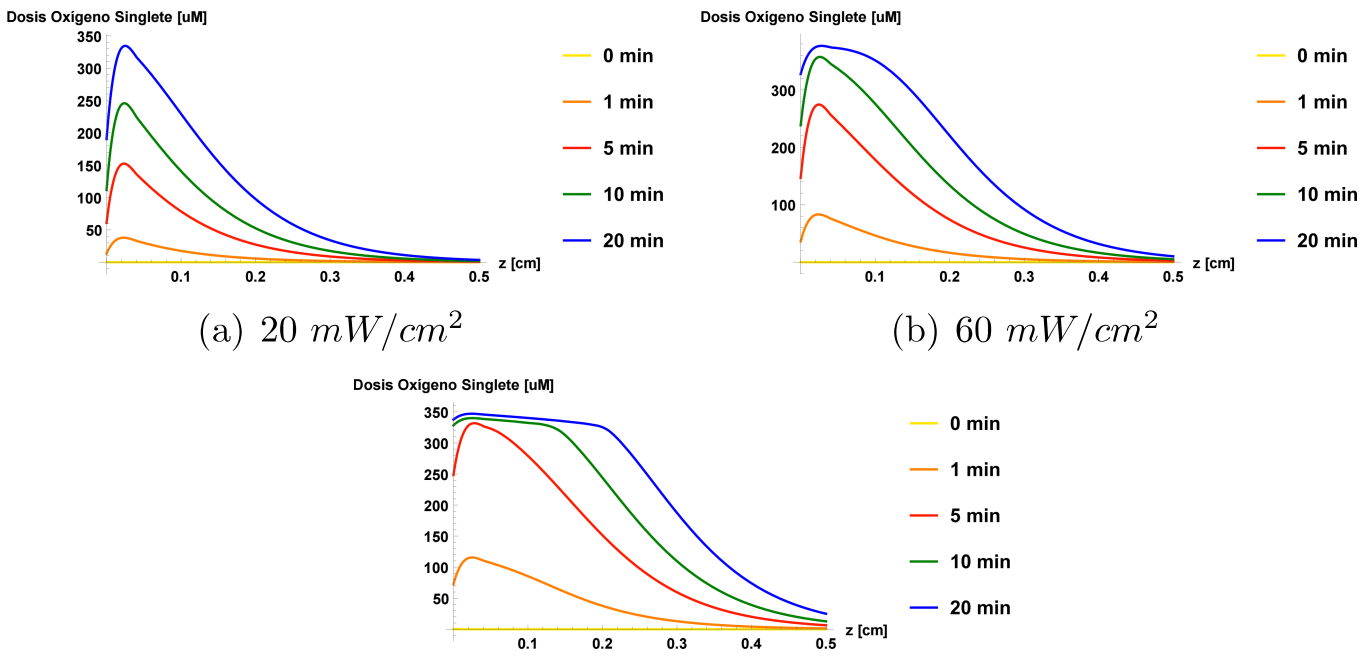
y tiempo de exposición se utilizó la ecuación (3.46). En la simulación se consideró una profundidad máxima de 0.5 [cm] y un tiempo de tratamiento de 20 [min]. Las irradiancias utilizadas fueron de 20, 60 y 150 $[mW/cm^2]$.

Con cada una de las irradiancias de manera general se observa en la figura 4.9 que al iniciar el tratamiento con TFD, la dosis de $^1O_2$ se incrementa al aumentar el tiempo de exposición, y la rapidez con la que incrementa es proporcional a la irradiancia utilizada.

El comportamiento de la dosis de $^1O_2$ con relación a la profundidad, se tiene que a una región cercana a la superficie y con las irradiancias de 20 y 60 $[mW/cm^2]$, aumenta hasta alcanzar un valor máximo, y después decrece hasta 0 μM. En [24] se describe este comportamiento para la dosis de $^1O_2$, en la que se utilizaron las propiedades ópticas de un tumor BCC y con una fuente de luz de 635 [nm]. Para 150 $[mW/cm^2]$ existe un intervalo de profundidad en la que la dosis de $^1O_2$ permanece constante antes de empezar a disminuir.

4.4.1. Dosis de $^1O_2$ vs profundidad

A continuación se indican los resultados obtenidos para la simulación de la dosis de $^1O_2$ como una función exclusiva de la profundidad, evaluada en los tiempos de exposición de 0, 1, 5, 10 y 20 [min]. Las irradiancias utilizadas fueron 20, 60 y 150 $[mW/cm^2]$.



(a) 20 mW/cm^2 (b) 60 mW/cm^2

(c) 150 mW/cm^2

Figura 4.10: Dosis de $^1O_2$ como una función de la profundidad para distintas irradiancias.

Sin TFD no se genera $^1O_2$ y por lo tanto no existe dosis de $^1O_2$, esto se aprecia en la figura 4.10 a t=0 [min].

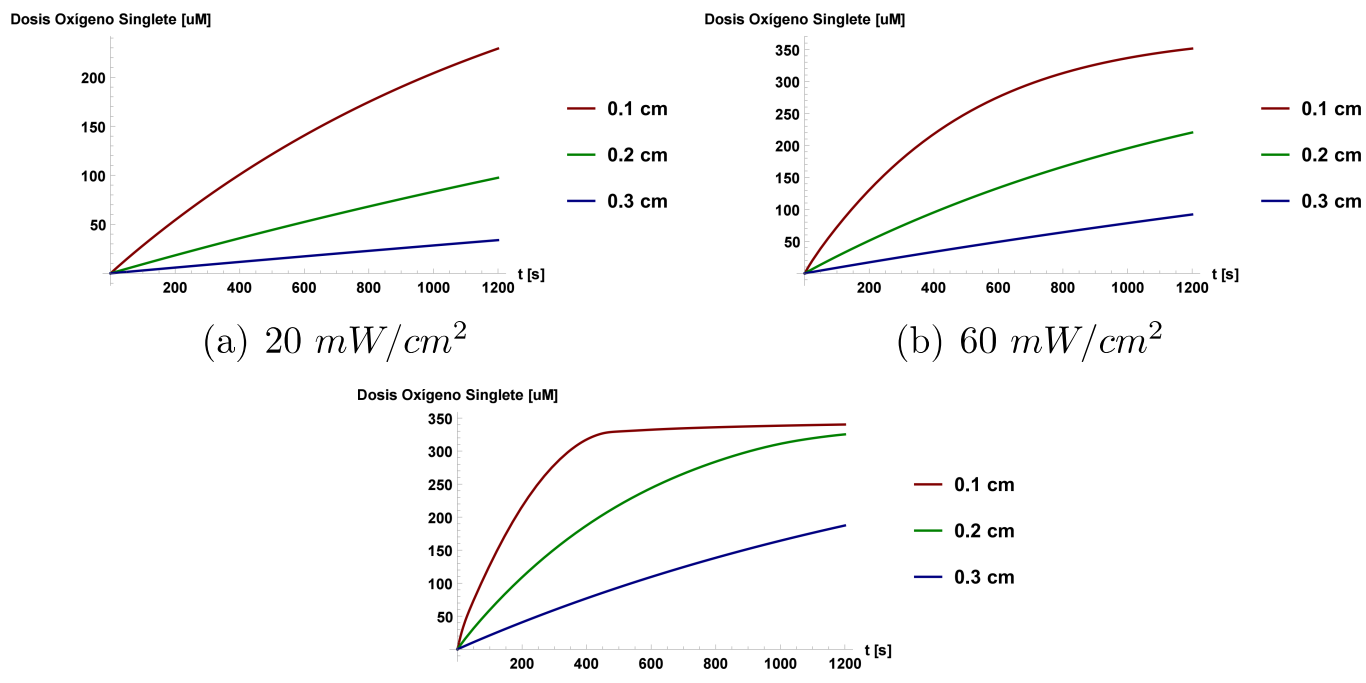
Hasta la profundidad de 0.02 [cm] se observa que la dosis de $^1O_2$ crece, de manera similar que lo hacia la tasa de fluencia de energía, y en z=0.02 [cm], la dosis de $^1O_2$

alcanza su valor máximo a 20 [min] de haber iniciado el tratamiento con TFD. Para z >0.02 [cm] la dosis de $^1O_2$ empieza a disminuir, sin importar la irradiancia utilizada. Nótese que para la irradiancia de 20 $[mW/cm^2]$ la forma en la que decrece es más acelerada en comparación con la irradiancia de 150 $[mW/cm^2]$. A la profundidad de 0.5 [cm] la dosis de $^1O_2$ tiende a ser 0 $[\mu M]$ para todos los tiempos.

Se observa también que a los 20 [min] de exposición y con la irradiancia de 60 $[mW/cm^2]$ la dosis de $^1O_2$ alcanza el valor máximo accesible, cercano a 380 $[\mu M]$.

4.4.2. Dosis de $^1O_2$ vs tiempo

En la figura 4.11 se indican los resultados de la simulación para la dosis $^1O_2$ como una función del tiempo de exposición, a distintas profundidades, y con las irradiancias de 20, 60 y 150 $[mW/cm^2]$.



(a) 20 mW/cm^2 (b) 60 mW/cm^2

(c) 150 mW/cm^2

Figura 4.11: Dosis de $^1O_2$ como una función del tiempo de exposición para distintas irradiancias.

En esta figura se observa que al aumentar el tiempo de exposición y para las profundidades analizadas, la dosis de $^1O_2$ aumenta, alcanzándose siempre la mayor dosis a 0.1 [cm] de profundidad, y la menor a 0.3 [cm].

Con la irradiancia de 150 $[mW/cm^2]$ se observa que aproximadamente a los 7 [min], se alcanza la máxima dosis de $^1O_2$ correspondiente a esta irradiancia, y hasta completar los 20 [min] la dosis de $^1O_2$ permanece en este valor.

Capítulo 5

Conclusiones

Se desarrolló un modelo unidimensional para estudiar el comportamiento de la PpIX, del oxígeno triplete y de la dosis de oxígeno singlete como una función de la profundidad y el tiempo de exposición. Este modelo se basa en la dinámica producida por el mecanismo tipo II de la TFD. Se acopló a este modelo el mecanismo de la respiración y el consumo metabólico, los cuales fueron considerados como factores fisiológicos actuando sobre el oxígeno triplete.

La distribución de la luz en el tejido expresada por la tasa de fluencia de energía es importante en TFD, dado que la absorción de la luz por parte del cromóforo del FS es el primer paso en el proceso de las reacciones fotofísicas, fotoquímicas y biológicas. La tasa de fluencia de energía encontrada y simulada en este trabajo se encuentra en función de los coeficientes μ_a, μ_s' y g, lo cual la convierte en una expresión útil para analizar el comportamiento de la luz en otros medios, tales como; un tumor, masa cerebral, vejiga, etc. siempre y cuando se conozcan estos coeficientes.

Para obtener un mejor ajuste del modelo desarrollado, en la ecuación (3.21) se utilizó tres veces el valor de D_{50}. Siendo D_{50} la dosis de $^1O_2$ requerida para reducir K_z a la mitad de su valor inicial, y K_z es la cantidad acumulada de $[^1O_2]$ que se encuentra interacuando con la concentración de biomoléculas $[A]$.

Se determina que existe una relación inversa entre el fotoblanqueamiento y la irradiación inicial, esto es, a mayor irradiación habrá menos moléculas de PpIX disponibles para las reacciones de la TFD. Se concluye que las moléculas de PpIX son fotoblanqueadas en una región cercana a la superficie.

Con respecto al oxígeno triplete, se determina que la disponibilidad de este para realizar TFD, depende de la fisiologia humana, es decir, en un paciente con tejido hipóxico los resultados con TFD no serán los mejores, puesto que las reacciones presentes en TFD deben competir con las reacciones propias del cuerpo del paciente, como lo son la respiración y el consumo metabólico. Por otra parte, el consumo en la concentración de $^3O_2$ causado por la TFD se da siempre hasta los 0.2 [cm] de profundidad, y 10 [min]

de tiempo de tratamiento, existiendo una relación directa con la irradiación inicial.

Para la dosis de $^1O_2$ se tiene que, con 4.4 $[\mu M]$ de PpIX en estado base, distribuida homogéneamente en la dermis, con una irradiancia de 60 $[mW/cm^2]$ y a 20 [min] de exposición, se puede generar cerca de 380 $[\mu M]$, lo cual no se consigue con las irradiancias de 20 y 150 $[mW/cm^2]$.

Referencias

[1] Bagnato, V. S. (2008). *Novas Técnicas ópticas para as áreas da saúde.* Sao Paulo. Livraria da Física.

[2] Grossweiner Leonard I. (2005). *The Science of Phototherapy:An Introduction.* The Netherlands. Springer.

[3] Krutmann, J., Hönigsmann, H., & Craig, A. (2009). *Dermatological Phototherapy and Photodiagnostic Methods.* Berlin. Springer.

[4] Zhu, T. & Finlay, J. (2008). The role of photodynamic therapy (PDT) physics. *Medical Physics* **35**: 3127-3136

[5] Wilson, B. & Patterson, M. (2008). The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys. Med. Biol.* **53**: 61-109.

[6] Plaetzer, K., Krammer, B., Berlanda, J., & Berr, F. (2009). Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Laser Med. Sci.* **24**: 259-268.

[7] Robledo, H.(2015). *Libro Láser VII Terapia fotodinámica: terapia láser baja intensidad.* Recuperado de http://www.centrolaservigo.com/publicaciones.php

[8] Markolf H. Niemz. (2007). *Laser-Tissue Interactions.* Tenneessee. USA. Springer.

[9] Martelli, F., Del Bianco, S., Ismaelli, A., & Zaccanti, G.(2010). *Light propagation through biological tissue and other diffusive media: theory, solutions, and software.* Bellingham, Washington. SPIE.

[10] Tuan Vo-Dihn. (2003). *Biomedical Photonics Handbook.* USA. CRC Press LCL.

[11] Pratavieira, S., Santos, P., Menezes, P., and et al. (2009). Phototransformation of Hematoporphyrin in Aqueous Solution: Anomalous Behavior at Low Oxygen Concentration. *Laser Physics.* **19**: 1263-1271.

[12] Nonell, S. & Flors, C. (2008). *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences.* United Kingdom. Reino Unido. The Royal Society of Chemestry.

[13] Finlay, J., Mitra, S., Patterson, M.& Foster, T. (2004). Photobleaching kinetics of Photofrin in vivo and in multicell tumour spheroids indicate two simultaneous bleaching mechanisms. *Phy. Med. Bio.* **49**: 4837–4860.

[14] Liu, B., Farrell, T. J., Patterson, M. S. & Jarvi, M.T.(2009). A Monte Carlo model of detected singlet oxygen luminescence and photosensitizer fluorescence during ALA-PDT of skin. *Proc. SPIE* **7380** 73806W (se also http:www.science.mcmaster.ca/medphys/faculty/22-michael-patterson.html)

[15] Dysart, J., Singh, G., & Patterson, M. (2005). Calculation of Singlet Oxygem Dose from Photosensitizer Fluorescence and Photobleaching Diring mTHPC Photodynamic Therapy of MLL Cells. *Photochemistry and Photobiology.* **81**: 196-205.

[16] Georgakoudi, I., & Foster, T. (1998). Singlet Oxygen-Versus Nonsinglet Oxigen-Mediated Mechanisms of Sensitizer Photobleaching and Their Effects on Photodynamic Dosimetry. *Photochemistry and Photobiology.* **67**: 612-625.

[17] Jarvi, M.,Patterson, M.,& Wilson, B. (2012). Insights into Photodynamic Therapy Dosimetry: Simultaneous Singlet Oxygen Luminescence and Photosensitizer Photobleaching Measurements *Biophysical Journal.* **102**: 661–671.

[18] Mang Thomas S. (2008). Dosimetric concepts for PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* **5**: 217-223.

[19] Wang, K., Finlay, J., Busch, T., Hahn, S., & Zhu, T. (2010). Explicit dosimetry for photodynamic therapy: macroscopic singlet oxygen modeling. *J. Biophoton.* **3**: 304–318.

[20] Liu, B., Farrell, T., & Patterson, M. (2011). A model-based comparison of implicit and direct dosimetry for ALA-PDT of skin. *SPIE-OSA Biomedical Optics.* **8092** 80920H-4.

[21] Potasek, M., Parilov, E., & Beeson, K.(2013).Calculation of singlet oxygen formation from one photon absorbing photosensitizers used in PDT. *Proc. of SPIE.* **8568** 85681D. (see also http://proceedings.spiedigitallibrary.org/)

[22] Weston. M., & Patterson, M. (2013). Monitoring oxygen concentration during photodynamic therapy using prompt photosensitizer fluorescence. *Phys. Med. Biol.* **58**: 7039–7059.

[23] Liu, B., Farrell, T. J., & Patterson, M. S. (2010). A dynamic model for ALA-PDT of skin: simulation of temporal and spatial distribution of ground-state oxygen, photosensitizer and singlet oxygen. *Phys. Med. Biol.* **55**: 5913-5932.

[24] Salas, I., Fanjul, F., & Arce, J. (2014). Superficial radially resolved fluorescence and 3D photochemical time-dependent model for photodynamic therapy. *Optics lettes.***39**: 1845-1848.

[25] Wachowska, M. et al.(2011).Aminolevulinic Acid (ALA) as a Prodrug in Photodynamic Therapy of Cancer. *Molecules.* **16**: 4140-4164.

[26] Tresguerres, J. et al. (2005). *Fisiología Humana.* Mexico. Mc Graw Hill.

[27] Heino, J., Arridge, S., Sikora, J., & Somersalo, E.(2003). Anisotropic effects in highly scattering media. *Physical Review E.* **68**: 031908 (8 pages).

[28] Akira Ishimaru. (1978). *Wave Propagation and scattering in random media, single scattering and transport theory.* USA. Academic Press.

[29] Lister, T., Philip, A., & Chappell, P. (2012). Optical properties of human skin. *Journal of Biomedical Optics.* **17**: 1-15.

[30] Salomatina, E., Jiang, B., Novak, J. & Yaroslavsky, A. (2006). Optical properties of normal and cancerous human skin in the visible and near-infrared spectral range *Journal of Biomedical Optics.* **6**: 064026 (9 pages).

[31] Berg, J., Tymoczko, J., & Stryer, L. (2002). *Biochemistry.* New York. W. H. Freeman.

[32] Stucker, M., et al. (2002). The cutaneous uptake of atmospheric oxygen contributes significantly to the oxygen supply of human dermis and epidermis. *J. Physiol.* **538**: 985-994.

[33] Wang, K., Mitra, S., & Foster, T. (2007). A comprehensive mathematical model of microcopic dose deposition in photodynamic therapy. *Med. Phys.* **34**: 282-293.

[34] Rollakanti, K. et. al. (2013). Techniques for fluorescence detection of protoporphyrin IX in skin cancers associated with photodynamic therapy. *Photonics Lasers Med..* **4**: 287–303.

[35] Ruskeepaa Heikki.(2008). *Mathematica Navigator.* Amsterdam. Elsevier.

Apéndice A

Anexos

A continuación se indican los códigos desarrollados en *Wolfram Mathematica 10.4 Student Edition* para la simulación de la dosimetría explícita en PDT.

Para la difución de la luz en la dermis

```
ua = 1.7;
uS = 25;
g = 0.8;
F00 = 0;
F0 = 20;
F1 = 60;
F2 = 150;

us = uS / (1 - g);
ut = ua + us;
uT = ua + uS;
ueff = Sqrt[3 ua * uT];
       raíz cuadrada
h = 2 / (3 uT);
f00[z_] = ((-2 * us * F00) / (1 + h ueff)) ((3 / 2) ((uT + g ut) (1 + h ut)) / (ueff ^ 2 - ut ^ 2) + (g / uT)) Exp[-ueff z] + ((3 us (uT + g ut)) / (ueff ^ 2 - ut ^ 2)) F00 Exp[-ut z];
                                                                                                  exponencial                                                  exponencial
f0[z_] = ((-2 * us * F0) / (1 + h ueff)) ((3 / 2) ((uT + g ut) (1 + h ut)) / (ueff ^ 2 - ut ^ 2) + (g / uT)) Exp[-ueff z] + ((3 us (uT + g ut)) / (ueff ^ 2 - ut ^ 2)) F0 Exp[-ut z];
                                                                                                  exponencial                                                  exponencial
f1[z_] = ((-2 * us * F1) / (1 + h ueff)) ((3 / 2) ((uT + g ut) (1 + h ut)) / (ueff ^ 2 - ut ^ 2) + (g / uT)) Exp[-ueff z] + ((3 us (uT + g ut)) / (ueff ^ 2 - ut ^ 2)) F1 Exp[-ut z];
                                                                                                  exponencial                                                  exponencial
f2[z_] = ((-2 * us * F2) / (1 + h ueff)) ((3 / 2) ((uT + g ut) (1 + h ut)) / (ueff ^ 2 - ut ^ 2) + (g / uT)) Exp[-ueff z] + ((3 us (uT + g ut)) / (ueff ^ 2 - ut ^ 2)) F2 Exp[-ut z];
                                                                                                  exponencial                                                  exponencial
```

Tasa de fluencia de energía

```
TFE00 = Plot[f00[z], {z, 0, 0.5}, PlotRange → All, AxesOrigin → Automatic, PlotStyle → RGBColor[0.5, 0.5, 0.5], PlotLegends → {"0 [mW/cm^2]"},
        representación gráfica      rango de repr···  todo  origen de ejes  automático  estilo de repre···  color RGB                leyendas de representación
  LabelStyle → {GrayLevel[0], Bold}, AxesLabel → {"z [cm]", "Fex(z) [mW/cm^2]"}]
  estilo de etiqueta  nivel de gris  negrita  etiqueta de ejes
TFE0 = Plot[f0[z], {z, 0, 0.5}, PlotRange → All, AxesOrigin → Automatic, PlotStyle → RGBColor[1, 0, 0], PlotLegends → {"20 [mW/cm^2]"},
        representación gráfica      rango de repr···  todo  origen de ejes  automático  estilo de repre···  color RGB                leyendas de representación
  LabelStyle → {GrayLevel[0], Bold}, AxesLabel → {"z [cm]", "Fex(z) [mW/cm^2]"}]
  estilo de etiqueta  nivel de gris  negrita  etiqueta de ejes
TFE1 = Plot[f1[z], {z, 0, 0.5}, PlotRange → All, AspectRatio → 1, PlotStyle → RGBColor[0, 1, 0], PlotLegends → {"60 [mW/cm^2]"},
        representación gráfica      rango de repr···  todo  cociente de aspecto  estilo de repre···  color RGB                leyendas de representación
  LabelStyle → {GrayLevel[0], Bold}, AxesLabel → {"z [cm]", "Fex(z) [mW/cm^2]"}]
  estilo de etiqueta  nivel de gris  negrita  etiqueta de ejes
TFE2 = Plot[f2[z], {z, 0, 0.5}, PlotRange → All, AspectRatio → 1, PlotStyle → RGBColor[0, 0, 1], PlotLegends → {"150 [mW/cm^2]"},
        representación gráfica      rango de repr···  todo  cociente de aspecto  estilo de repre···  color RGB                leyendas de representación
  LabelStyle → {GrayLevel[0], Bold}, AxesLabel → {"z [cm]", "Fex(z) [mW/cm^2]"}]
  estilo de etiqueta  nivel de gris  negrita  etiqueta de ejes
Show[TFE00, TFE0, TFE1, TFE2]
muestra
```

Dosimetría explícita en TFD

```
u = 0.00009;
e = 0.0037;
b = 11.9;
d = 128;
Gmax = 1.5;
k50 = 0.5;
K0 = 0.037;
a = 0.08;
D50 = 3 * 191;
Ov = 80;

sol = NDSolve[{D[x[t, z], t] == -u * e * f0[z] (y[t, z] / (b + y[t, z])) (x[t, z] + d) x[t, z],
    D[y[t, z], t] == -e * f0[z] (y[t, z] / (b + y[t, z])) x[t, z] - Gmax (y[t, z] / (k50 + y[t, z])) + K0 (1 - (1 / (1 + Exp[-a (w[t, z] - D50)]))) (Ov - y[t, z]),
    D[w[t, z], t] == e * f0[z] (y[t, z] / (b + y[t, z])) x[t, z], x[0, z] == 4.4 , y[0, z] == 39.9604, w[0, z] == 0}, {x, y, w}, {t, 0, 1200}, {z, 0, 0.5}]
```

Para la PpIX en estado base

```
Fotosensibilizante = Plot3D[Evaluate[x[t, z] /. sol], {t, 0, 1200}, {z, 0, 0.5}, AxesStyle → Black, PlotRange → All, Axes → True,
  AxesLabel → {"t [s]", "z [cm]", "PpIX [uM]"}, ColorFunction → Hue]
```

Para la PpIX vs la profundidad

```
Fotot0min = Plot[Evaluate[x[0, z] /. sol], {z, 0, 0.5}, PlotRange → All, AxesOrigin → {0, 0}, PlotStyle → RGBColor[1, 0.9, 0], PlotLegends → {"0 min"},
  LabelStyle → {GrayLevel[0], Bold}, AxesLabel → {"z [cm]", "PpIX [uM]"}]
Fotot1min = Plot[Evaluate[x[60, z] /. sol], {z, 0, 0.5}, PlotRange → All, AxesOrigin → {0, 0}, PlotStyle → RGBColor[1, 0.5, 0], PlotLegends → {"1 min"},
  LabelStyle → {GrayLevel[0], Bold}, AxesLabel → {"z [cm]", "PpIX [uM]"}]
Fotot5min = Plot[Evaluate[x[300, z] /. sol], {z, 0, 0.5}, PlotRange → All, AxesOrigin → {0, 0}, PlotStyle → RGBColor[1, 0.1, 0], PlotLegends → {"5 min"},
  LabelStyle → {GrayLevel[0], Bold}, AxesLabel → {"z [cm]", "PpIX [uM]"}]
Fotot10min = Plot[Evaluate[x[600, z] /. sol], {z, 0, 0.5}, PlotRange → All, AxesOrigin → {0, 0}, PlotStyle → RGBColor[0, 0.5, 0], PlotLegends → {"10 min"},
  LabelStyle → {GrayLevel[0], Bold}, AxesLabel → {"z [cm]", "PpIX [uM]"}]
Fotot20min = Plot[Evaluate[x[1200, z] /. sol], {z, 0, 0.5}, PlotRange → All, AxesOrigin → {0, 0}, PlotStyle → RGBColor[0, 0, 1], PlotLegends → {"20 min"},
  LabelStyle → {GrayLevel[0], Bold}, AxesLabel → {"z [cm]", "PpIX [uM]"}]
Show[Fotot0min, Fotot1min, Fotot5min, Fotot10min, Fotot20min]
```

Para la PpIX vs el tiempo

```
Foto1mm = Plot[Evaluate[x[t, 0.1] /. sol], {t, 0, 1200}, PlotRange → All, AxesOrigin → {0, 0}, PlotStyle → RGBColor[0.5, 0, 0], PlotLegends → {"0.1 cm"},
  LabelStyle → {GrayLevel[0], Bold}, AxesLabel → {"t [s]", "PpIX [uM]"}]
Foto2mm = Plot[Evaluate[x[t, 0.2] /. sol], {t, 0, 1200}, PlotRange → All, AxesOrigin → {0, 0}, PlotStyle → RGBColor[0, 0.5, 0], PlotLegends → {"0.2 cm"},
  LabelStyle → {GrayLevel[0], Bold}, AxesLabel → {"t [s]", "PpIX [uM]"}]
Foto3mm = Plot[Evaluate[x[t, 0.3] /. sol], {t, 0, 1200}, PlotRange → All, AxesOrigin → {0, 0}, PlotStyle → RGBColor[0, 0, 0.5], PlotLegends → {"0.3 cm"},
  LabelStyle → {GrayLevel[0], Bold}, AxesLabel → {"t [s]", "PpIX [uM]"}]
Show[Foto1mm, Foto2mm, Foto3mm]
```

Para el oxígeno triplete

```
Oxigeno1 = Plot3D[Evaluate[y[t, z] /. sol], {t, 0, 1200}, {z, 0, 0.5}, AxesStyle → Black, PlotRange → All, Mesh → None, ColorFunction → Hue,
  Axes → True, AxesLabel → {"t [s]", "z [cm]", "Oxígeno Triplete [uM]"}]
```

Para el oxígeno triplete vs la profundidad

```
Oxi1t0min = Plot[Evaluate[y[0, z] /. sol], {z, 0, 0.5}, PlotRange → All, AxesOrigin → {0, 0}, PlotStyle → RGBColor[1, 0.9, 0], PlotLegends → {"0 min"},
            repr··· evalúa                                rango de repr··· todo origen de ejes      estilo de repre··· color RGB          leyendas de representación
  LabelStyle → {GrayLevel[0], Bold}, AxesLabel → {"z [cm]", "Oxígeno triplete [uM]"}]
  estilo de etiqueta nivel de gris negrita etiqueta de ejes
Oxi1t1min = Plot[Evaluate[y[60, z] /. sol], {z, 0, 0.5}, PlotRange → All, AxesOrigin → {0, 0}, PlotStyle → RGBColor[0.5, 0.5, 0.5], PlotLegends → {"1 min"},
            repr··· evalúa                                rango de repr··· todo origen de ejes      estilo de repre··· color RGB          leyendas de representación
  LabelStyle → {GrayLevel[0], Bold}, AxesLabel → {"z [cm]", "Oxígeno triplete [uM]"}]
  estilo de etiqueta nivel de gris negrita etiqueta de ejes
Oxi1t5min = Plot[Evaluate[y[300, z] /. sol], {z, 0, 0.5}, PlotRange → All, AxesOrigin → {0, 0}, PlotStyle → RGBColor[1, 0.1, 0], PlotLegends → {"5 min"},
            repr··· evalúa                                rango de repr··· todo origen de ejes      estilo de repre··· color RGB          leyendas de representación
  LabelStyle → {GrayLevel[0], Bold}, AxesLabel → {"z [cm]", "Oxígeno triplete [uM]"}]
  estilo de etiqueta nivel de gris negrita etiqueta de ejes
Oxi1t10min = Plot[Evaluate[y[600, z] /. sol], {z, 0, 0.5}, PlotRange → All, AxesOrigin → {0, 0}, PlotStyle → RGBColor[0, 0.5, 0], PlotLegends → {"10 min"},
             repr··· evalúa                                rango de repr··· todo origen de ejes      estilo de repre··· color RGB          leyendas de representación
  LabelStyle → {GrayLevel[0], Bold}, AxesLabel → {"z [cm]", "Oxígeno triplete [uM]"}]
  estilo de etiqueta nivel de gris negrita etiqueta de ejes
Oxi1t20min = Plot[Evaluate[y[1200, z] /. sol], {z, 0, 0.5}, PlotRange → All, AxesOrigin → {0, 0}, PlotStyle → RGBColor[0, 0, 1], PlotLegends → {"20 min"},
             repr··· evalúa                                rango de repr··· todo origen de ejes      estilo de repre··· color RGB          leyendas de representación
  LabelStyle → {GrayLevel[0], Bold}, AxesLabel → {"z [cm]", "Oxígeno triplete [uM]"}]
  estilo de etiqueta nivel de gris negrita etiqueta de ejes
Show[Oxi1t0min, Oxi1t1min, Oxi1t5min, Oxi1t10min, Oxi1t20min]
muestra
```

Para el oxígeno triplete vs el tiempo

```
Oxi1z1mm = Plot[Evaluate[y[t, 0.1] /. sol], {t, 0, 1200}, PlotRange → All, AxesOrigin → {0, 0}, PlotStyle → RGBColor[0.5, 0, 0], PlotLegends → {"0.1 cm"},
           repr··· evalúa                                 rango de repr··· todo origen de ejes      estilo de repre··· color RGB          leyendas de representación
  LabelStyle → {GrayLevel[0], Bold}, AxesLabel → {"t [s]", "Oxígeno triplete [uM]"}]
  estilo de etiqueta nivel de gris negrita etiqueta de ejes
Oxi1z2mm = Plot[Evaluate[y[t, 0.2] /. sol], {t, 0, 1200}, PlotRange → All, AxesOrigin → {0, 0}, PlotStyle → RGBColor[0, 0.5, 0], AxesOrigin → {0, 0},
           repr··· evalúa                                 rango de repr··· todo origen de ejes      estilo de repre··· color RGB          origen de ejes
  PlotLegends → {"0.2 cm"}, LabelStyle → {GrayLevel[0], Bold}, AxesLabel → {"t [s]", "Oxígeno triplete [uM]"}]
  leyendas de representación estilo de etiqueta nivel de gris negrita etiqueta de ejes
Oxi1z3mm = Plot[Evaluate[y[t, 0.3] /. sol], {t, 0, 1200}, PlotRange → All, AxesOrigin → {0, 0}, PlotStyle → RGBColor[0, 0, 0.5], AxesOrigin → {0, 0},
           repr··· evalúa                                 rango de repr··· todo origen de ejes      estilo de repre··· color RGB          origen de ejes
  PlotLegends → {"0.3 cm"}, LabelStyle → {GrayLevel[0], Bold}, AxesLabel → {"t [s]", "Oxígeno triplete [uM]"}]
  leyendas de representación estilo de etiqueta nivel de gris negrita etiqueta de ejes
Show[Oxi1z1mm, Oxi1z2mm, Oxi1z3mm]
muestra
```

Para la dosis de $^1O_2$

```
dosisOxigeno = Plot3D[Evaluate[w[t, z] /. sol], {t, 0, 1200}, {z, 0, 0.5}, AxesStyle → Black, PlotRange → All, Axes → True,
               represe··· evalúa                                            estilo de ejes negro rango de repr··· todo ejes verdade
  AxesLabel → {"t [s]", "z [cm]", "Dosis Oxígeno Singlete [uM]"}, ColorFunction → Hue]
  etiqueta de ejes                                                función de color tonalidad
```

Para la dosis de $^1O_2$ vs la profundidad

```
Dosit0min = Plot[Evaluate[w[0, z] /. sol], {z, 0, 0.5}, PlotRange → All, PlotStyle → RGBColor[1, 0.9, 0], AxesOrigin → {0, 0}, PlotLegends → {"0 min"},
            repr··· evalúa                                rango de repr··· todo estilo de repre··· color RGB          origen de ejes          leyendas de representación
  LabelStyle → {GrayLevel[0], Bold}, AxesLabel → {"z [cm]", "Dosis Oxígeno Singlete [uM]"}]
  estilo de etiqueta nivel de gris negrita etiqueta de ejes
Dosit1min = Plot[Evaluate[w[60, z] /. sol], {z, 0, 0.5}, PlotRange → All, PlotStyle → RGBColor[1, 0.5, 0], AxesOrigin → {0, 0}, PlotLegends → {"1 min"},
            repr··· evalúa                                rango de repr··· todo estilo de repre··· color RGB          origen de ejes          leyendas de representación
  LabelStyle → {GrayLevel[0], Bold}, AxesLabel → {"z [cm]", "Dosis Oxígeno Singlete [uM]"}]
  estilo de etiqueta nivel de gris negrita etiqueta de ejes
Dosit5min = Plot[Evaluate[w[300, z] /. sol], {z, 0, 0.5}, PlotRange → All, PlotStyle → RGBColor[1, 0.1, 0], AxesOrigin → {0, 0}, PlotLegends → {"5 min"},
            repr··· evalúa                                rango de repr··· todo estilo de repre··· color RGB          origen de ejes          leyendas de representación
  LabelStyle → {GrayLevel[0], Bold}, AxesLabel → {"z [cm]", "Dosis Oxígeno Singlete [uM]"}]
  estilo de etiqueta nivel de gris negrita etiqueta de ejes
Dosit10min = Plot[Evaluate[w[600, z] /. sol], {z, 0, 0.5}, PlotRange → All, PlotStyle → RGBColor[0, 0.5, 0], AxesOrigin → {0, 0}, PlotLegends → {"10 min"},
             repr··· evalúa                                rango de repr··· todo estilo de repre··· color RGB          origen de ejes          leyendas de representación
  LabelStyle → {GrayLevel[0], Bold}, AxesLabel → {"z [cm]", "Dosis Oxígeno Singlete [uM]"}]
  estilo de etiqueta nivel de gris negrita etiqueta de ejes
Dosit20min = Plot[Evaluate[w[1200, z] /. sol], {z, 0, 0.5}, PlotRange → All, PlotStyle → RGBColor[0, 0, 1], AxesOrigin → {0, 0}, PlotLegends → {"20 min"},
             repr··· evalúa                                rango de repr··· todo estilo de repre··· color RGB          origen de ejes          leyendas de representación
  LabelStyle → {GrayLevel[0], Bold}, AxesLabel → {"z [cm]", "Dosis Oxígeno Singlete [uM]"}]
  estilo de etiqueta nivel de gris negrita etiqueta de ejes
Show[Dosit0min, Dosit1min, Dosit5min, Dosit10min, Dosit20min]
muestra
```

Para la dosis de $^1O_2$ vs el tiempo

```
Dosi1mm = Plot[Evaluate[w[t, 0.1] /. sol], {t, 0, 1200}, PlotRange → All, PlotStyle → RGBColor[0.5, 0, 0], AxesOrigin → {0, 0}, PlotLegends → {"0.1 cm"},
          repr··· evalúa                                  rango de repr··· todo estilo de repre··· color RGB                origen de ejes          leyendas de representación
  LabelStyle → {GrayLevel[0], Bold}, AxesLabel → {"t [s]", "Dosis Oxígeno Singlete [uM]"}]
  estilo de etiqueta nivel de gris negrita etiqueta de ejes
Dosi2mm = Plot[Evaluate[w[t, 0.2] /. sol], {t, 0, 1200}, PlotRange → All, PlotStyle → RGBColor[0, 0.5, 0], AxesOrigin → {0, 0}, PlotLegends → {"0.2 cm"},
          repr··· evalúa                                  rango de repr··· todo estilo de repre··· color RGB                origen de ejes          leyendas de representación
  LabelStyle → {GrayLevel[0], Bold}, AxesLabel → {"t [s]", "Dosis Oxígeno Singlete [uM]"}]
  estilo de etiqueta nivel de gris negrita etiqueta de ejes
Dosi3mm = Plot[Evaluate[w[t, 0.3] /. sol], {t, 0, 1200}, PlotRange → All, PlotStyle → RGBColor[0, 0, 0.5], AxesOrigin → {0, 0}, PlotLegends → {"0.3 cm"},
          repr··· evalúa                                  rango de repr··· todo estilo de repre··· color RGB                origen de ejes          leyendas de representación
  LabelStyle → {GrayLevel[0], Bold}, AxesLabel → {"t [s]", "Dosis Oxígeno Singlete [uM]"}]
  estilo de etiqueta nivel de gris negrita etiqueta de ejes
Show[Dosi1mm, Dosi2mm, Dosi3mm]
muestra
```