

# **ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL**

## **ESCUELA DE CIENCIAS**

### **DELIMITACIÓN DE TEJIDO CANCEROSO IN VIVO MEDIANTE FLUORESCENCIA INDUCIDA POR LÁSER (LIF) Y AVANCE TEORICO PARA SU TRATAMIENTO FOTODINÁMICO**

**PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE FÍSICO**

**MARIA PAULINA ROMERO OBANDO**

**DIRECTOR: EDY AYALA, Ph.D.**

**QUITO, JUNIO DE 2007**

## DECLARACIÓN

Yo, María Paulina Romero Obando, declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentada para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Politécnica Nacional, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normatividad institucional vigente.

---

María Paulina Romero Obando

## **CERTIFICACIÓN**

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por María Paulina Romero Obando, bajo mi supervisión.

---

**Edy Ayala Ph.D.**

A Dios que guía mi camino  
Y que se ha plasmado en mi familia:  
Cristina, Yolanda, Ángel, Silvana, Milton, Mónica.  
Sin cuyo amor, respaldo y comprensión  
No hubiera sido posible este trabajo.  
A los Doctores Eduardo Avalos y Edy Ayala  
por su confianza y ayuda en todo momento  
A los pacientes Dermatológicos  
Del HCAM y “Gonzalo Gonzáles”  
Al personal medico y administrativo  
Que a más de su colaboración y guía científica  
Me han brindado su amistad y cariño  
A mis amigos los Físicos de la Escuela Politécnica Nacional  
Con quienes compartí mis alegrías y tristezas  
Y demás personas que de una u otra manera  
hicieron posible la realización de este trabajo,

**GRACIAS**

*¿ esos ojos negros en cuyo interior mora un ser infinito, grandioso y eterno  
que crece y evoluciona y que guarda una energía inimaginable, listo para  
despertar, vibrar, expandirse. . .*

*Esos ojos profundos fuente de mi inspiración y aspiración.*

*Mi fuerza, mi refugio, mi guía. . . .*

*¿ mi hija Cristina Cecibel*

*Que Dios te bendiga*

## CONTENIDO

RESUMEN .....	1
PRESENTACION.....	3
CAPÍTULOS	
1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	
2.1 CÁNCER DE PIEL.....	8
2.1.1 Piel y sus diferentes capas.....	8
2.1.2 Biología Molecular y Cáncer.....	9
2.2 TERAPIA FOTODINÁMICA.....	13
2.2.1 Generalidades de la Terapia Fotodinámica.....	13
2.2.2 Aplicaciones de la Terapia Fotodinámica.....	17
2.2.2.1 Enfermedades Dermatológicas.....	17
2.3 INTERACCION DE LA LUZ CON EL TEJIDO.....	18
2.3.1 Absorción molecular inducida por láser.....	20
2.3.2 Calor inducido por láser.....	20
2.3.3 Daño fotoquímico inducido por láser.....	21
2.3.4 Fluorescencia inducida por láser.....	21
2.3.5 Dispersión elástica.....	23
2.3.5.1 Dispersión Anisotrópica.....	25
2.3.6 Dispersión Raman.....	27
2.4 FLUORESCENCIA INDUCIDA POR LÁSER.....	27
2.4.1 Mecanismo de Acción de la Fluorescencia Inducida .....	28
2.4.2 Importancia de la Fluorescencia Inducida por láser.....	29
2.5 FLUOROSENSOR BDCF.....	30
2.5.1 Diodo Láser azul.....	30
2.5.2 Conformación Fluorosensor BDCF.....	31
3. DELIMITACION DE TEJIDO CANCEROSO <i>IN VIVO</i> (FASE DIAGNOSTICO)	
3.1 TÉCNICA EMPLEADA.....	33
3.2 SELECCIÓN DE PACIENTES.....	34
3.3 PROTOCOLOS EMPLEADOS.....	35
3.3.1 Protocolo Individual.....	35
3.3.2 Protocolo General.....	35
3.3.3 Protocolo Médico Dermatólogo.....	36
3.3.4 Protocolo Físico- Medico.....	36

3.3.5	Protocolo Cirujano Dermatólogo.....	36
3.3.6	Protocolo Histopatológico.....	36
3.3.7	Instrucciones al Paciente.....	37
3.3.8	Consentimiento de Paciente.....	37
3.3.9	Protocolo Tratamiento.....	37
3.4	ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS DE FLUORESCENCIA INDUCIDA.....	37
3.4.1	Modelación de Curvas de Isoprobabilidad alrededor del tejido tumoral .....	37
3.4.2	Sensibilidad y especificidad de la técnica.....	41
4	TRATAMIENTO	
4.1	MODELO DE PROPAGACION DE LUZ EN EL TEJIDO.....	43
4.1.1	Teoría de Transporte.....	43
4.1.2	Resolución de la Ecuación de Transporte mediante el desarrollo en esféricos armónicos de las funciones $L(\vec{r}, \Omega_s, t)$ y $p(\Omega_s \wedge \Omega_s)$ .....	46
4.1.3	Aproximación estacionaria.....	48
4.1.4	Ecuación estacionaria en medio semi- infinito.....	49
5	RESULTADOS.....	57
6	DISCUSION.....	61
7	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	64
	FUTUROS TRABAJOS.....	66
	GLOSARIO.....	67
	ANEXOS.....	69
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

<b>INDICE DE GRAFICOS</b>	<b>Pags.</b>
Grafico1. Ciclo del ALA.....	15
Grafico2. Aplicaciones ópticas en medicina.....	20
Grafico3. Absorción de varios fluoróforos.....	22
Grafico4. Aproximación para un tejido (blanco) grueso .....	23
Grafico5. Parámetros geométricos para la teoría de transporte.....	26
Grafico6. Difusión refractante.....	26
Grafico7. Dispersión Raman.....	27
Grafico8. Diagrama de niveles de energía de Fotosensibilizante.....	29
Grafico9. Montaje fluorosensor.....	32
Grafico10. Matriz sobre tejido canceroso.....	35
Grafico11. Espectro fluorescente.....	38
Grafico12. Curva de isoprobabilidad Matlab 6.5.....	40
Grafico13. Medidas del tumor.....	41
Grafico14. Modelización incidencia de luz en el tejido.....	43
Grafico15. Componentes térmicos de la ecuación de transporte.....	45
Grafico16. Aproximación Teoría de Difusión.....	46
Grafico17. Tasa de fluencia con fuente puntual.....	48
Grafico18. Esquema aproximación de las condiciones de borde .....	49
Grafico19. Tasa de fluencia vs. Profundidad para una fuente.....	51
Grafico20. Tasa de fluencia vs. Superficie para una fuente.....	52
Grafico21. Curvas de isodosis.....	53
Grafico22. Irradiación con n fibras en la superficie $\rho(x,y)$ .....	53
Grafico23. Tasa de fluencia total para n fibras en la superficie $\rho+an$ .....	54
Grafico24. Irradiación con n fuentes a la profundidad $z_0+an$ .....	54
Grafico25. Tasa de fluencia vs. Superficie con n fuentes a la profundidad $z_0+an$ .....	55
Grafico26. Tasa de fluencia vs. Profundidad con n fuentes a la profundidad $z_0+an$ .....	55
Grafico27. Tasa de fluencia para diferentes longitudes de onda .....	55
Grafico28. Tasa de fluencia vs. Profundidad con n fuentes a la profundidad $z_0$ arbitraria.....	56
Grafico29. Tipos de curvas de isoprobabilidad.....	57
Grafico30. Aproximación puntos experimentales.....	58

<b>INDICE DE ANEXOS</b>	<b>Pags.</b>
1. Protocolo Individual.....	69
2. Protocolo General.....	71
3. Protocolo Médico Dermatólogo.....	73
4. Protocolo Físico- Medico.....	74
5. Protocolo Cirujano Dermatólogo.....	75
6. Protocolo Histopatológico.....	76
7. Instrucciones al Paciente.....	77
8. Consentimiento de Paciente.....	78
9. Hoja de datos Acido delta Aminolevulínico.....	79
10. Identidades para resolución de Integrales.....	80

## RESUMEN

Esta tesis se la ha dividido en dos partes o etapas: diagnóstico y tratamiento, que forman parte de la técnica denominada Terapia Fotodinámica, siendo estas etapas independientes entre si, es decir, se puede realizar la primera parte(diagnostico) complementada con un tratamiento diferente como crioterapia o cirugía (técnicas utilizadas comúnmente en el manejo de cáncer de piel no melanoma), o se puede utilizar los conceptos teóricos desarrollado en la segunda parte(tratamiento) y para diagnostico pueden utilizarse otras técnicas de biopsias; pero si se complementan las dos fases desarrolladas en este estudio, se tiene resultados satisfactorios tanto para pacientes como para médicos dermatólogos debido a las ventajas que presenta esta técnica en relación con las tradicionalmente utilizadas en el manejo de dichas neoplasias.

La etapa de diagnóstico consiste en la delimitación de tejido tumoral en un estudio *in vivo* mediante Fluorescencia Inducida por Láser LIF realizado en el Hospital Carlos Andrade Marín y Dermatológico Gonzalo González, donde se seleccionó pacientes con cáncer de piel no melanoma que cumplan con un criterio de inclusión aplicado por el medico dermatólogo para aplicar esta técnica de Fluorescencia que se basa en un diodo láser de 400nm de longitud de onda continua y mediante de los espectros de fluorescencia obtenidos al realizar un barrido punto a punto en todo el tejido tumoral y sus alrededores, realizar una delimitación del tumor mediante curvas de isoprobabilidad y definir en este trabajo un criterio sobre la extensión de piel sana alrededor del tumor que es excerizado por el cirujano y evitar recidivas futuras; los protocolos empleados en los pacientes son de gran importancia a la hora de comprobar la sensibilidad y especificidad del mismo; demás se describe el manejo de las lecturas de los espectros de fluorescencia inducida para la elaboración de las curvas de isoprobabilidad (en base a una definición de la probabilidad que exista células cancerosas) en donde se encontró que el intervalo de curva del 15% y al 35% es el mas eficiente según examinación histopatológica.

En la etapa de tratamiento, se realiza una formulación teórica sobre la distribución de la luz en el tejido (al ser irradiado con luz láser de 635 nm y continuo) a través de la resolución de la ecuación de transporte que tomando en cuenta la parte Isotrópica de la radiancia de la luz y su desarrollo en esféricos armónicos, se obtiene, para el caso estacionario, la ley de Fick que resolviéndola para un modelo infinito se obtiene la

distribución de la tasa de fluencia  $\Phi(r)$  cuya aplicación directa es el fraccionamiento de la dosis administrada al paciente para provocar una fotoexcitación del tejido y generar un cambio en el oxígeno molecular de singlete a triplete induciendo apoptosis celular de forma selectiva.

Se toma en cuenta también varios arreglos de fuentes de excitación para un modelo semi- infinito (dos fases aire- piel) y encontrar la distribución de la tasa de fluencia dentro del tejido cuya aplicación directa será el efectuar una dosimetría que permita una fotoexcitación del tejido irradiado provocando apoptosis celular de forma selectiva; se tiene que al colocar varias fuentes de luz a diferente profundidad se observa una mayor irradiación del tejido(en profundidad) y por lo tanto mas área irradiada; se generaliza estos resultados para fuentes de excitación de diferente longitud de onda colocadas en la superficie donde se obtiene diferentes profundidades de penetración de la luz en el tejido y cuyos resultados se los pone en discusión debido a las consideraciones tomadas para su aplicación.

## PRESENTACIÓN

La presente tesis recoge el trabajo realizado por alrededor de dos años de estudios tanto teóricos como experimentales, revisiones bibliográficas, discusiones, etc., en la Escuela Politécnica Nacional, Hospital "Carlos Andrade Marín" y Hospital Dermatológico Gonzalo Gonzáles; trabajo arduo de un grupo multidisciplinario formado por Físicos, Médicos en general, Cirujanos, Patólogos, Enfermeras y Personal Administrativo, que al avance de la Tecnología, han considerado de suma importancia el estudio de nuevas técnicas para el diagnóstico y tratamiento de cáncer.

Con este propósito se desarrolla el presente trabajo donde la técnica llamada Terapia Fotodinámica (fase diagnóstico y tratamiento) es aplicada in vivo comprobándose su eficiencia en la primera fase y formulándose un análisis teórico acerca del tratamiento para aplicarlo en cáncer de piel no melanoma en pacientes dermatológicos.

Este trabajo consta de alrededor 8 capítulos diseñados de tal manera que capte el interés de investigadores médicos y permita generar un criterio sobre el uso de esta técnica en el manejo del cáncer de piel no melanoma en su rutina de atención al paciente dermatológico; donde además de las partes introductorias, conclusiones, recomendaciones y trabajos futuros se tiene la parte del soporte teórico y el desarrollo propiamente dicho de la tesis compuesto de la siguiente manera: en el capítulo 2 se resumen temas introductorios sobre: a) cáncer de piel desde el punto de vista de la Biología Molecular (que se considera visión de última tecnología); b) Terapia Fotodinámica que es la analizada en esta tesis, se resume además las bases teóricas de la interacción de la luz con el tejido, introduciendo los coeficientes de absorción y dispersión, parte fundamental de dicha formulación; se menciona también sobre la conformación del fluorosensor BDCF utilizado para adquirir los espectros de fluorescencia en este trabajo.

El capítulo tres trata acerca de la Delimitación del tejido mediante curvas de isoprobabilidad (fase diagnóstico), su adquisición mediante un barrido punto a punto del tejido tumoral tomado por el fluorosensor BDFC basado en un diodo láser de 400nm y

análisis de datos y se elaboran los protocolos clínicos, físicos y técnicos necesarios para su aplicación *in vivo* .

El Capítulo cuatro aplica la teoría de Transporte para explicar la distribución de la luz en el tejido y mediante la teoría de la difusión y tomando en cuenta las condiciones físicas del láser usado, se encuentra la ecuación que describe la fluencia en un punto  $P(\rho,z)$  en el tejido irradiado con una y varias fuentes dispuestas de diferentes formas que permitan obtener mayor irradiación en el tejido canceroso.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

Según el Registro Nacional de Tumores, que recoge datos sobre el cáncer en el Ecuador, en su publicación “Epidemiología del cáncer en Quito y otras regiones del Ecuador”, para el caso de cáncer de piel en la estadística “Tumores malignos según localización y fuentes de información del 2002 al 2004 “ tenemos que en el Hospital CAM y el Dermatológico “Gonzalo González” que son los lugares que se beneficiaran de nuestra investigación, tienen alta incidencia de casos reportados( en primer lugar encontramos a SOLCA y otros hospitales privados).Además, este numero de casos(2142), es superior a los casos de cáncer de mama(1141) , cerviz uterino (1183), glándula prostática(1148); que son los de mayor incidencia no solo en Ecuador sino a nivel mundial ; por supuesto que este tipo de tumores malignos también tienen mayor índice de mortalidad .

Profundicemos cifras en el estudio de tumores malignos de piel; según el mencionado Registro, tenemos los siguientes valores en “Tumores malignos según localización topográfica, diagnóstico histológico y sexo todos los casos del 2002 al 2004” ,la actual situación del Ecuador en cuanto a tumores malignos de piel, esto es, las Neoplasia Basocelulares ocupa el primer lugar con 1593 casos, es decir 74.4% seguido por Neoplasia Epidermoide o espinocelular con 489 casos es decir un 22.8% de un total de 2142 casos; los demás diagnósticos tienen bajos números de casos pero no dejan de ser importantes, notamos que el melanoma de piel tiene 223 casos, un valor relativamente alto; de aquí la importancia del estudio de nuevas técnicas y procedimientos que permitan tanto al médico como al paciente un mejor diagnostico y tratamiento de las lesiones cancerosas y precancerosas.

En la actualidad existen un sinnúmero de técnica empleadas para el manejo de cáncer de piel no melanoma superficial donde la cirugía es la mas seleccionada por los dermatólogos cirujanos usado aproximadamente en un 90% de los casos ya que el riesgo de recidivar es relativamente bajo, pero se tiene que los tiempos de recuperación son relativamente largo y en algunos casos como presión alta, edad avanzada de pacientes, es contraindicado; además no tiene tan buen resultado cosmético pudiendo inducir a depresión post cirugía ya que los limites de escisión utilizados están entre 0.3 a

1 cm de piel sana dependiendo de varios parámetros como tipo de tumor, estadio, localización anatómica, etc. Un tipo de cirugía específica es la cirugía de Mohs controlada microscópicamente pero poco usada. Otra técnica empleada es la crioterapia, donde en algunos casos se ha observado una mayor incidencia de recurrencia tumoral pero aun así es la más utilizada en cáncer de piel no melanoma superficial por la facilidad de la técnica. El curetaje y electrodesecación es una técnica eficiente pero regresamos al problema de bajos resultados cosméticos y posibles recurrencias tumorales, la limitación de estas técnicas hacen que los avances tecnológicos en la medicina en especial en el campo de la oncología sean muy explorados con la idea de disminuir estos problemas que traen dichos protocolos tradicionales que se utilizan para diagnóstico y tratamiento de dichas neoplasias

Uno de estos avances es la llamada Terapia fotodinámica TFD en trabajos conjuntos entre físicos y médicos y que en síntesis se basa en el uso de sustancias fotosensibilizantes que al aplicarse sobre el tejido es absorbido en mayor cantidad por las células cancerosas debido a su acelerado metabolismo y activado a través de una fuente de luz específica, producen fluorescencia (utilizada en diagnóstico) y/o reacciones fotoquímicas que inducen a la apoptosis a las células (tratamiento); se ha demostrado a nivel mundial que en enfermedades como carcinomas basocelulares, espinocelulares, queratosis actínica, enfermedad de Bowen, no melanomas malignos de piel en la línea del ojo y la piel periocular, pueden ser tratados con TFD.

En el presente estudio se utiliza un Fluorosensor BDCF para el diagnóstico de cáncer de piel, el cual consiste en un diodo láser de 400nm a una potencia de salida de 1,2 mW que al aplicarse su luz sobre el tejido canceroso (previamente fotosensibilizado con Acido delta aminolevulínico ALA) induce la fluorescencia de ciertos cromóforos principalmente de la Protoporfirina IX PpIX, que debido al acelerado metabolismo del tejido canceroso es absorbido en mayor cantidad por dicho tejido en comparación al sano. El espectro fluorescente de la PpIX muestra un pico máximo en la región de los 635nm pudiendo (al realizarse un escaneo punto a punto de la región neoplásica y sus alrededores) realizarse una delimitación de la región tumoral mediante la definición de una magnitud que indique una probabilidad relativa que existan células tumorales.

Para la fase de tratamiento, se realiza un estudio teórico de la distribución de la luz en el tejido (considerando sus propiedades de absorción y dispersión en una región roja del

espectro electromagnético) para poder realizar una dosimetría correcta de la dosis de luz recibida en cada punto de la superficie o interno del tumor, planificar un tratamiento fraccionado la dosis administrada al paciente; y de este modo generar una fotoexcitación adecuada que provoca un cambio de oxígeno triplete a singlete (con la ayuda de la PpIX) produciendo finalmente la apoptosis celular.

## CAPÍTULO 2

### FUNDAMENTOS TEÓRICOS

#### 2.1 CÁNCER DE PIEL

##### 2.1.1 Piel y sus diferentes capas

Se tiene un sinnúmero de conceptos de piel, el siguiente es un resumen del Libro “Dermatología” de Falabella y colaboradores [1] . La piel es una envoltura que separa el medio interno del ambiental, su función es de vital importancia para la homeostasis del organismo. Además evita la pérdida de fluido hacia el exterior y participa en la síntesis de la vitamina D a partir de sus precursores.

La piel está constituida por tres capas: epidermis, dermis e hipodermis (tejido celular subcutáneo). Dentro de estos 3 estratos encontramos los anexos cutáneos como glándulas sudoríparas, folículo piloso y glándulas sebáceas; además de vasos sanguíneos, nerviosos y linfáticos.

**La epidermis** es un epitelio estratificado constituida por varias capas de células queratinocitos que contiene filamentos de queratina de diferente tamaño, las capas epidérmicas de la profundidad a la superficie son: basal o germinativa, espinosa, granulosa y cornea; se encuentra en renovación constante y se inicia en la capa basal cuyas células columnares se multiplican y se origina la capa espinosa que se estratifica y migra a la superficie, aquí se aplanan y desarrollan granulaciones convirtiéndose en células de la capa cornea. Cada célula germinativa cumple el ciclo de multiplicación celular en aproximadamente 100 horas; el transporte total de la célula desde su origen en la capa germinativa hasta su desprendimiento en la capa cornea es de alrededor 31.5 días.

En la capa basal están las células con mayor actividad mitótica una vez que deja su hábitat su transporte hasta la capa cornea es de 14 días, de este punto hasta ser descamada requiere 14 días adicionales.

La capa espinosa constituye el mayor volumen de la epidermis, se distribuye en hileras entre la capa basal y la granulosa, inicialmente de forma poliédrica y se torna plana a medida que migra a la superficie, posee grandes bandas de filamentos de queratina.

La capa cornea se forma cuando las células procedentes de la capa granulosa pierden su núcleo y todo el contenido celular exceptuando los filamentos de queratina, dicha pérdida constituye un 46% al 86% de su peso seco; se constituye de este modo la estructura que ofrece a la piel la protección mecánica y barrera contra pérdidas de agua y penetración de sustancias solubles del medio ambiente.

**La dermis** constituye la parte más voluminosa de la piel, aporta del 15% al 20% del peso total del cuerpo humano. Constituye 2 regiones: **dermis papilar** a la cual se moldea su entorno, no contiene colágeno maduro; el tejido conectivo con la característica de la dermis papilar que rodea el folículo piloso y vasos sanguíneos se denomina dermis adventicia; la **dermis reticular** compuesta de fibrillas de colágeno de gran calibre entrelazadas con tejido elástico; la dermis esta constituido de 2 elementos: el tejido conectivo que esta compuesto por colágeno, fibras reticulares y tejido elástico, estas sustancia esta embebida entre las fibras mencionadas.

Existe un buen número de células en la dermis en mayor cantidad en la dermis papilar cuya función es la fagocitosis y la presentación de antígeno a las células linfoides, inmunocompetencia, además de microbicidas y tumoricidas produce factores de crecimiento, citocinas y otras moléculas inmunoreguladoras son hematopoyetico e intervine en la coagulación y cicatrización entre otros.

**La Hipodermis** consiste en un cojín amortiguador contra traumas y una barrera térmica, contiene material disponible de alta energía o sea calorías almacenadas en las células de grasa. Encontramos a los folículos pilosos creciendo activamente, las glándulas apocrinas y ecrinas. Contienen un 10% al 30% de agua y menos del 2% de colesterol. Cuando el organismo demanda energía, los triglicéridos son oxidados y convertido en ácidos grasos no esterificados los cuales llega a los tejidos donde se oxidan y se convierte en glicógeno y luego en glucosa que constituye fuente de energía tisular.

### 2.1.2 Biología molecular y cáncer

El cáncer de piel es una enfermedad en la que se encuentran células cancerosas (malignas) en las capas epidérmicas, esta transformación maligna celular[2] es el resultado de la interacción de múltiples factores de riesgo donde de un lado tenemos

factores como la edad, el sexo, la raza y la herencia y al otro lado tenemos los hábitos alimenticios, los hábitos tóxicos, el estilo de vida, el medio ambiente y las infecciones que al interactuar provocan la inducción, promoción y la progresión de la transformación maligna.

Los factores de riesgo inherentes al individuo de padecer cáncer se van a representar en su conjunto en el genoma humano donde cada cáncer conlleva un cambio genético inducido al interactuar con los factores externos, que culmina con la aparición de células, que contienen la información genética adquirida del descontrol del crecimiento, de la capacidad de infiltrar, metastizar y de tener otro patrón de muerte celular, que caracterizan a todos los cánceres; el cáncer por lo tanto es el resultado del daño directo o indirecto al ADN de las células, que se acumula a lo largo del tiempo hasta producirse la transformación maligna que afecta inicialmente a una célula única que es capaz de iniciar la secuencia de transformación neoplásica.

En un organismo humano sano los procesos de multiplicación celular predominan sobre la muerte celular en las primeras etapas del crecimiento, concluida esta etapa los eventos de división celular y muerte entran en equilibrio y el número de células permanece relativamente constante (dependiendo del comportamiento cinético de las subpoblaciones celulares); es decir, se tiene un riguroso control sobre este proceso.

Si estos controles que sobre la división celular se ejerce se dañan, la célula puede comenzar a dividirse sin responder a la demanda orgánica y cuando la descendencia de estas células que se dividen con autonomía heredan la tendencia del crecimiento anárquico se origina un clon celular que formara un tumor que si tiene las características de invadir y metastizar será maligno.

Todas las células tienen genes encargados de la regulación del crecimiento y cada vez que una célula al interactuar con un agente externo sufra daño en su armonía genética, estos genes y sus productos proteicos inducirán una reparación inmediata del daño y si no pueden influir en la reparación enviarán a la célula a la destrucción para evitar la expansión clonar del daño genético, estos son los llamados genes supresores de tumor o antioncogenes, entre los mas estudiados están el p53 (descrito en detalle mas adelante por la importancia que tiene en este estudio), el Rb que ante daños genéticos paraliza el ciclo celular en G1; **KdC** (kinase dependiente de ciclinas, agrega fosfato a una proteína), junto con ciclinas son las mayores llaves de control para el ciclo

celular, causando que la célula se mueva de G1 a S o G2 a M; **FPM** (Factor Promotor de la Maduración) incluye la KdC y ciclinas que desencadenan la progresión del ciclo celular y el **p27** que es una proteína que se une a ciclinas y KdC bloqueando la entrada en fase S.

El gen p53 es denominado el gran guardián del genoma humano, está implicado en el control del ciclo celular y ante cualquier alteración genética paraliza el ciclo celular hasta su restauración o eliminación celular, el gen p53 es una proteína que funciona bloqueando el ciclo celular si el ADN está dañado, está localizado en el cromosoma 17(17p13), las mutaciones adquiridas del P53 constituyen el defecto genético mas frecuentes en tumores[4] ; se ha observado mutaciones de p53 causadas por radiación UV B (290-320nm) han sido detectados en daño del ADN como un evento precoz en el carcinoma epidermoide, desarrollo de queratosis actínicas y epiteloma basocelular[5] , la radiación ultravioleta muta el gen p53 tempranamente en el desarrollo del cáncer de piel, demostrándose su presencia en las queratosis actínicas, que son lesiones precancerosas y usualmente regresionan espontáneamente pero pueden ocasionalmente progresar a cáncer epidermoide o espinocelular. Múltiples queratosis en el mismo paciente tienen diferentes mutaciones de p53.

Las mutaciones de p53 se encuentran mas frecuentes en carcinoma epidermoide infiltrante (90%) y epiteloma basocelular(56%) que en el carcinoma in situ[6], [7] La presencia de mutaciones en p53 también puede ser utilizada en la valoración de márgenes en la extirpación de neoplasias ("márgenes moleculares"), pues la valoración molecular de p53 permite afinar aún más en la predicción de las recurrencias locales del tumor[8] el estudio genético de p53 basado en biología molecular del ADN permite detectar casi todos los tipos de mutaciones, la información morfológica se pierde (excepto cuando se realiza la Técnica de diagnóstico por extracción y análisis del ADN llamado PCR in situ) y la técnica es susceptible de contaminación por células epiteliales benignas, estromales o inflamatorias que se encuentran presentes en la muestra, sobre todo cuando éstas se seleccionan durante el examen macroscópico[9] Si el daño es severo esta proteína puede causar apoptosis (muerte celular).

El primer paso en el proceso de carcinogénesis inducida por la luz solar que es uno de los factores mas predisponentes al cáncer de piel, es la formación de fotoproductos de

ADN por los fotones con frecuencia de alrededor del UVB, los cuales afectan con mayor incidencia las bases pirimidínicas adyacentes, formándose anillos de ciclobutano unidos al ADN. Durante la duplicación de ADN, la formación de los "aductos" lleva a mutaciones en el ensamblaje del nuevo ADN, con cambios en la secuencia de bases nitrogenadas correspondientes, produciéndose dos patrones distintivos de exposición a luz ultravioleta con mutaciones C-T y CC-TT; usualmente estas mutaciones son rápidamente corregidas por los sistemas de reparación del ADN; una de estas mutaciones son las del gen p53

Además de la radiación ultravioleta, hay otros factores involucrados en la etiología del carcinoma epidermoide de piel, como la exposición a hidrocarburos y la infección por Virus de la Papiloma Humana HPV como lo demuestra la mayor incidencia de estos tumores la infección por HPV en enfermos trasplantados con inmuno-supresión, las mutaciones distintivas causadas por radiación ultravioleta han permitido la identificación de los genes críticos para el cáncer de piel.

Otra familia de genes relacionados con el control del ciclo celular la constituye los protooncogenes que controlan la proliferación y diferenciación celular, cuando ocurren mutaciones u otras alteraciones a este nivel el protooncogen pasa a oncogen y estos desencadenan señales mitogénicas que escapan a los controles de regulación normales de la célula y se induce la formación de tumores malignos, estos productos tienen diferentes funciones dentro de la célula, pueden ser miembros de la familia ras (H-ras, K-ras y N-ras) que en el cáncer de piel no melanoma se hallan mutados en un 40%; factores de crecimiento como el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y el PDGF, pueden funcionar como receptores de membrana (EGF-R), además existen receptores intracelulares que responden a las hormonas esteroideas, la célula interpreta la señal (transducción) y envía segundos mensajeros que pueden alterar la transcripción ya sea permitiendo que se expresen nuevos genes o modificando la expresión de los activados.

Los protooncogenes pueden ser activados a oncogenes por mutaciones, por inserciones de genomas virales, translocaciones y amplificaciones, la alteración de los genes supresores y protooncogenes que controlan la proliferación y diferenciación celular han demostrado ser el primer eslabón del proceso de malignización, de igual forma dirigir la terapia actual contra el cáncer hacia el control y reparación de estas alteraciones genéticas constituyen las grandes nuevas metas de este siglo.

## **2.2 TERAPIA FOTODINÁMICA**

La primera vez que se informó del efecto tóxico de la luz y los colorantes fue en 1900 [10], un científico alemán llamado Oscar Raab observó que los paramecios que se exponían a la eosina (un colorante) en una habitación muy iluminada dejaban de moverse (lo cual es un signo de muerte en estos animales), no se volvió a oír hablar de este hecho hasta los años 60, cuando dos médicos de la Clínica Mayo [11] se dieron cuenta de que cuando administraban hematoporfirina a pacientes con cáncer, aparecían puntos de luz fluorescente en los tumores torácicos cuando se iluminaban con luz ultravioleta, Dougherty fue el que desarrolló la forma más fotosensible de los derivados de la hematoporfirina, el llamado porfímero sódico (Photofrin es su nombre comercial).

Hoy, la terapia fotodinámica está siendo utilizada en EEUU, Japón, Canadá, Brasil y en algunos países europeos como Alemania, Francia y Holanda, Italia, España, Suecia, etc. para el tratamiento de algunos tipos de cáncer, sobre todo el bronco-pulmonar y el de esófago, dermatología, ginecología, neurocirugía, otorrinolaringología, entre otros; según la British Association of Dermatologists [12], la terapia fotodinámica tópica (PDT) es eficaz en el tratamiento de ciertos cánceres de la piel del non-melanoma y está bajo evaluación en otras dermatosis.

### **2.2.1 Generalidades de la Terapia Fotodinámica**

Terapia Fotodinámica comprende la activación de reacciones fotoquímicas dadas a través de la interacción entre un agente fotosensibilizante, luz y oxígeno para el tratamiento de enfermedades malignas o benignas [13], la TFD comprende 2 pasos importantes: el primer paso es la administración del sensibilizador pudiendo ser las vías de administración oral, tópica e intravenosa, el segundo paso implica la activación del fotosensibilizante en presencia de oxígeno molecular por medio de luz una longitud de onda específica que incide directamente sobre el tejido.

En el presente estudio se ha escogido como agente fotosensibilizante el Acido delta aminolevulínico ALA que es un precursor de porfirinas en el ciclo del Hemo [14] , es la sustancia mas utilizada en solución al 20% en agua, aceite o crema [15] [16] [17] [18] [19] [20] [21] [23] [22] [11] cuando se aplica de manera exógeno ya que estimula la síntesis del grupo hemo dentro de la célula, produciendo una acumulación de porfirinas endógenas, principalmente de PpIX; este acumulo intramitocondrial de ALA es debida a que la capacidad de la ferroquelatasa es limitada, y a que se consigue sobrepasar el mecanismo de retroalimentación negativa que produce la concentración del grupo hemo sobre la síntesis de ALA.

Los protocolos actuales de Terapia Fotodinámica aunque no consiguen resultados superiores a las terapias convencionales, si ofrecen una serie de ventajas: la aplicación tópica de ALA no produce efectos adversos sistémicos ya que no se detectan niveles significativos en plasma de porfirinas; no es un tratamiento invasivo; se consiguen excelentes resultados cosméticos [23] .

La acción selectiva de la TFD viene condicionada por que el ALA se acumula en mayor cantidad en las células tumorales[10] debido al anormal metabolismo de las protoporfirinas dando gran selectividad a los tejidos neoplásicos [14] que conjuntamente con su bajo PH, produce una mayor actividad de enzimas como la portobilinogeno-deaminasa, responsable de la producción de porfobilinógeno mientras que la actividad de ferroquelatasa es menor [23] [29] ,minimiza daño a estructuras vitales adyacentes; esta especificidad celular, así como el hecho de ser un eficaz agente fotosensibilizante por la su selectividad neoplásica, forman la base del uso de la PpIX sintetizada de forma endógena tras la administración de ALA.

La fuente de luz utilizada en la presente tesis es un láser que irradia los tejidos cargados con PpIX con luz en su espectro de absorción del ALA de 635 nm, y en presencia de oxígeno molecular, se produce la liberación de especies reactivas de oxígeno produce radicales libres, especies de oxígeno singlete resultante (en general se las denomina liberación de especies reactivas de oxígeno ROS [14] [28] ), que causan peroxidación de lípidos, provocando daños directos sobre la membrana celular y la mitocondria, retículo endoplasmático y membrana plasmática, algunos efectos indirectos como la alteración de la normal microvasculatura y la inflamación e inmunización [14] [10] , posibles vasoconstricción vascular de los arteriales del tumor, reducción de

la velocidad de flujo de los eritrocitos en las venas de los alrededores del tejido, éxtasis sanguíneo y trombosis de las venas tumorales acompañado de isquemia y la subsecuente necrosis, la principal causa de muerte celular es la inactivación de los canales de la membrana mitocondrial así como la desorganización de las membranas lisosomiales y plasmáticas [5] [29] del tumor. Pueden ocurrir efectos inmunológicos como la producción de interleukin 1 beta, interleukin 2, necrosis tumoral factor alfa, entre otros. y radicales libres causando la peroxidación de lípidos y escisiones en el DNA. La principal causa de muerte celular tras la TFD es la inactivación de los canales de la membrana mitocondrial, así como la desorganización de las membranas lisosomiales y plasmáticas.

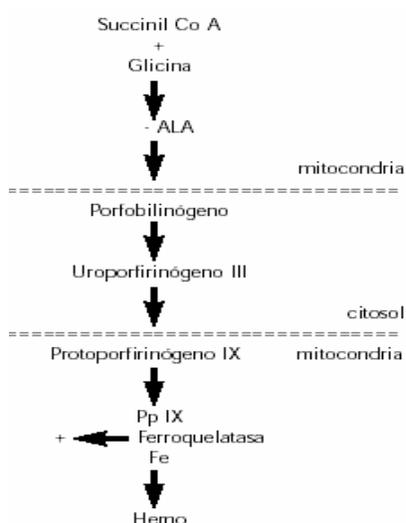


FIG. 1 Ciclo del ALA. El agente fotosensibilizante usado es el ácido  $\delta$ -aminolevulínico ALA el cual se forma a partir de la glicina y el succinil coenzima A en el interior de la mitocondria. La formación del ALA es el primer paso de la vía biosintética del grupo hemo. Al fina de dicha vía se encuentra la protoporfirina IX (PpIX) a la cual se le incorporará el hierro gracias a la acción de la encima ferroquelatasa. Fuente: **Escudero A, Barona INSTITUTO VALENCIANO DE ONCOLOGIA.**

Después de la administración exógeno el ALA, la PpIX es la Principal Porfirina Fotoactivada (PAP), ALA puede ser afectado por cualquier fuente de luz por lo tanto los espectros resultantes, por eso se elije como fuente de luz el láser de diodo de 635nm, cuyas características como alta potencia de salida, máxima absorción para el ALA, monocromaticidad [10] ,coherencia [29] [24] [25] da ventajas en el tratamiento como una penetración máxima de 6mm pudiendo disminuir dependiendo de la localización del tejido, produce máxima irradiancia y mínimo tiempo de exposición [10] entre otros además que su longitud de onda es la misma que la de absorción de la PpIX .

Para un efecto óptimo, el fotosensibilizador debe mostrar que su máxima absorción se encuentra en la longitud de onda de la fuente de excitación utilizada, penetrar en los niveles más profundos y ser distribuido uniformemente, el ALA tiene una absorción máxima a una longitud de onda de 635nm y es hidrofílica. Con esto, la absorción es

buena [24] ya que en tejido canceroso la queratina [26] está dañado y en su alrededor es muy poca por lo que penetra de mejor manera.

Existe una relación directa entre la acumulación de PpIX extracelular y el efecto fototóxico, si aplicamos luz en el momento en que la concentración de PpIX sea máxima en células tumorales y mínima en las sanas, conseguiremos mayor selectividad en la destrucción celular, en las células tumorales se detecta un pico de concentración máxima de PpIX tras 4 a 6 horas [12] de incubación (o procesamiento) del ALA, mientras que en células sanas, el pico máximo se obtiene más tardíamente, tras 24 horas [14] a 48 horas [27], la PpIX desaparece de todas células.

El fotosensibilizador puede ser atacado por los radicales libres y ROS restante produciendo el fenómeno conocido como fotoblanqueador (photobleaching), este efecto puede ser útil en la piel normal donde bajos niveles de la droga son fotoblanqueados en lugar de fotoactivados, mientras dentro del tejido canceroso donde los niveles de la droga son más altos, las reacciones fotoquímicas son predominantes, como resultado tenemos una proporción más alta de tratamiento; ALA no se acumula en el núcleo celular por lo tanto la TFD tiene un bajo potencial para causar daño en el DNA, mutaciones y bajo riesgo carcinogénesis [24].

Se ha observado una eficiente absorción de ALA en la parte proximal del tubo renal después de la filtración glomerular, sin embargo el mecanismo de este transporte transmembrana dentro de las células epiteliales en intestino e hígado es desconocida [18]

Existen estudios [29] [19] donde se ha demostrado que hay una dependencia de la temperatura con los efectos fototóxicos del ALA en células cultivadas donde la curva dosis-respuesta es más alta para más altas temperaturas de incubación de dichas células.

A pesar de la simplicidad relativa de la técnica, la dosimetría exacta en TFD es complicada por variables múltiples en la formulación [10] como son la entrada y duración de la droga, parámetros específicos de la luz [24], entre otros, se habla de un sinnúmero de dosificación para aplicación de Terapia Fotodinámica, varios autores

como, Svanberg y colaboradores [49] prefieren el fraccionamiento de dosis, pues se ha observado gran respuesta con esta técnica.

Los efectos adversos [10] que se pueden presentar al aplicar ALA es que durante la aplicación los pacientes pueden presentar ardor, prurito, enrojecimiento, estas sensaciones se deben a la estimulación directa a los nervios tumorales y daño debido a las reacciones del oxígeno singlete, se ha observado edema local y eritema aproximadamente un día después de la exposición de la luz que puede prevalecer por varios días si la piel es de tipo I o II y la localización de la lesión; se ha observado también ulceraciones y extensa necrosis tumoral por administrar altas dosis y esto puede resultar en lesiones grandes y profundas por lo que es necesario aplicar técnicas dosimétrica para evitar estos problemas, se recomienda además cubrir las lesiones en un periodo de 2 semanas hasta que los efectos sistémicos de la droga hayan desaparecido por completo del cuerpo del paciente administrado, algunos efectos oculares se pueden manifestar como fotofobia y/o problemas oculares, para esto es recomendable evitar una irradiación directa sobre los ojos colocándoles gafas dispersantes de luz o tapándolos con apósitos.

### **2.2.2 Aplicaciones de la Terapia Fotodinámica**

La Terapia Fotodinámica es ampliamente empleado en el tratamiento de varias enfermedades incluyendo el cáncer cuyos resultados siguen siendo observados, existen estudios en fase 3 sobre la aplicación de la Terapia Fotodinámica en cáncer cuyos resultados fueron publicados por Waynant en su publicación "Láser in medicine" [38] , eso indica los excelentes resultados obtenidos en este tema y lo comprometedor se muestran sus respuestas en un futuro cercano.

Como esta tesis se enfoca al cáncer de piel, se dará a continuación una descripción de las principales aplicaciones dermatológicas de la TFD; pero existen otro tipo de aplicaciones como en oftalmología mediante la combinación TDF- Verteporfirina que fue sintetizado en los 80s con la intención de tratamiento de cáncer, sin embargo esta ha sido usado para tratamiento de la degeneración macular desde el año 2000 donde se observa respuesta completa[36] ; el uso de la Terapia Fotodinámica se ha extendido en aplicaciones contra el cáncer de cabeza y cuello, tumores cerebrales, cáncer

pulmonares, enfermedades vasculares, cáncer gastroenterológico, cáncer de cerebro, cáncer orofaríngeo, enfermedades urológicas y ginecológicas[37] .

### 2.2.2.1 Enfermedades Dermatológicas

El tratamiento de Terapia Fotodinámica en psoriasis fue reportado en 1937, recientemente Boehncke y Elshorst- Schmidt[30] trataron 20 paciente con psoriasis crónica administrando BPD-MA intravenosa 8mg/kg de peso y subsecuentemente irradiado por 3 horas con luz de 600 a 700 nm por un total de 5 semanas( $25\text{J}/\text{cm}^2$ ,  $70\text{mW}/\text{cm}^2$ ), donde todos los pacientes exhibieron respuesta parcial las primeras 2 semanas siendo sujeto de actuales investigaciones el aumento de su eficiencia.

La selectiva distribución de la PpXI en condiloma ano genital (virus de la Papiloma Humana principal causa del cáncer de utero) después de la aplicación tópica de ALA sugiere usar terapia Fotodinámica para tratar estas condiciones, 7 pacientes fueron tratadas[31] de las cuales 5 muestran de 75 a 100% de reducción de lesiones las siguientes 16 horas de aplicar láser de argón con  $100\text{J}/\text{cm}^2$  a 75- 150  $\text{mW}/\text{cm}^2$ .

Como se encontró la generación de PpIX después de la administración de ALA no solo en las células epidérmicas , sino también en las unidades pilosebaceas se ha introducido en el tratamiento de acné[32] ,el hirsutismo[33] donde el resultado fue estadísticamente significativo ; además se ha observado respuesta parcial en alopecia areata.

Algunos estudios mediante PDT tópico en el tratamiento de la Queratosis Actínica (condición pre maligna) demuestran completa tasa de respuesta del 45% al 100%, se observa una pobre respuesta en lesiones hiperqueratósicas debido a su ineficiencia en la penetración de ALA en el tejido, comparada con la aplicación de 5- fluoracilo (tratamiento regular), de todos modos un solo tratamiento parece ser efectivo y bien tolerado.

En el carcinoma escamocelular donde la respuesta fue del 67% al 100% con una dosis de  $150\text{J}/\text{cm}^2$  con 2mg/Kg de peso de porfirin sódico, sin embargo varios autores difieren de estos datos, se requiere un estudio mas profundo para obtener resultados acertados

En el carcinoma basocelular, Dougherty[34] fue el primero en usar sistemáticamente PDT con Derivados de porfirinas en 3 lesiones de un paciente de 72 años, Feyh[35] reportó control histológico con muestras de biopsias obtenidas 2 meses después del tratamiento de 57 lesiones, 51 mostraron completa respuesta. Subsecuentes estudios con ALA reporta una tasa de curación del 79% al 100% para tratamiento superficial.

### 2.3 INTERACCIÓN DE LA LUZ CON EL TEJIDO

Durante recientes años, las técnicas ópticas especialmente con láser ha encontrado gran aplicación en el campo de la medicina, donde se cubre un amplio rango de técnicas de terapia y diagnósticos, dichas aplicaciones incluyen endoscopia de cáncer para diagnóstico utilizando fluorescencia, monitoreo del sistema circulatorio incluyendo arterias coronarias y transiluminación de tejido para mamografía óptica. Varios factores contribuyen a incrementar el interés en el diagnóstico de tejido por láser[38] para el monitoreo óptico no invasivo tenemos:

- ❖ Empleo de radiación no ionizante
- ❖ Representación de datos en tiempo real
- ❖ Empleo de puntos de monitoreo o captación de imagen
- ❖ Posibilidad de integrar el diagnóstico por láser con la terapia

El diagnóstico óptico con propósito medico se basa en la interacción de la luz con el tejido, dicha interacción puede ser de naturaleza resonante y no resonante dividiéndose de la siguiente forma:

#### Resonante

- ❖ Absorción molecular de láser
- ❖ Muerte celular inducida por láser
- ❖ Fotoquímica inducida por láser
- ❖ Fluorescencia inducida por láser

#### No resonante

- ❖ Dispersión elástica
- ❖ Dispersión Raman

Son parte del diagnostico óptico las llamada biopsias ópticas que comprenden varias técnicas espectroscópicas como Fluorescencia Inducida por Láser LIF, Raman y transmisión o reflexión en la región de la longitud de onda visible, infrarrojo o cercano al

infrarrojo; donde la espectroscopia de Raman que tiene alta especificidad que la fluorescencia inducida pero baja sensibilidad debida a que es unas ordenes de magnitud mas débil por la naturaleza de su dispersión , la espectroscopia Infrarroja tiene una alta absorción de agua y puestos de transmisión en la fibra, dicha técnica es usada en comparaciones con bien establecidas modalidades de diagnóstico tales como radiografía de rayos X, Imagen de Resonancia Magnética Nuclear, ultrasonido y tomografía de emisión de positrones.

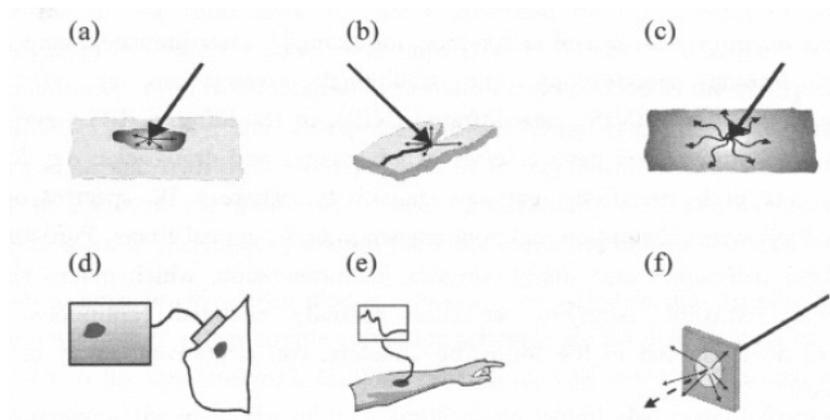


FIG.2 Aplicación óptica en medicina: a) Terapia Fotodinámica, b) cirugía láser, c) termoterapia, d) tomografía óptica, e) biopsia óptica, f) espectroscopia difusiva in vitro. **Fuente: Waynant R., Láser in Medicine**

### 2.3.1 Absorción Molecular por láser

Cuando el tejido es irradiado por láser, una pequeña fracción de luz es reflejada pero la mayoría es penetrada dentro del tejido donde es también absorbida y dispersada por las moléculas; en ciertas longitudes de onda la absorción es fuertemente dominante sobre la dispersión, se caracteriza por una fuerte absorción y poco profundidad de penetración.

### 2.3.2 Calor inducido por láser

El calor inducido por láser ocurre a través de la conversión de la energía electromagnética en energía térmica, este proceso fotoquímico toma lugar cuando biomoléculas han absorbido cuantos de luz llegando a un estado de excitación y retornando al nivel mas bajo no radiactivo, transfiriendo esta energía al tejido; en estas condiciones la selección de la longitud de onda y el tipo de tejido determinan la penetración de la luz, el calentamiento conduce a la coagulación de proteínas (60°C), los

fluidos del cuerpo empiezan a hervir (100°C) y el tejido se carboniza (200°C); este proceso puede ser usado para hemostasis y cirugías; esta es la mayor aplicación del láser en medicina teniendo mucho mas impacto en oftalmología, dermatología y cirugía general.

El láser de dióxido de carbono (10.6µm) tiene baja penetración en tejido debido a la absorción del agua como lo tiene el láser de argón (488, 515 nm) debido a la hemoglobina, la máxima penetración ocurre con el láser Nd:YAG (1.06µm) el cual induce zonas de coagulación alrededor de los cortes quirúrgicos. Para longitudes de onda ultravioleta, la profundidad de penetración de la luz de láser es de 1 a 100µm, tal radiación puede ser usada para inducir fluorescencia en biomoléculas, sin embargo la alta fluencia incidente de tal radiación en pulsos cortos induce ablación del tejido, la ablación por láser se aplica en la corrección de miopía.

### **2.3.3 Daño fotoquímico inducido por láser**

Las moléculas excitadas óptimamente pueden liberar el exceso de energía en forma de calor, transfiriendo su energía a otras moléculas, así inducen reacciones químicas de interés terapéutico, el tratamiento óptico de psoriasis, Terapia Fotodinámica TDF de infantes nacidos con exceso de bilirrubina son ejemplos que se aplican en este caso, en esta aplicación destacamos al a PDT mediante el uso de agentes fotosensibilizantes como un ejemplo de interés en este contexto, donde el agente utilizado es el derivado de la hematoporfirina (HPD) con su nombre comercial Acido delta Aminolevulínico ALA para causar daño fotoquímico en el tejido.

### **2.3.4 Fluorescencia inducida por láser**

Las moléculas excitadas mediante láser pueden regresar a su estado básico emitiendo luz de fluorescencia, este fenómeno ocurre siempre para las mas largas longitudes de onda (cambios de stokes) para biomoléculas grandes, la fluorescencia normalmente exhibe una buena distribución de intensidad como función de la longitud de onda, reflejando la distribución de subniveles en el nivel electrónico básico sin embargo escogiendo la longitud de onda apropiada y exacta se puede utilizarla para analizar la distribución de luz fluorescente para obtener información de las moléculas del tejido. Usando excitaciones de pulso corto es posible la medición de tiempos de decaimiento para la luz fluorescente, algunos cromóforos pueden contribuir a las señales del tejido:

moléculas endógenas como NADH, NAD<sup>+</sup>, colágeno y elastina dando subidas llamadas autofluorescentes.

Un fotón puede ser absorbido por una molécula si esta energía corresponde a la diferencia entre los niveles de energía de los estados electrónicos de la molécula, como mencionamos, la absorción depende fuertemente de la longitud de onda; los componentes del tejido que absorben luz son llamados cromóforos, el más importante cromóforo en la región visible y cercana al infrarrojo es la hemoglobina y el agua, la absorción de luz por la sangre depende de la oxigenación, la oxihemoglobina tiene picos de absorción en las regiones de 418, 542 y 577 nm, mientras que la desoxihemoglobina tiene un pico alrededor del 750nm. El agua la cual representa a gran cantidad de tejidos es fuertemente absorbente en 200 y 1300nm; otro importante cromóforo es la melanina pequeños pigmentos granulares en la piel, ojos y pelo y se observa un decrecimiento de absorción mientras se incrementa la longitud de onda.

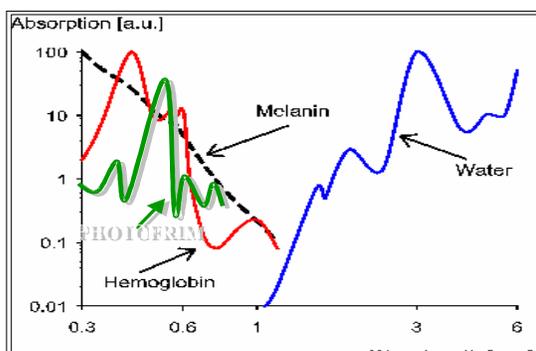


FIG 3. Absorción de varios fluoróforos . Melanina, la hemoglobina el Photofrim que es el nombre comercial del ALA y el agua, en función de la longitud de onda. Se nota que entre los 600 y 1000 nm se tiene la ventana óptica donde se observa un pico de absorción de la hemoglobina; alrededor del 400nm hay una menor penetración de luz pero mayor absorción. **FUENTE: Palsson, S. Physics Department of physics 2000**

Después de la absorción, la energía puede ser liberada por emisión de luz (fluorescencia y fosforescencia) o las moléculas pueden ser transferidas hacia el nivel básico por medios no radiactivos, la energía absorbida por la molécula puede generar calor el cual puede ser usado como una modalidad de tratamiento en ella misma[39] , entre 41 y 47°C el tejido maligno es levemente más sensible al calor que a la muerte celular y este puede ser usado para tratamiento selectivo, a los 60°C , las proteínas son coaguladas, para todo estos métodos, un control feed-back de la temperatura del tejido para monitoreo de tratamiento es crucial, desde el enfriamiento de la perfusión sanguínea puede variar sustancialmente.

El parámetro físico usado para describir la absorción es el coeficiente de absorción  $\mu_a$  el cual se define como la probabilidad de absorción por unidad de longitud y está dado en centímetros (cm).

Consideramos que una onda electromagnética se propaga en un medio continuo en la dirección del vector de poynting, la irradiancia  $I_z$  se atenúa exponencialmente en función de la distancia recorrida de acuerdo a la ecuación de Beer Lamber[40] :

$$I_z = I_0 \exp(-\mu_a z) \quad (1)$$

Donde:  $z$  es la dirección de propagación de la onda electromagnética,

$\mu_a$  el coeficiente de absorción

$I_0$  es la irradiancia a la distancia  $z=0$

El coeficiente de absorción esta dado por:

$$\mu_a = \frac{4\pi\kappa}{\lambda_0} \quad (2)$$

Donde:  $\lambda_0$  longitud de onda

$\kappa$  parte imaginaria del índice de refracción complejo del medio.

Esta definición es recopilada desde el punto de vista macroscópico; sin embargo, considerando desde el punto de vista microscópico, la absorción toma lugar la aproximación en un tejido grueso al cual incide un numero de partículas incidentes  $I_0$ , por unidad de tiempo y se obtiene a la salida partículas resultantes  $I_d$  como observamos en el grafico siguientes:

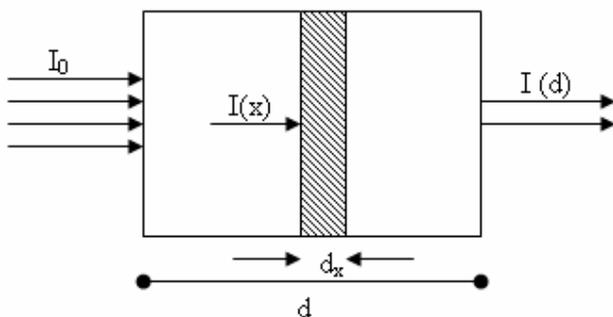


FIG.4 Aproximación para un tejido (blanco) grueso. Interacción de la radiación incidente de ancho  $d$

Se tiene para este caso que el coeficiente de atenuación lineal esta dado por

$$\mu_a = n\sigma \quad (3)$$

Donde:  $n$  es el número de átomos o moléculas con las que se produce el proceso por unidad de volumen y esta dado por:

$\sigma$  es la sección eficaz de absorción(probabilidad de interacción por fluencia de partícula incidente).

El numero de moléculas con las que se produce el proceso esta dado por

$$n = \frac{Na \rho C}{PA} \quad (4)$$

Donde  $N_a$  es el número atómico de la molécula

$\rho$  Densidad de partículas

$C$  concentración isotrópica

$PA$  peso atómico de la molécula

El valor para  $\mu_a$  en las condiciones ópticas del tejido usado es  $0.7\text{cm}^{-1}$

### 2.3.5 Dispersión elástica

La dispersión de luz en el tejido es importante para el rojo y el infrarrojo cercano, el cual no es fuertemente absorbido por el material, la dispersión es normalmente elástica es decir no hay cambio de longitud de onda cuando la luz es dispersada por partículas con una medida mucho menor que la longitud de onda de la luz incidente; si la absorción es baja algunos procesos dispersivos pueden ocurrir en mayor o menor grado antes que el fotón sea absorbido o escape del tejido; hay dos tipos de dispersión elástica: Rayleigh y Mie, si la medida de las dispersiones son considerablemente más larga que la longitud de onda, tendremos dispersión de Mie, esta teoría se refiere a partículas esféricas, la probabilidad de dispersión Mie es una muy compleja función de la longitud de onda, de los índices de refracción del medio que le rodea y en general de la intensidad de la dispersión se incrementa con más cortas longitudes de onda y tienen una dependencia aproximada de  $\lambda^{-2}$ . La dispersión de Rayleigh ocurre cuando la luz no resonante interactúa con más pequeños dispersores que la longitud de onda, la variación del campo eléctrico crea polarización en moléculas las cuales actúan como antenas y reemiten la luz en una nueva dirección, la probabilidad para obtener dispersión Rayleigh se incrementa con las más cortas longitudes de onda y tiene una dependencia de  $\lambda^{-4}$ .

La dispersión es descrita por la probabilidad de dispersión por unidad de longitud  $\mu_s$ , dado en centímetros  $\text{cm}^{-1}$ ; la suerte de un fotón individual es determinada por un complejo intercambio entre absorción y dispersión, para ciertas geometrías este proceso puede describirse resolviendo la ecuación de difusión, especificando valores para los coeficientes de absorción y dispersión,  $\mu_a$  y  $\mu_s$  respectivamente, la suma de estos dos coeficientes nos da el coeficiente de atenuación total

$$\mu_t = \mu_a + \mu_s \quad (5)$$

El cual describe la probabilidad de interacción luz-tejido por unidad de camino recorrido de un fotón migrante.

De especial interés es el estudio de la transiluminación a través de muestras gruesas de tejidos (pocos cm), algunos de los fotones han sido dispersados varias veces resultando en efecto longitudes de caminos de unos centímetros, esto puede ser simulado mediante métodos montecarlo donde la trayectoria del fotón es seguido por un gran numero de eventos Build up en una distribución de intensidad.

La presencia de dispersión hace que las mediciones de absorción sean mucho mas elaboradas, el camino recorrido en el tejido que ha sido atravesado no puede ser cuantizado en las mediciones estacionarias, haciendo un directo uso de la relación de absorción de Beer Lambert, el monitoreo de Tiempo de Resolución de pico segundos de pulso obtiene buena definición en las mediciones, los cuales son de gran interés para mediciones de oxigenación de tejido usando espectros de absorción en el rojo e infrarrojo cercano. Este tipo de dispersión es estudiado en esta tesis.

Análogo a la absorción, Se tiene para este caso que el coeficiente de dispersión esta dado por

$$\mu_s = n_s \sigma_s \quad (6)$$

Donde:  $n_s$  es el número de átomos o moléculas con las que se produce el proceso por unidad de volumen y esta dado por:

$\sigma_s$  es la sección eficaz de dispersión (probabilidad de interacción por fluencia de partícula incidente).

El numero de moléculas con las que se produce el proceso esta dado por

$$n_s = \frac{Na \rho C}{PA} \quad (7)$$

Donde Na es el número atómico de la molécula

$\rho$  Densidad de partículas

C concentración isotrópica

PA peso atómico de la molécula

### 2.3.5.1 Dispersión anisotrópica

La dispersión en medios turbios es generalmente no isotrópico y fuertemente transmitido, el ángulo de dispersión de un solo evento de dispersión tiene una distribución de probabilidad llamado función de fase, donde generalmente se denota

$$p(\Omega_s \rightarrow \Omega_s') \quad (8)$$

Descrita por la probabilidad que la luz viaje en la dirección  $\Omega_s'$  y en un solo evento podría dispersarse en la dirección  $\Omega_s$ .

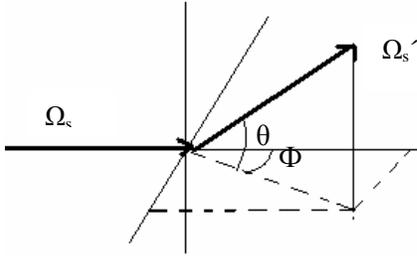


FIG. 5 Definición de parámetros geométricos para la teoría de transporte. Las direcciones están dados por los vectores  $\Omega_s$  y  $\Omega_s'$ . El ángulo de deflexión de zenit es  $\theta$  es gobernado por la función de fase, mientras la dispersión es asumida a ser Isotrópica alrededor del ángulo azimutal  $\Phi$

Para varios tipos de tejidos, la dispersión es simétrica alrededor de la dirección incidente, así la función de fase puede ser expresado como una función del ángulo entre el incidente y el dispersado denotado  $\theta$ , esta presunción puede ser no válida para estructuras de tejido con largo alineamiento celular. Cuando se describe el transporte de luz en tejido con varios modelos teóricos, la función de fase es empíricamente escogida. Con tejido óptico la función de fase de Henyey- Greenstein es originalmente usada para describir dispersión. Este ha sido demostrado con las mediciones de distribución angular para piel y aorta[41]. La función de fase de Henyey- Greenstein esta expresado como:

$$p(\Omega_s \rightarrow \Omega_s') = p(\cos \theta) = \frac{1}{4\pi} \frac{1 - g^2}{(1 + g^2 - 2 \cos \theta)^{3/2}} \quad (9)$$

Donde: g factor anisotrópico o factor g

El factor g es definido como el coseno del ángulo de dispersión

$$g = \int_{4\pi} \cos \theta \cdot p(\cos \theta) d\Omega_s = \langle \cos(\theta) \rangle \quad (10)$$

Donde g toma valores de -1 a +1 correspondiente a la dispersión total o dispersión transmitida respectivamente. La dispersión isotrópica es representada por  $g=0$ , el tejido mamario toma valores de 0.7 a 0.95 siendo altamente dispersado, la sangre humana, 0.995 y 0.999 [42].

Como la función de fase es una distribución de probabilidad, puede ser normalizada.

$$\int_{4\pi} p(\cos \theta) d\Omega_s = 1 \quad (11)$$

En algunos tipos de mediciones de dispersión se tiene varias combinaciones entre  $\mu_s$  y g esto es encontrado en mediciones de reflectancia difusiva (varios eventos seguidos)

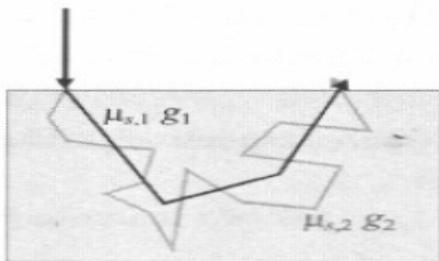


FIG. 6 Efecto en mediciones de difusión reflectante

Donde se tiene que

$$(1 - g_1)\mu_{s,1} = (1 - g_2)\mu_{s,2} \quad (12)$$

En este caso es conveniente caracterizar el medio por el coeficiente de dispersión reducida  $\mu_s'$  la cual combina  $g$  y  $\mu_s$  en un solo parámetro:

$$\mu_s' = (1 - g)\mu_s \quad (13)$$

El inverso de este coeficiente de dispersión reducida es una medida del camino libre entre eventos isotrópicos artificiales en un ambiente múltiplemente dispersivo es decir es la distancia promedio de un fotón que viaja antes que la dispersión pueda ser estimada como Isotrópica.

El valor del coeficiente de atenuación reducida para las propiedades ópticas del tejido usado es  $\mu_s' = 14 \text{ cm}^{-1}$ .

Finalmente el coeficiente lineal de transporte  $\mu_{tr}$  es usado para describir la inversa de la longitud de camino recorrido entre eventos en una fuerte dispersión, y esta dada por:

$$\mu_{tr} = \mu_a + (1 - g)\mu_s = \mu_a + \mu_s' \quad (14)$$

### 2.3.6 Dispersión Raman

La dispersión Raman es inelástica donde se obtiene un fotón con diferente energía dirigido a fotones de alta longitud de onda, puede ser visto como una excitación a un estado virtual (no resonante) y una inmediata transformación desde este estado a un estado mas bajo de diferente energía que el estado inicial, el más bajo estado dividido es debido a la energía vibracional, los resultantes cambios son caracterizados por vibraciones en específicos grupos moleculares. A través de la dispersión de Raman obtenemos más alta especificidad que fluorescencia inducida, pero hay problemas en la sensibilidad porque es algunos ordenes de magnitud mas débil.

En la siguiente figura observamos la dispersión de raman:

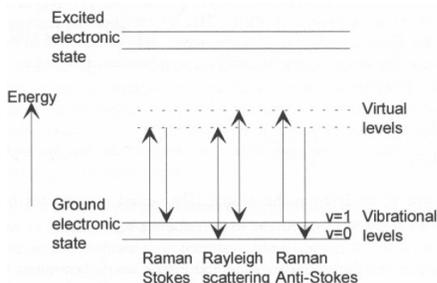


FIG. 7 Dispersión de Raman.  
Diagrama de decaimiento radiactivo

## 2.4 FLUORESCENCIA INDUCIDA POR LÁSER

### 2.4.1 Mecanismo de acción de la Fluorescencia Inducida

La utilización del láser como fuente de excitación está reconocida como una de las técnicas más sensibles [43] de análisis cualitativo y cuantitativo de átomos y moléculas fluorescentes, en condiciones óptimas la técnica ha permitido detectar hasta un solo átomo en fase gaseosa y moléculas individuales en solución.

La sensibilidad de la fluorescencia inducida por láser deriva de la excelente relación señal/ruido que esta técnica exhibe, y es debida principalmente a que la señal es una medida directa de la especie analizada, contrario a lo que se hace en la técnica de absorción, donde la determinación de una especie dada se hace por la medida de pequeñas diferencias en la intensidad de la señal fuente se puede detectar absorbencias muy débiles, en estos casos la sensibilidad depende de la estabilidad de la fuente y de la alta sofisticación de los instrumentos ópticos y electrónicos.

La selectividad [44] de este método es debida al hecho que se observa una señal solo si hay absorción, es decir solo si la longitud de onda coincide con una línea o una banda de absorción del producto y una alta eficiencia fluorescente, es decir, que la molécula se desexcite mediante emisión de radiación.

LIF es también una importante herramienta para el estudio de varios fenómenos foto-físicos, fotoquímicos y biológicos: entre los ejemplos más importantes podemos citar determinación de vidas medias de estados excitados, estructura y dinámica de las proteínas y reacciones de transferencia de fotones en estados excitados (aquí se encuentra incluida TFD)

Para moléculas grandes, aún para excitaciones pequeñas, los espectros de fluorescencia pueden complicarse debido al gran número de estados vibracionales y rotacionales accesibles, la interacción de las moléculas aisladas con la radiación EM depende de los niveles o estados energéticos de la moléculas y la energía de la luz incidente; a su vez, dichos niveles energéticos están asociados a los estados electrónicos, la energía de vibración y de rotación de la moléculas que forman un conjunto discreto de energía; pero debido a esta diversidad de niveles y a la interacción entre moléculas vecinas, los niveles de energía se funden en un continuo, las transiciones electrónicas responsables de la banda espectral obtenida, es asignada a un grupo de átomos llamados cromóforos. Un esquema de niveles energéticos de una molécula como la PpIX se muestra en la figura 8.

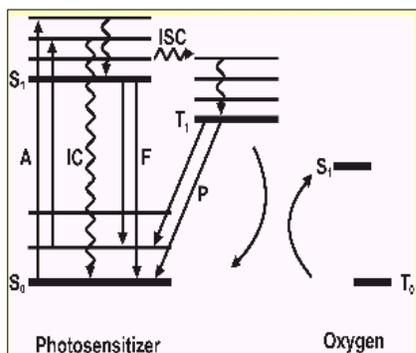


FIG. 8 diagrama de los niveles de energía de un fotosensibilizante con los estados singletes ( $s_0$  y  $s_1$ ) y estado triplete  $t_1$  y oxígeno molecular con su estado base triplete y estado excitado singlete. El fotosensibilizante es excitado por absorción de un fotón (a) y va a cualquier estado excitado singlete (aquí únicamente es graficado  $s_1$ ). La energía de excitación es relajada radiactivamente (flechas no rectas), f: fluorescencia, p: fosforescencia, ic: conversión interna, isc: cruce intersistemas

#### 2.4.2 Importancia de la fluorescencia

- Por análisis de fluorescencia se obtiene información de moléculas que la emiten y de las que les rodean (información del fluoróforo); es decir, también se obtiene información del medio que rodea al fluoróforo en estudio
- La fluorescencia se da como una emisión espontánea de radiación (luminiscencia) entre estados vibracionales de la misma multiplicidad debido a las reglas de selección cuánticas para procesos condicionados por transiciones dipolares y ocurre desde estados térmicamente relajados hacia estados base
- Al aumentar la Energía de Excitación, aumenta el número de canales de decaimiento (de acuerdo al número de niveles accesibles; como la detección se limita a una banda angosta de longitudes de onda, se observara una fracción de decaimiento si se utiliza excitaciones pulsantes, el intervalo temporal de detección debe aumentar para medir una fracción razonable de fotones, esto produce también luz de fondo, pero la

desventaja es la detección de fluorescencia de estados excitados superiores (de alto  $n$ ) es menos fácil de lograr

- La relajación radiactiva que produce la fluorescencia puede terminar en cualquier subnivel de la banda de energía mas bajo, la emisión ocurre en una distribución ancha de longitudes de onda y no en pico agudo, mientras mas corto sea la longitud de onda de excitación (UV), una mayor parte del espectro visible se manifestara en la señal de fluorescencia resultante.
- En soluciones a temperatura ambiental, las moléculas excitadas puede interactuar entre si y el cambio entre niveles rotacionales ocurre rápidamente (ps), cuando la interacción ocurre, la molécula se puede relajar sin emitir radiación a niveles energéticos más bajos de la banda desde la cual ha sido excitado (Conversión Interna CI). Si la banda es mas alta que la primera excitada (S1) se da otra interacción (LEY VAVILOV) de modo que la molécula termina en el nivel mas bajo de la banda S1. El hecho que la fluorescencia se emita desde este nivel hace referencia a la regla de KASHA.
- Otro proceso que se da al excitarse una molécula es la transformación de energía, el exceso de energía se transmite a otra molécula la cual se excita y produce su propia fluorescencia.

## **2.5 FLUOROSENSOR BDCF**

### **2.5.1 Diodo láser azul**

En aplicaciones espectroscopicas se necesitan las siguientes características para una optima adquisición de datos: alta pureza espectral, alta estabilidad de longitud de onda, fácil modulación de longitud de onda y modulación, alta pureza espectral, alta estabilidad de longitud de onda, excelente capacidad de modulación, alta potencia de salida; varias fuentes de luz han sido usados con este fin, pero el diodo láser ha dado resultados optimos en cuanto a resultados.

El diodo láser es en muchos aspectos una fuente de luz única, su forma compacta, bajo consumo de potencia, largo tiempo de vida, alta definición, fácil operación y relativamente bajo costo hace del diodo láser muy conveniente para varios equipos opto electrónicos y utiliza la recombinación de electrones y huecos en la zona vacante de un diodo semiconductor para producir luz en una cavidad adecuada, el primer diodo láser se

construyó con un cristal de GaAs dopado para formar la unión p-n (Fue reemplazado el silicio debido a su banda prohibida directa) siendo más eficientes para producir luz.

La luz del diodo láser se genera aplicando corriente directa de polarización en la juntura p-n esto produce electrones y huecos en la región activa entre los materiales tipo p y tipo n, logrando la inversión de población entre la banda de conducción y de valencia debido a la recombinación de electrones huecos resultando la emisión estimulada.

La longitud de onda del diodo láser está dada por el tamaño de la banda del material semiconductor se utiliza material semiconductor compuesto de  $Ga_xAl_{1-x}As$ , variando las proporciones Ga:Al de la concentración de impurezas se obtiene también diferentes longitudes de onda; a fin de crear una inversión de población y mejorar la posibilidad de recombinación, se requiere altos niveles de impurificación asegurando que en la región de agotamiento los estados llenos de la banda de conducción estén por encima de los estados vacíos de la banda de valencia (capa activa).

El inicio del efecto láser se caracteriza por una corriente de inyección específica (corriente umbral) por debajo del cual la emisión de luz es espontánea e incoherente, este fenómeno debe competir contra los procesos de absorción en la región activa, el láser no emite luz coherente hasta que la corriente exceda la corriente umbral; (Para potencia de 5mW se tiene una corriente umbral de 20 a 50mA; para 200mW, 20 a 200mA); los diodos láser vienen en paquetes con un fotodiodo integrado, el fotodiodo prueba la densidad de salida del diodo láser in situ por la recolección de la emisión residual de la faceta trasera del diodo que es proporcional a la intensidad de salida del rayo para un monitoreo efectivo.

La emisión espontánea se da en los diodos láser de igual manera que en los LEDs; para el caso del LED da lugar a un aumento en el ancho de bandas pero a una señal óptica más débil que esta debajo de las longitudes de onda de funcionamiento del láser, por eso se utiliza el trabajo de fluorescencia el filtro *cut-off* para seleccionar con precisión la longitud de onda de excitación.

### **2.5.2 Conformación Fluorosensor BDCF**

Este diseño está basado en el fluorosensor BCDF descrito por Svanber y colaboradores[45] y construido en el Departamento de Física[46] consta de un Diodo láser de 400nm 5mW de salida y onda continua NICHIA NLHV500 que por medio de su driver IP250-BV THOR LABS, se alimenta con una batería de 9V, el diodo láser es colocado en un tubo junto con una lente colimador GELTECH C230TM-A, la luz de salida es limpiada para emisiones espontáneas de anchos de pico angosto con un filtro de interferencia VI F25-400-4-0.5; la radiación violeta es enfocada por un ensamble de lentes porta fibra OPTICS FOR RESEARCH PAF-SMA-6-NUV-Z de 600um de diámetro, antes de entrar el campo de luz a la fibra, es reflejada en un beam-splitter dicróico CVI, la fluorescencia es inducida en un objeto localizado en contacto con una punta de fibra distal donde tenemos alrededor de 1.2mW de salida láser y un cambiador stokes de luz de fluorescencia es conducida a través de la fibra

Desde el espectrómetro la fibra es acoplada por un porta fibras a un pequeña fibra, el espectrómetro OCEAN OPTICS S2000 a usarse, es equipado con un 100um de abertura donde la luz de láser es elásticamente dispersada y bloqueada por un SCHOTT GG440 de filtro CUT OFF localizado detrás del dicróico. El enrejado (600líneas /mm) dispersa la luz en una región de espectros de alrededor de 330 a 1000nm que es captada por los detectores CCD.

Se tiene una resolución espectral es de alrededor de 5nm siendo adecuadas la investigación realizada en esta tesis.

El diagrama del fluorosensor BDCF se presenta a continuación:

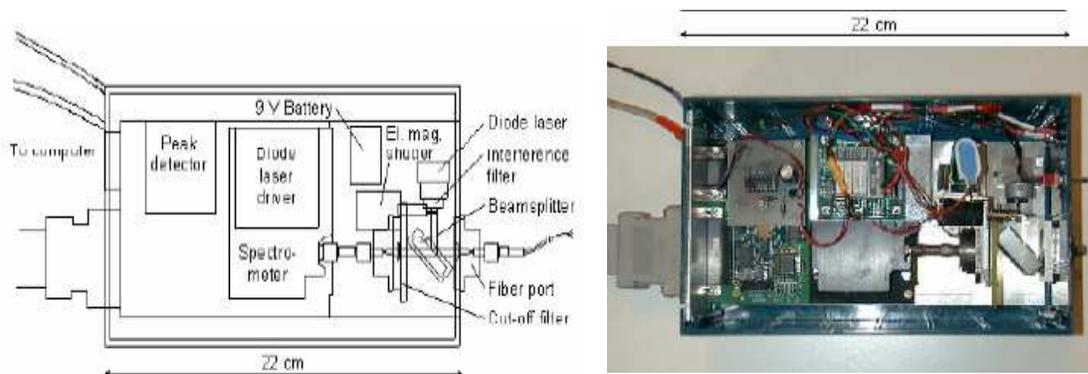


FIG. 9 Montaje fluorosensor . En la figura de la derecha observamos el montaje tanto electrónico como óptico del fluorosensor listo para su funcionamiento. En la figura izquierda, se observa las partes del equipo. FUENTE: Svanber , S. Lund University

## **CAPÍTULO 3**

### **DELIMITACION DE TEJIDO CANCEROSO *IN VIVO* (FASE DIAGNOSTICO)**

En este capítulo obtendremos y analizaremos los resultados dados de la aplicación de la técnica espectroscópica LIF *in vivo* mediante un barrido punto a punto en el tejido canceroso de piel no melanoma para obtener el espectro de fluorescencia característico de cada uno de dichos puntos y mediante una estandarización considerada a partir de la máxima absorción de ALA pro el tejido canceroso debido a su acelerado metabolismo, y mínimo en piel sana; encontrar las curvas de isoprobabilidad de cada tumor que permita al dermatólogo realizar una exéresis tumoral con un criterio mas técnico y sin riesgo de recidivas futuras. Para este propósito, se diseña protocolos tanto clínicos como físicos y técnicos que permitan reproductividad y eficiencia de la técnica empleada.

#### **3.1 TÉCNICA EMPLEADA**

La delimitación del tejido canceroso mediante la técnica espectroscópica Fluorescencia Inducida por láser LIF se lo realizó *in vivo* en pacientes dermatológicos de los Hospitales “Carlos Andrade Marín” y “Gonzalo González” de la ciudad de Quito, que mediante un criterio de inclusión, se seleccionó pacientes que ingresen al presente estudio, estos pacientes debían previa aplicación de LIF, tener un resultado clínico (medico) o histopatológico(biopsia) de carcinoma basocelular o carcinoma espinocelular (ambos cáncer de piel no melanoma).

Con estos antecedentes, se procedió a la sensibilización del tejido canceroso y sus alrededores y la inducción a PpIX que como habíamos visto se acumula en mayor cantidad en células cancerosas debido a su metabolismo acelerado que en células sana; se aplicó Ácido  $\delta$  aminolevulínico al 20% en crema Lubriderm® piel sensible, vía tópica; el ácido utilizado pertenece a 2 casas comerciales: Frontier Scientific Inc. (CAS A167, MASS 167.59), y Porphyrin Systems (AL89001; al 99%) y luego de un periodo de 4 a 6 horas, se aplicó láser de 400nm continuo y se procedió a recolección del espectro de fluorescencia mediante un barrido punto a punto sobre el tejido canceroso y sus alrededores; para esto se utilizó un arreglo tipo matriz cuadrada y uno tipo matriz radial, en un de papel adhesivo con agujeros cada 5mm o 3mm de acuerdo a la necesidad. El uso de dichas matrices (cuadrada y radial) se las realizó con el criterio de que al usar una matriz cuadrada obtenemos más datos del tumor y con la matriz radial menos datos pero es muy didáctica para la presentación de resultados a los médicos dermatólogos

Se acopló la parte distal de la fibra óptica para aplicar y obtener la información de los espectros de los fluoróforos estudiados con un tiempo de aplicación de láser de 5 a 10 segundos hasta que se establezca dicho espectro; el área media de barrido es de 6.03 cm<sup>2</sup>; estas matrices son aplicadas y acopladas a la forma del tumor y se mantienen referencias anatómicas como centro del tumor, parte superior, inferior y laterales del tumor y referencia con otros órganos como distancia a los ojos, nariz, boca o más aun, referencia a lunares de nacimiento u otra marca que permita una orientación clara de los resultados a la hora de realizar exéresis utilizando curvas de isoprobabilidad

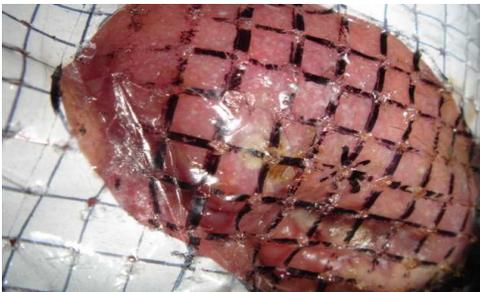


FIG.10 Matriz sobre tejido canceroso. La matriz cuadrada ubicada sobre el tejido canceroso permite un mejor manejo de datos, al ubicar la forma de tumor en la matriz, se lo reemplaza por una pieza plástica que toma perfectamente la forma de dicha lesión y su contorno

### 3.2 SELECCIÓN DE PACIENTES

Se incluyeron 30 pacientes (15 varones 15 mujeres) con 35 lesiones, de las cuales: 22 carcinomas baso-celulares, 2 carcinomas espino-celular, 8 queratosis actínicas, 1 melanoma, 2 barridos de región con antecedentes de cáncer. Baso-celular.

De estas 35 lesiones, 2 estuvieron localizadas en la región cervical, 2 en el dorsal de mano, 4 en abdomen y tórax y 27 en rostro. La edad de los pacientes fue entre 42 y 95 años (edad media: 74 años), la mayoría residentes en Quito, donde el 50% son de raza mestiza seguidos de un 37% de raza blanca y un 13 % raza indígena. Con un 40% de pacientes de instrucción secundaria, un 27% instrucción superior, 23% instrucción primaria y un 10% sin instrucción. Los pacientes con trabajo representan el 60% de la muestra y los que tienen antecedentes familiares de cáncer de cualquier tipo llegan al 47%.

De todos estos datos, el que tiene mayor incidencia para la aparición de cualquiera de las lesiones mencionadas son personas entre 40 y 70 años que trabaja aún, vive en Quito, de raza mestiza y con antecedentes personales (en primer grado) de familiares con cáncer de cualquier tipo.

Quince (15) lesiones fueron foto-documentadas; esto se hizo para obtener mejor referencia de las lesiones en las mediciones de forma y tamaño de las mismas, que es un factor muy importante para un buen diagnóstico. Todos los pacientes llenaron un protocolo individual donde se tiene el diagnóstico clínico de la lesión. En 20 pacientes se tiene el diagnóstico histopatológico de la lesión obtenido mediante biopsia. De 8 pacientes se tiene el resultado del análisis histopatológico del tejido escisionado y realizado un examen especial para observar microscópicamente el alcance del tumor en el tejido sano (margen de seguridad dejado por el médico dermatólogo o cirujano).

Esta investigación fue realizada tanto en el Hospital Carlos Andrade Marín Servicio de Dermatología como en el Hospital Gonzalo González de la ciudad de Quito

Los pacientes siguieron el criterio de inclusión y exclusión señalado en el anexo 3.

### **3.3 PROTOCOLOS EMPLEADOS**

Para comprobar la eficiencia de una técnica se debe estudiar los protocolos a usarse ya que son la base fundamental para tener resultados positivos de estudios clínicos de este tipo. Los protocolos empleados se desarrollan a continuación.

### **3.3.1 Protocolo individual**

La hoja de Protocolo individual ( anexo 1) se la llenó conforme cada paciente y constan datos tales como: información genera, antecedentes personales, antecedentes familiares , información relacionada con los datos obtenidos de fluorescencia y evaluación física del paciente antes, durante y después de aplicado este estudio

### **3.3.2 Protocolo general**

Al aceptar los pacientes formar parte de la investigación, se procedió a firmar una aceptación de términos de investigación al paciente, para evitar futuras complicaciones de tipo legal.

Los pacientes que ingresen a usar detección con láser azul se realizaran previamente la clasificación de las lesiones procedimiento para examinación histopatológica para luego ser afirmado con el método detección láser azul

Al ingresar el equipo al lugar dispuesto para los estudios, se realizará la calibración adecuada del software que se va a emplear para la utilización del láser azul, caso contrario la luz del medioambiente influiría en nuestras mediciones y los picos obtenidos serían falsos. Ya listo para ser utilizado se seguirá el protocolo general donde incluye información como forma de aplicar y proteger ALA para que induzca PpIX y la recolección de espectros (Anexo 2).

### **3.3.3 Protocolo médico dermatólogo**

Aquí observamos los criterios de inclusión y exclusión de pacientes que formarán parte de este estudio (Anexo 3)

### **3.3.4 Protocolo del físico- Médico**

La recolección de los espectros por medio del software y hardware empleados son manejados por el físico siguiendo el siguiente un protocolo donde incluyan las indicaciones que se dieron al paciente, los valores empleados para obtener una buena imagen , la forma de guardar dichos valores para no confundirlos ya que de cada paciente se obtuvo alrededor de 100 muestras del “barrido tumoral” realizado (Anexo 4).

### **3.3.5 Protocolo cirujano dermatólogo**

Los protocolos para exéresis de tumor ya están establecidos, el presente sigue su mismo lineamiento pero con las variaciones que involucran el realizar el estudio que se está llevando a cabo, es decir, el manejo de la pieza quirúrgica ya extraída (Anexo 5).

### **3.3.6 Protocolo histopatológico**

Este procedimiento ya se encuentra establecido pero aquí se incluye el tratamiento de la pieza anatómica para reporte de la elaboración de la curva micro (Anexo 6)

### **3.3.7 Instrucciones al paciente**

Estas son instrucciones puntuales para colocar ALA en el tejido neoplásico de 4 a 6 horas antes la toma de los espectros de fluorescencia (Anexo 7) incluye información sobre cantidad de ALA a colocarse sobre el tejido tumoral y sobre el tejido sano, tiempo, posición del plástico transparente, oscuro y papel aluminio y protección post aplicación de láser.

### **3.3.8 Consentimiento del paciente**

Este es un documento oficial y por lo tanto debe ser tratado como tal, ya que nos exime de futuras complicaciones jurídicas de parte del paciente, además lo pone al tanto del procedimiento a seguirse(Anexo 8).

### **3.3.9 Protocolo Tratamiento**

Las instrucciones para aplicar Terapia Fotodinámica para tratamiento son incluidas en el anexo del protocolo general. (Anexo 1)

### 3.4 ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS DE FLUORESCENCIA INDUCIDA

#### 3.4.1 Modelación de Curvas de Isoprobabilidad alrededor del tejido tumoral

Los espectros de fluorescencia adquiridos de los tejidos irradiados con luz de láser fueron receptados en un espectrómetro de tipo USB 2000[46] .Al irradiar los tejidos con luz azul-violeta (tejido fluoróforo como: colágeno elastina, colesterol) se emite radiación con longitud de onda más larga que la longitud de onda excitante. Al estudiar el espectro de esa autofluorescencia es posible extraer información de varios fluoróforos presentes en los tejidos. Estos tejidos tienen un pico de absorción de 500nm y que varía conforme se aleja del centro del tumor; de igual manera obtenemos un pico máximo en el 635 nm que es de la PpIX .

Se tomó espectros tanto de piel normal como de tejido canceroso y se grabó en el software correspondiente que viene con el mismo espectrómetro (OCEAN OPTICS, INC 2003), además se extrajo el ruido de fondo antes de empezar la aplicación del láser, ya que las habitaciones donde se desarrollaron estos estudios contaban con luz natural y lámparas fluorescente, pudiendo estas alterar las mediciones obtenidas . Se localizaron los picos de absorción y se definió en qué rangos de intensidad se encuentran los mismos (auto-fluorescencia, pico **A**, a 500nm y de PpIX, pico **B**, a 632nm); con esto, al realizar un barrido por toda la matriz, obtendremos espectros cuyos pico máximos (de autofluorescencia y del PpIX) se mantienen en la misma longitud de onda, lo que varia es la intensidad de fluorescencia dependiendo la cercanía al tumor o su ubicación dentro del tumor.

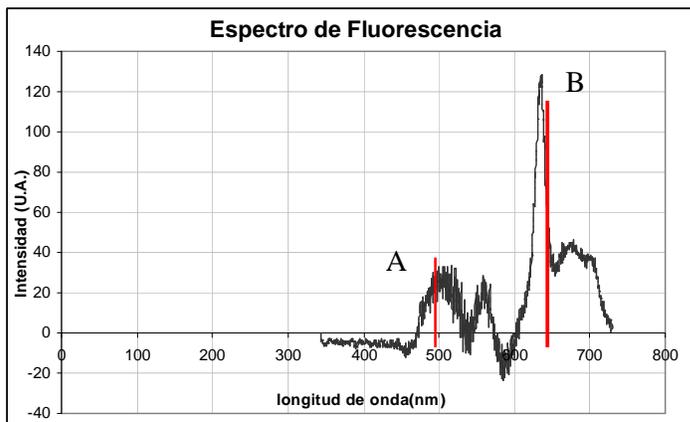


FIG. 11. Espectro Fluorescente. Espectro característico de fluorescencia con un pico pequeño A (de auto-fluorescencia) y otro muy claramente definido B (por la presencia de protoporfirina IX).

Se relacionaron las alturas a y b de los correspondientes picos A y B de espectro autofluorescente y de PpIX respectivamente que son parámetros estables. Se tiene en cuenta que alrededor de los puntos máximos, tanto de la PpIX como de la autofluorescencia de piel el conjunto de valores semejantes, es decir, es una curva suave alrededor del máximo y si se varían los valores de longitud de onda en un intervalo de  $\pm 1\text{nm}$ . La relación a/b no se altera demasiado, es decir, desviaciones pequeñas en el centro de los picos no son críticas. Además se utilizó el siguiente procedimiento de normalización: se tomó el 100% de probabilidad de que existan células tumorales, en el centro del tumor y alrededor del 0,1% de probabilidad en piel sana.

En las siguientes figuras se observa las curvas de isoprobabilidad del tejido canceroso, se grafica el porcentaje de células cancerosas en relación a la distancia del tumor horizontal y vertical alrededor de la región visible se observa las curvas que se acoplan a la forma del tumor. Para una elección correcta de la curva fluorescente a utilizarse, se necesita los valores obtenidos del análisis histopatológicos para definir la curva específica

En las siguientes figuras 12.a,b,c; se observa las curvas de isoprobabilidad de un paciente en particular con carcinoma basocelular de 2,5 por 2,4 cm de diámetro, las curvas son elaboradas por la probabilidad de que existan células cancerosas versus distancia desde el centro del tumor (origen de coordenadas punto en el centro) se observa en la figura 12.c que en el centro del tumor se tiene la máxima probabilidad, a medida que nos alejamos del centro, las curvas se tornan oscuras por lo que se reduce el porcentaje.

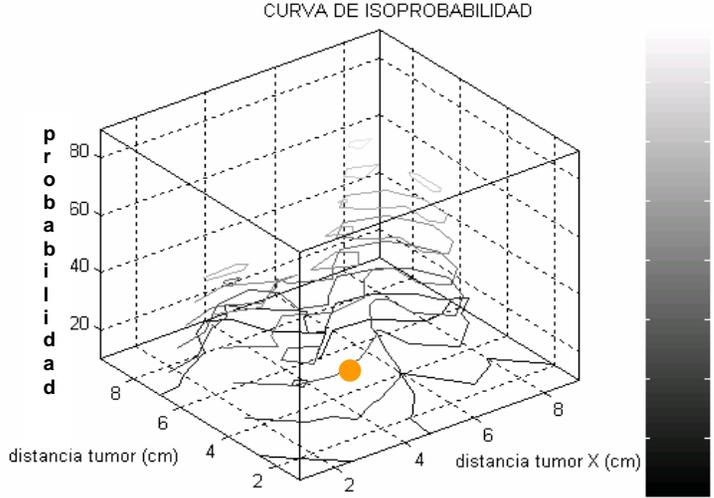


Fig.12.a Curvas de isoprobabilidad generadas en Matlab 6.5 vista longitudinal

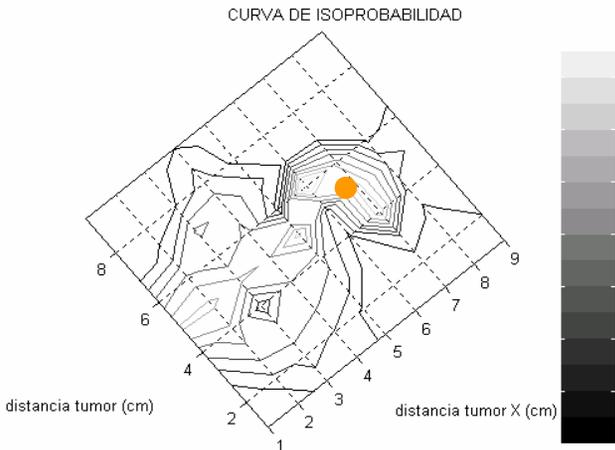


Fig.12.b Curvas de isoprobabilidad generadas en Matlab 6.5 vista transversal

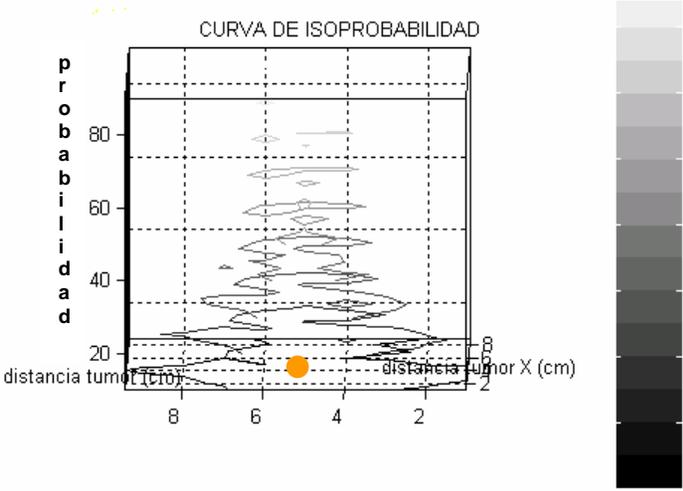


Fig. 12.c Curvas de isoprobabilidad generada en Matlab 6.5 vista frontal

### 3.4.2 Sensibilidad y especificidad de la técnica

De los 35 pacientes analizados con fluorescencia inducida, 2 de ellos eran barridos de pacientes con antecedentes de carcinoma basocelular sin lesión y los datos obtenidos de fluorescencia fueron relativamente iguales (en relación de la intensidad de los picos de absorción de autofluorescencia y PpIX) en todos los puntos de la lesión indicando que no hay indicios de recidiva de la lesión por lo que estos 2 casos son considerados verdaderos negativos, teniendo 33 verdaderos positivos, la sensibilidad de la técnica es:

$$\frac{\text{verdaderos positivos}}{\text{total de muestra}} = \frac{33}{35} = 0.9428$$

Para la especificidad, tenemos en cuenta si se detectan células cancerosas o no, para esto tomamos como referencia la área encerrada en la curva micro (histopatológica) tomada de la revisión histopatológica de la muestra anatómica de la pieza excizada; por lo tanto hacemos una relación entre las áreas de la curva isoprobabilidad tomada de la fluorescencia del tejido y el área de la curva histopatológica; la diferencia en el valor de la relación de áreas se podría deber a la presencia de lunares o anomalías en la piel diferente a cáncer y a posibles errores en la toma de referencia para obtener las curvas histopatológicas y de fluorescencia.

$$\frac{\text{área fluorescencia}}{\text{área histopatológica}} = 0.65$$

Utilizamos el área de la siguiente forma los dos tipos de curvas:  $A = \pi \left( \frac{a+b}{2} \right)^2$  donde  $a$  y  $b$  son el radio máximo y mínimo del tejido necrótico.

Al encontrar el valor medio de las relaciones de áreas de todos los tumores se encontró que la especificidad de la técnica es del 0,65

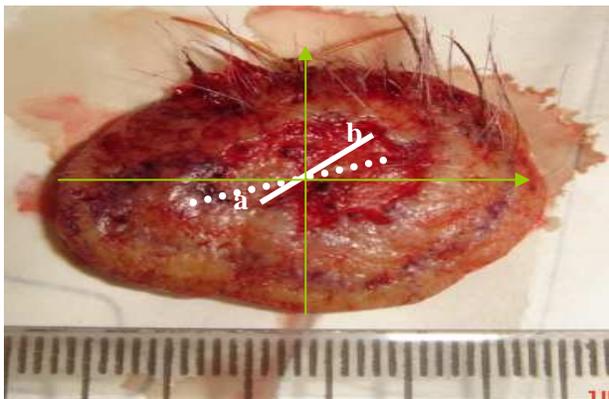


FIG. 13 Medidas del tumor. Se observa el área necrótica en el centro de la pieza anatómica excizada, la línea entrecortada expresa el diámetro mayor  $a$ , la línea continua, el diámetro menor  $b$

## CAPÍTULO 4

### TRATAMIENTO

Como se mencionó en el capítulo 2, la aplicación del ácido delta-amino levulínico en el tejido canceroso con lleva a tener una gran concentración de proto-porfirina IX en el tejido maligno. Una vez delimitada la región infectada mediante fluorescencia, el paso siguiente es el tratamiento. Para ello se irradia las células cancerosas con una luz roja de longitud de onda alrededor de los 630 nm. Tal irradiación produce una reacción fotoquímica que lleva a las moléculas de oxígeno desde su estado base triplete a su estado singlete con la ayuda de la protoporfirina IX. En resumen podemos decir, que la terapia foto-dinámica produce entonces la destrucción selectiva oxígeno-dependiente de los tejidos expuestos a una fuente de luz previamente fotosensibilizados.

Los protocolos de PDT para tratamiento a nivel mundial se resumen a continuación y es recogido mediante una exhaustiva revisión bibliográfica[15] [16] [17] [18] [19] [20] [21] [23] [22] [11]

- Longitud de onda del láser de diodo u otra fuente de luz (generalmente LEDs): alrededor de los 635nm
- ALA al 20% en crema neutra
- Aplicación de ALA de 4 a 6 horas antes de la irradiación del tejido
- Utilización de material necesario sobre el ALA aplicado[49]<sup>49</sup>[26]<sup>26</sup> para evitar fotoactivaciones precoces
- Irradiación con la luz roja durante 20 minutos, con reposo de 2min cada 5 min de exposición.
- Intensidad total de la luz de salida: 100mW/cm<sup>2</sup> (fraccionamientos: 5, 20, 25, 25,25 mW/cm<sup>2</sup>). Si es necesaria una segunda sesión de ALA, en 24 horas[49].
- Dosis de luz de 120J/cm<sup>2</sup>

La irradiación principal de la luz recaerá sobre la superficie tumoral con los valores de dosis especificados anteriormente, sin embargo el tejido interno recibirá una cantidad de luz diferente (de acuerdo con su ubicación por debajo de la superficie). Es por tanto necesario garantizar que todo punto dentro de la demarcación del tumor, tanto superficial como internamente, reciba una cierta cantidad de fotones de esta luz roja para que el ataque a todo el tejido canceroso sea óptimo. La irradiación del tumor con luz roja se

realiza principalmente mediante una fuente continua de luz, proveniente de un LED, con reflector posterior.

Si se procede a demarcar la zona superficial infectada de tal forma que la luz de la lámpara incida sobre dicho tejido, se puede modelizar tal geometría como la de haces paralelos de luz incidiendo perpendicularmente a la superficie infectada y estudiar la distribución de fotones en la zona de interés descrita en la figura de abajo.

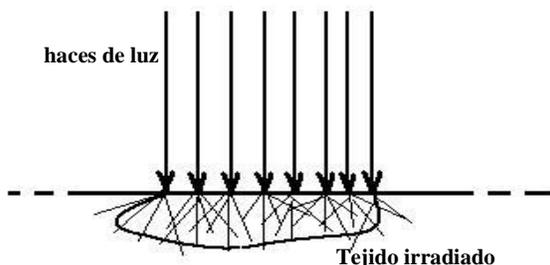


Fig. 14 Modelización de la Incidencia de la luz en el tejido. Conjunto de haces incidiendo sobre el tejido a tratarse

El objetivo de este capítulo es desarrollar un modelo teórico sobre la distribución en profundidad de la luz en un medio homogéneo (tejido tumoral irradiado) basado en la teoría de transporte resuelta en la aproximación de difusión en el caso estacionario

## 4.1 MODELO DE PROPAGACION DE LA LUZ

Se desarrollara un modelo general de transporte para describir la propagación de la luz en un medio, y se trata de realizar las máximas simplificaciones posibles. Se resuelve en la aproximación de difusión y solución estacionaria para un pulso de luz ultra corta.

### 4.1.1 TEORIA DE TRANSPORTE

La teoría del transporte se aplica en varios campos de la física tales como: difusión de neutrones, transferencia de calor radiativa, teoría de plasmas, teoría de propagación de sonidos y propagación de la luz en medios turbios. La idea fundamental de la teoría de transporte es describir un balance de energía ingresada, absorbida y emitida dentro de un elemento de volumen infinitesimal del medio. Esto es matemáticamente descrito por la ecuación diferencial de transporte la cual es equivalente a la ecuación de Boltzmann para la teoría cinética de gases.

Si se define  $L(\vec{r}, \Omega_s, t)$  como la radiancia de luz en un volumen infinitesimal  $dV$  en la posición  $\vec{r}$  propagándose en dirección  $\Omega_s$  al tiempo  $t$ . [ $Wm^{-2}sr^{-1}$ ]. La ecuación de transporte será entonces:

$$v \frac{\partial L(\vec{r}, \Omega_s, t)}{\partial t} = -v \Omega_s \cdot \nabla L(\vec{r}, \vec{s}, t) - v \mu_{Tr} L(\vec{r}, \Omega_s, t) + v \mu_s(\vec{r}) \int_{4\pi} p(\Omega_s', \Omega_s) L(\vec{r}, \Omega_s', t) d\Omega_s' + q(\vec{r}, \Omega_s, t) \quad (15)$$

Siendo  $v$  la velocidad de las partículas involucradas y donde el término de la parte izquierda de la ecuación muestra la variación temporal de dicha radiancia como consecuencia de los siguientes procesos descritos gráfica y analíticamente a continuación:

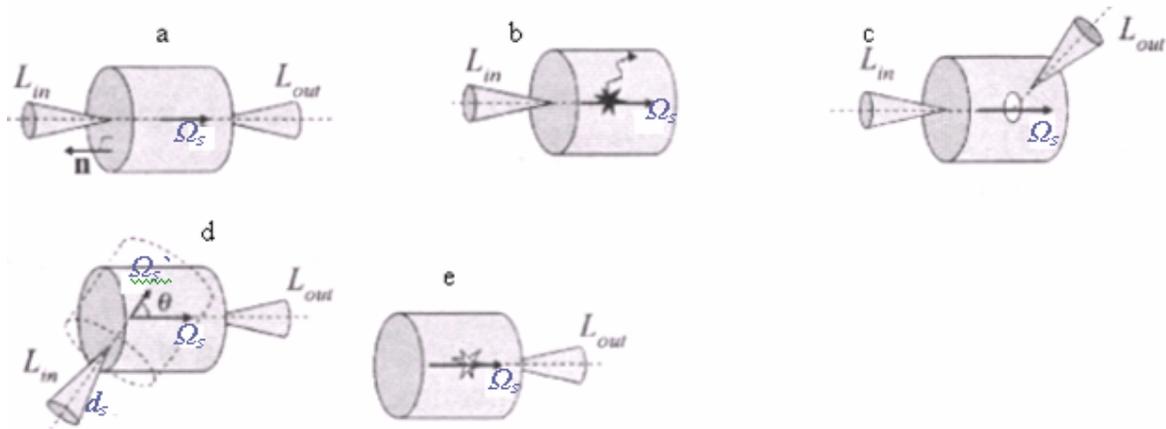


FIG 15. Esquema de los componentes térmicos en la ecuación de transporte a) pérdida a través de los bordes, b) pérdida debido a absorción, c) pérdida debido a dispersión, d) ganancia desde la luz dispersada en la dirección en cuestión, e) ganancia debida a fuentes en el volumen  $V$

Para el gráfico a) donde se tiene pérdidas a través del contorno

$$v d\Omega_s dt \oint_S N(\vec{r}, \Omega_s, t) \Omega_s \cdot \vec{n} d\Omega_s = v d\Omega_s dt \int_V \Omega_s \cdot \nabla N(\vec{r}, \Omega_s, t) dV \quad (16)$$

Para el gráfico b), donde se tiene pérdidas debidas a absorción

$$v d\Omega_s dt \int_V \bar{\mu}_a(\vec{r}) N(\vec{r}, \Omega_s, t) dV \quad (17)$$

Gráfico c), se tiene pérdidas debido a dispersión

$$v d\Omega_s dt \int_V \bar{\mu}_s(\vec{r}) N(\vec{r}, \Omega_s, t) dV \quad (18)$$

Gráfico d), se tiene ganancias por luz dispersada

$$v d\Omega_s dt \int_V \mu_s(\vec{r}) \int_{4\pi} p(\Omega_s', \Omega_s) N(\vec{r}, \Omega_s', t) dV d\Omega_s' \quad (19)$$

Gráfico e), donde se tiene ganancia debida a fuentes en el volumen  $V$

$$v d\Omega_s dt \int_V q(\vec{r}, \Omega_s, t) dV \quad (20)$$

Como antes,  $v$  es la velocidad con la que viajan los fotones

$p(\Omega, \Omega')$  La función de fase de Henyey- Greenstein

$\mu_a$  y  $\mu_s$  son los coeficientes de absorción y dispersión respectivamente y dependen de la posición  $\vec{r}$ .

$q(\vec{r}, \Omega_s, t)$  es la función fuente en el elemento de volumen  $dV$  en la posición  $\vec{r}$ .

#### 4.1.2 Resolución Ecuación de Transporte mediante desarrollo en esféricas armónicas de las funciones: $L(\vec{r}, \Omega_s, t)$ y $p(\Omega_s, \Omega_s')$

Para encontrar la solución de la ecuación de transporte (15) consideramos las funciones  $L(\vec{r}, \Omega, t)$  y  $p(\Omega, \Omega')$ , involucradas en la ecuación, como una superposición de funciones propias, en este caso de funciones esféricas armónicas.

Así,  $L(\vec{r}, \Omega, t)$  estará dada por:

$$L(\vec{r}, \Omega, t) = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l \sqrt{\frac{2l+1}{4\pi}} L_{lm}(\vec{r}, t) Y_{lm}(\Omega) \quad (21)$$

Al expandir la ecuación (21) con  $l \leq 1$  se toman tan solo 4 factores

$$L(\vec{r}, \Omega, t) = \sqrt{\frac{1}{4\pi}} L_{00}(\vec{r}, t) Y_0(\Omega) + \sqrt{\frac{3}{4\pi}} L_{1m}(\vec{r}, t) Y_{1m}(\Omega) \quad (22)$$

Donde  $m$  en este caso toma los valores: -1, 0, +1

Esta aproximación se les conoce con el nombre de aproximación de difusión aproximación  $P_1$ .

$$L(\vec{r}, \Omega_s, t) = A(\vec{r}, t) + \vec{B}(\vec{r}, t) \Omega_s \quad (23)$$

Donde:  $A(\vec{r}, t)$  es la parte Isotrópica de la solución y es escalar

$\vec{B}(\vec{r}, t)$  Es la parte anisotrópica y de tipo vectorial

La aproximación de Difusión plantea entonces a la irradiancia  $L(\vec{r}, \Omega_s, t)$  como una superposición de la parte Isotrópica  $A(\vec{r}, t)$  y anisotrópica (en menor grado)  $\vec{B}(\vec{r}, t) \cdot \Omega_s$ , representado gráficamente de la siguiente manera:

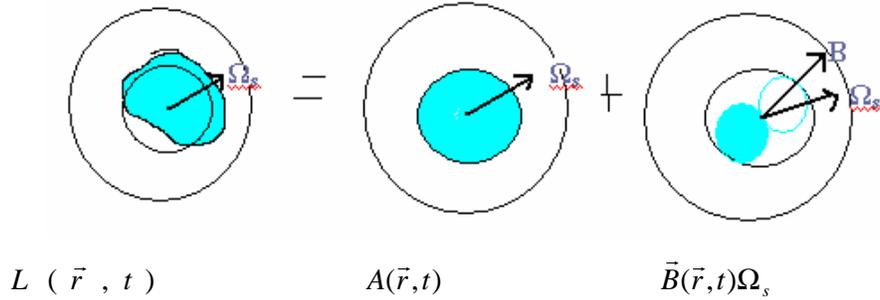


FIG. 16 Ilustración de la aproximación de la teoría de difusión para la radiancia  $L$  como una superposición de una mayor parte Isotrópica  $A$  y un menor  $\vec{B}\cdot\Omega_s$

Encontremos entonces los valores para  $A(\vec{r}, t)$  y  $\vec{B}(\vec{r}, t)$ . Comencemos encontrando el valor de  $\vec{B}(\vec{r}, t)$ , utilizando la ecuación (23) y las propiedades de vectores encontradas en el Anexo 10 tenemos:

$$\frac{3}{4\pi} \vec{F}(\vec{r}, \Omega_s, t) = \vec{B}(\vec{r}, t) \quad (24)$$

Siendo  $\vec{F}(\vec{r}, \Omega_s, t)$  el flujo neto expresado en términos de radiancia dado por:

$$\vec{F}(\vec{r}, \Omega_s, t) = \int_{4\pi} L(\vec{r}, \Omega_s, t) \Omega_s d\Omega_s \quad (25)$$

Donde:  $d\Omega_s$  expresa una infinitesimal de ángulo sólido.

Se observa que hay transporte de flujo neto de energía en la dirección  $\vec{B}(\vec{r}, t)$ .

Ahora encontremos  $A(\vec{r}, t)$  utilizando la ecuación (23) tenemos:

$$\frac{1}{4\pi} \phi(\vec{r}, \Omega_s, t) = A(\vec{r}, t) \quad (26)$$

Como la luz incide en un pequeño elemento de volumen a una posición dada desde una dirección arbitraria, es conveniente introducir la tasa de fluencia  $\vec{\Phi}(\vec{r}, \vec{s}, t)$  definido como:

$$\vec{\Phi}(\vec{r}, \Omega_s, t) = \int_{4\pi} \vec{L}(\vec{r}, \Omega_s, t) d\Omega_s \quad (27)$$

Aplicado las ecuaciones (32) y (27) en (23)

$$L(\vec{r}, \Omega_s, t) = \frac{1}{4\pi} \left( \phi(\vec{r}, t) + 3\vec{B}(\vec{r}, t)\Omega_s \right) \quad (28)$$

De la misma forma podemos definir a las posibles fuentes internas  $q(\vec{r}, \Omega_s, t)$  como:

$$q(\vec{r}, \Omega_s, t) = \frac{1}{4\pi} \left( q_0(\vec{r}, t) + 3\vec{q}_1(\vec{r}, t)\Omega_s \right) \quad (29)$$

Apliquemos la ecuación de la Irradiancia encontrada en la ecuación de transporte (15) utilizando la ecuación del factor  $g$  o factor de anisotropía para un medio turbio (10),(11), reagrupando tenemos:

$$\frac{1}{v} \frac{\partial \phi(\vec{r}, \Omega_s, t)}{\partial t} + \frac{3}{v} \frac{\partial (F(\vec{r}, t) \Omega_s)}{\partial t} = 3[-\Omega_s \cdot \nabla - (\mu_a + \mu_s \hat{g})] \vec{F} \cdot \Omega_s + (-\Omega_s \cdot \nabla - \mu_{tr} + \mu_s) \phi - \frac{1}{4\pi v} (q_0(\vec{r}, \Omega_s, t) + 3\vec{q}_1(\vec{r}, \Omega_s, t) \Omega_s) \quad (30)$$

Integrando en el ángulo sólido, multiplicando por la dirección  $\vec{s}$  y utilizando los productos del Anexo 10, tenemos:

$$\frac{1}{v} \frac{\partial (F(\vec{r}, t))}{\partial t} = -(\mu_a + \mu_s \hat{g}) \vec{F} - \frac{1}{3} \nabla \phi - \frac{1}{v} q_0(\vec{r}, \Omega_s, t) \quad (31)$$

Si tenemos una fuente isotrópica  $q_0(\vec{r}, \Omega_s, t) = 0$  la ecuación (31) se define como:

$$\frac{1}{v} \frac{\partial (F(\vec{r}, t))}{\partial t} = -(\mu_a + \mu_s \hat{g}) \vec{F} - \frac{1}{3} \nabla \phi \quad (32)$$

Para el caso estacionario es reconocida como la ley de fick para la difusión desde la teoría de difusión

$$\vec{F} = -D \nabla \phi \quad (33)$$

Que es una relación entre flujo y fluencia.

$$\text{Donde } D = \frac{1}{3(\mu_a + \bar{\mu}_s)}$$

### 4.1.3 Aproximación Estacionaria

Al insertar el flujo vectorial en la ecuación (41) la ecuación de difusión queda como:

$$\frac{1}{v} \frac{\partial (\phi(\vec{r}, t))}{\partial t} + D \nabla^2 \phi - \mu_a \phi = q_0 \quad (34)$$

Esta es la expresión simple para la distribución de la luz en el tejido, es válida si el coeficiente de dispersión reducido es mucho mayor que el de absorción, es decir  $(1-g)\mu_s = \mu_a$ , permitiendo una fluencia de luz difusa, esta restricción se mantiene en la aproximación  $P_1$ .

Considerando una fuente puntual isotrópica de pulso ultra-corto en un medio homogéneo e infinito, es decir,

$$q_0(\vec{r}, t) = \delta(0,0) \quad (35)$$

Se obtiene una solución que es la función de Green de la ecuación de difusión:

$$\phi(r) = Q_s \frac{1}{4\pi D r} e^{-\sqrt{\frac{\mu_a}{D}} r} \quad (36)$$

Donde:  $Q_s$  es la potencia de la luz de excitación

$D$  constante de Difusión

$r$  posición dentro del medio infinito

El resultado (36) esta acorde a lo encontrado por Palsson y Colaboradores[47] . Ellos encuentran que la dosis (usada en esa tesis  $100\text{mW}/\text{cm}^2$ ) es la umbral requerida para causar foto-excitación y producir cambios en el estado del oxígeno, obteniéndose la tasa de fluencia para un radio mínimo de necrosis a partir de la ecuación de difusión independiente del tiempo, donde el coeficiente de atenuación efectivo para medios turbios se expresa de la siguiente forma:

$$\mu_{\text{eff}} = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu_s')} \quad (37)$$

Relacionándolo con el coeficiente de difusión tenemos:

$$D = \frac{\mu_a}{\mu_{\text{eff}}^2} = \frac{1}{3(\mu_a + \mu_s')} \quad (38)$$

Aplicando la ecuación (38) en (36) se obtiene:

$$\phi(r) = Q_s \frac{\mu_{\text{eff}}^2}{4\pi\mu_a r} e^{-\mu_{\text{eff}} r}$$

Considerando los siguientes datos:  $\mu_a = 0.7\text{cm}^{-1}$ ,  $\mu_s' = 14\text{cm}^{-1}$  [46]

Por tanto:  $D = 0.02267\text{cm}$  y  $\mu_{\text{eff}} = 5.56\text{cm}^{-1}$ ,  $z_e = 0.1247\text{cm}$ [46] [48] ,  $z_0 = 0.0714\text{cm}$ [46] :

Se obtiene el siguiente grafico:

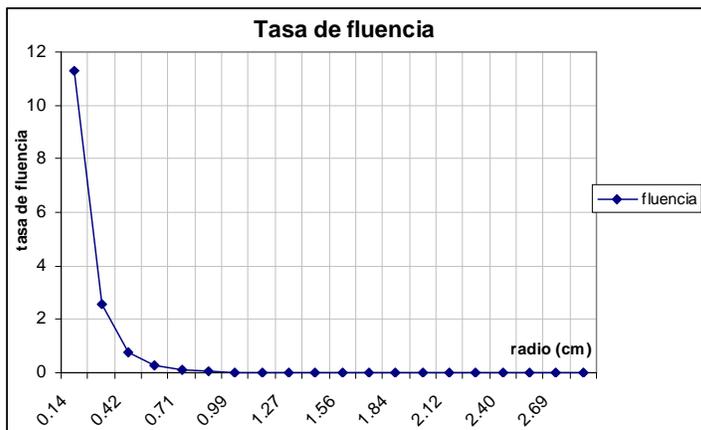


Fig.17 Tasa de fluencia en relación a la distancia utilizando una fuente puntual

Se observa un decaimiento rápido y a una distancia de alrededor de 0,7cm la tasa de fluencia tiende a cero por lo que la luz se absorbe aceleradamente en el tejido. Podemos

decir entonces que para una fuente puntual de luz en el tejido el alcance de la misma es de 3 a 4 veces el inverso de  $\mu_{\text{eff}}$ .

#### 4.1.4 Ecuación estacionaria en medio semi-infinito

El modelo físico para el tratamiento foto-dinámico a considerarse en esta tesis, consiste de un medio semi-infinito dispersivo sobre el cual incide un haz de luz. Esta geometría se reproduce parcialmente para el caso de un medio semi-infinito irradiado por un pulso delgado y ultracorto. Este modelo, a su vez, puede ser considerado equivalente a aquel en el cual se tiene una fuente puntual Isotrópica a una profundidad  $z_0 = [(1-g)\mu_s]^{-1}$  [49] desde la superficie, y que debido a que el aire no reflejará la luz saliente del medio, la condición de frontera natural será que no exista flujo de fotones de regreso al medio en la interfase. Una buena aproximación es considerar que en la superficie la fluencia de fotones es cero

$$\Phi(\rho,0) = 0 \quad (39)$$

Esta condición de contorno se puede satisfacer añadiendo una fuente imagen negativa fuera de la superficie a una distancia  $(z_0+2z_e)$  donde  $z_e$  es la distancia desde la interfase piel aire a aquella extrapolada, donde se ha considerado la tasa de fluencia cero, localizada en la fase aire como se observa en el siguiente gráfico.

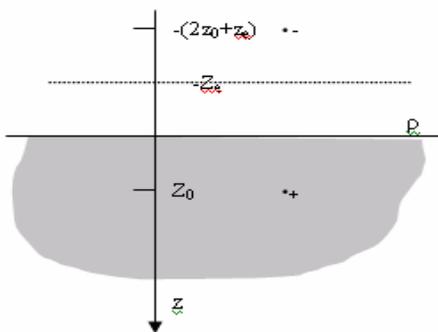


Fig.18 Representación esquemática de una aproximación de las condiciones de borde. Una fuente de dipolo es colocada simétricamente y una extrapolada sobre la cual la fluencia de la luz es cero

Se tiene en cuenta que el modelo desarrollado está restringido en su uso, de hecho no es aplicable en una geometría de muestra delgada (estructuras cercanas a la superficie, pequeñas distancias entre la fuente y el detector o configuraciones geométricas discontinuas de las propiedades de dispersión por la composición misma del tejido piel). Sin embargo, este modelo se lo puede utilizar para estimar la tasa de fluencia en

cualquier punto interior de un medio semi-infinito con propiedades ópticas que satisfacen:

$$\mu_s \gg \mu_a \quad ; \quad r_{s-d} \gg \frac{2a^3}{\mu_s}$$

Estas restricciones son una consecuencia de las consideraciones básicas hechas en las aproximaciones  $P_1$ , donde la irradiancia en un medio dispersivo es comparablemente mayor en su parte isotrópica y menor en la anisotrópica.

Para un haz lineal “*pencil beam*” incidente la aproximación estacionaria en coordenadas cilíndricas de la tasa de fluencia en un punto  $P(\rho, z)$  es:

$$\Phi(\rho, z) = \frac{1}{4\pi D} \left\{ \frac{\exp\left[-\mu_{eff} \left((z - z_0)^2 + \rho^2\right)^{1/2}\right]}{\left((z - z_0)^2 + \rho^2\right)^{1/2}} - \frac{\exp\left[-\mu_{eff} \left((z + z_0 + 2z_e)^2 + \rho^2\right)^{1/2}\right]}{\left((z + z_0 + 2z_e)^2 + \rho^2\right)^{1/2}} \right\} \quad (40)$$

Donde:  $z_0$  es la posición de la fuente de luz

$z_e$  es la ubicación de la frontera extrapolada

$D$  coeficiente de difusión y  $\mu_{eff}$ , coeficiente de atenuación efectiva (los mismos que fueron expresados en el sub-capítulo anterior.

$$\rho = \sqrt{x^2 + y^2} \quad (41)$$

Es la posición en la superficie o en cualquier plano paralelo a la superficie desde el centro del tumor.

Abajo se muestra el gráfico de la tasa de fluencia en relación a la profundidad  $z$  para un haz colimado “*pencil beam*” incidente a la superficie en  $\rho=0$ , o su equivalente de una fuente puntual en  $\rho=0$  y  $z=z_0$ .

En el punto  $x=0$ ,  $y=0$  ( $\rho=0$ ) y  $z=0.08\text{cm}$  se obtiene una tasa de fluencia mayor en alrededor de 7 veces al valor de la tasa en una profundidad referencial  $z=0,14\text{cm}$ . Los valores en la cercanía de la fuente de luz son limitados por las aproximaciones del modelo, por tal motivo no se incluye en varios gráficos expresados a continuación.

A medida que nos alejamos del eje de incidencia del haz, es decir al incrementar  $\rho$ , se observa que tras mantenerse constante por un pequeño intervalo de distancias (hasta  $0.2 - 0.3\text{cm}$ ), la tasa de fluencia comienza a decaer rápidamente hacia cero en

aproximadamente una distancia de 1cm. Para posiciones en profundidad  $z$  anteriores a  $z_0$  se obtiene un *built-up* que tiene su máximo en  $z_0 = 0.07\text{cm}$ . Obviamente cuando  $z$  y  $z_0$  se igualan la ecuación de la tasa de fluencia tiende al infinito por lo que en todos los gráficos siguientes no se incluirán dichos valores. Para una profundidad hasta de alrededor 0.1cm se tiene una tasa de fluencia casi constante en los alrededores al centro  $(0, z_0)$  decayendo rápidamente hasta casi cero a una profundidad de alrededor  $z = 0,7\text{cm}$ . Mientras mas lejos en superficie se encuentre del centro, se observa menos tasa de fluencia y un decaimiento menos acelerado a cero. A casi 1cm en la superficie, ya no se tiene fluencia.

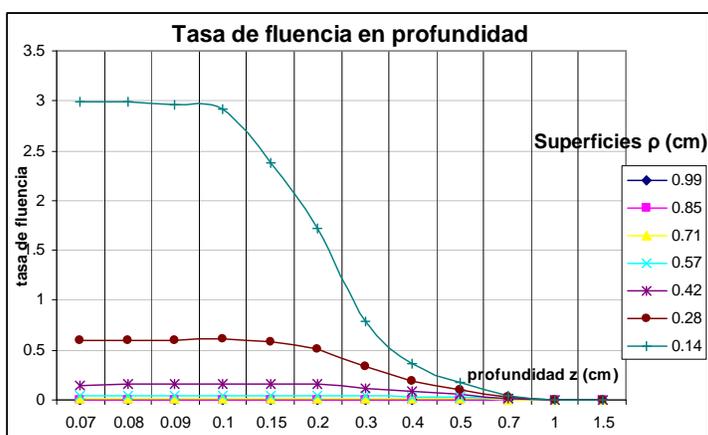


Fig. 19 Distribución en profundidad de la Tasa de fluencia para una fuente puntual.

A continuación se grafica la distribución de la tasa de fluencia en planos perpendiculares al eje de irradiación (como función de  $\rho$ ), aquí se incluyen los valores obtenidos en  $\rho=0$  donde se ratifica su alto valor de tasa de fluencia con relación a sus alrededores. A una distancia en superficie de alrededor de  $\rho=0.14\text{cm}$ , la tasa de fluencia tiende a cero; es decir, al usar una sola fuente la dispersiones laterales en tejido llegan hasta una distancia máxima de 0.14cm, de igual manera que en profundidad (lo que esperábamos tener pues estamos trabajando en el modelo de fuente Isotrópica).

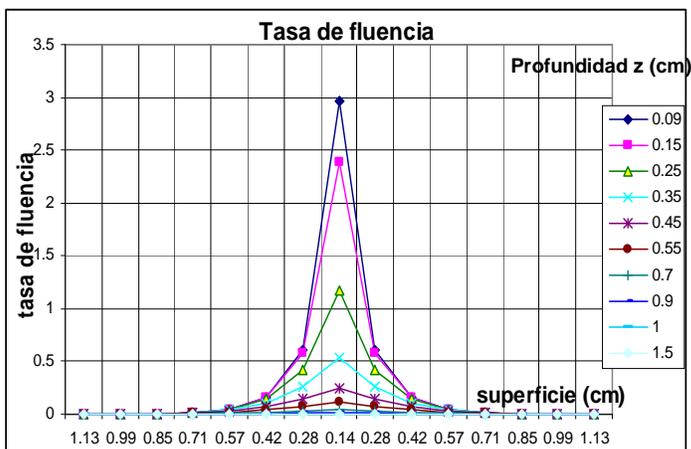


Fig.20 Distribución de la tasa de fluencia para una fuente puntual.

En el siguiente grafico se muestran las curvas de iso-dosis obtenidas de la ecuación de tasa de flujo, los valores en  $\rho=0$  como hemos argumentado no se han graficado. Se ha tomado en cuenta valores de  $z$  desde 0.07 hasta alrededor de 0.6cm; y en superficie, desde  $\rho=0.6$ cm hasta 1,4cm, luego de lo cual la tasa de dosis decae hacia cero.

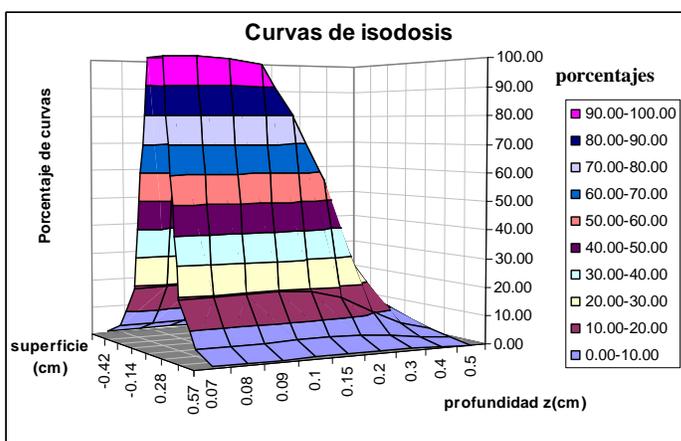


Fig.21 Curvas de isodosis obtenidas al normalizar el 100% de dosis a una profundidad  $z=0.14$ cm y 0,1% a 1.56cm

Los gráficos hasta ahora mostrados, obedecen a la ecuación de tasa de flujo para una fuente puntual colocada en  $\rho=0$ cm y  $z= z_0= 0.07$ cm. Si se quiere obtener la distribución de la luz en cualquier punto interior del tejido al irradiar con más de una fuente de luz se ha procedido de tres maneras diferentes:

1. En este caso se tiene  $n$  fuentes separadas una distancia  $a$  en la superficie  $\rho$  del tejido a tratarse relacionándose entre si mediante la ecuación  $\rho_t = an$ , donde  $\rho_t$  es la longitud desde el centro del tumor al punto mas externo del tumor a irradiarse expresados en el siguiente grafico:

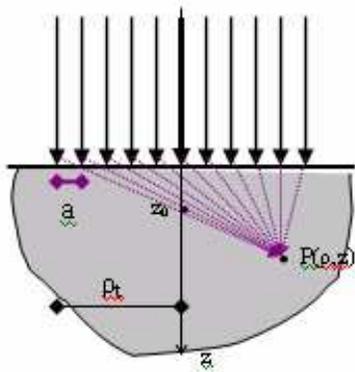


Fig.22 n fibras ópticas sobre la superficie  $\rho$ . “Pencils Beam” que irradian luz de forma homogénea sobre el tejido a una longitud  $2\rho_t$ , cada fuente separada una distancia  $a$ .

Se realiza una sumatoria de la contribución a la tasa de fluencia de dada una de las  $n$  fuentes (separadas una distancia  $a$ ) en cada punto interior del medio. Es decir:

$$\Phi_r(\rho, z) = \Phi(\rho, z) + \sum_{n=0}^{\infty} [\phi(|\rho + na|, z) + \phi(|\rho - na|, z)] \quad (42)$$

Para representar este caso se han utilizado 6 fuentes ubicados a 0,167cm entre ellas obteniendo la tasa de fluencia total en función de la profundidad  $z$  para las diferentes distancia en la superficie con una  $\rho_t=1$ . Se observa que hasta a una profundidad de alrededor 0.09cm la tasa constante y luego decae rápidamente en forma irregular hasta llegar a cero a una distancia de alrededor 0.7 donde desaparece completamente.

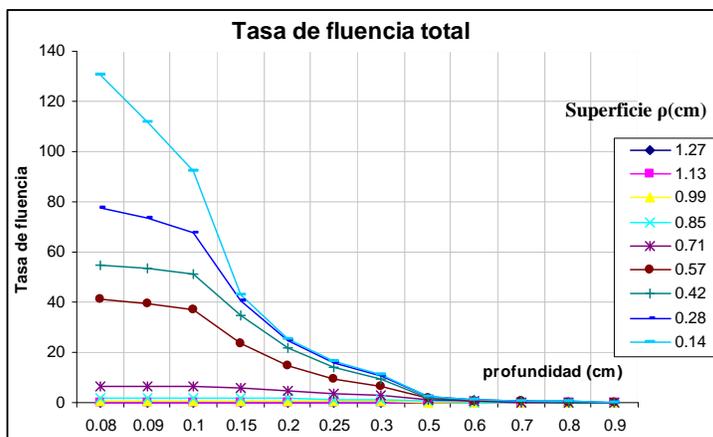


Fig. 23 Tasa de fluencia total con variación de  $\rho$  en  $\rho+na$  en relación a la profundidad  $z$

Se observa entonces que la distribución en profundidad, en este caso, es semejante al de una sola fuente puntual, habiendo tan solo una extensión en la distribución lateral en las dimensiones del área total abarcada por la fuente.

2. Un segundo modelo analiza la posibilidad de que la fibra óptica de irradiación de luz pueda ser ubicada a diferentes profundidades en un mismo eje para posible tratamiento de un tumor puntual localizado al interior de la superficie del medio. Note que en este

caso el tratamiento de terapia foto-dinámica debería ser fraccionario. En este modelo se colocan varias fuentes a diferentes profundidades  $z_0$  como indica la siguiente figura

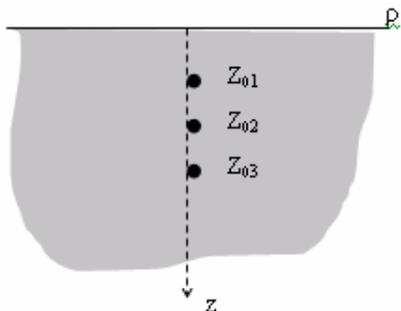


Fig.24  $n$  fuentes colocadas a una profundidad  $z_0+na$  dentro del tejido

Las fuentes varían en profundidad, es decir  $(z_0 + na)$  donde  $n$ , se ha tomado igual a 3 y  $a=0.3\text{cm}$  se debe añadir que la variación de la referencia extrapolada  $z_e$  también varía en  $(z_e + na)$  para que no altere los valores tomados como referencia de  $z_0$  dado para una fuente de láser rojo e infrarrojo. Siendo  $a$ , la distancia entre ellas respectivamente. En este caso la tasa de fluencia toma la forma:

$$\Phi_i(\rho, z) = \frac{1}{4\pi D} \left\{ \frac{\exp\left[-\mu_{\text{eff}} \left( (z - (z_0 + na))^2 + \rho^2 \right)^{1/2}\right]}{\left( (z - (z_0 + na))^2 + \rho^2 \right)^{1/2}} - \frac{\exp\left[-\mu_{\text{eff}} \left( (z + z_0 + 3na + 2z_e)^2 + \rho^2 \right)^{1/2}\right]}{\left( (z + z_0 + 3na + 2z_e)^2 + \rho^2 \right)^{1/2}} \right\} \quad (43)$$

Se obtiene el siguiente gráfico:

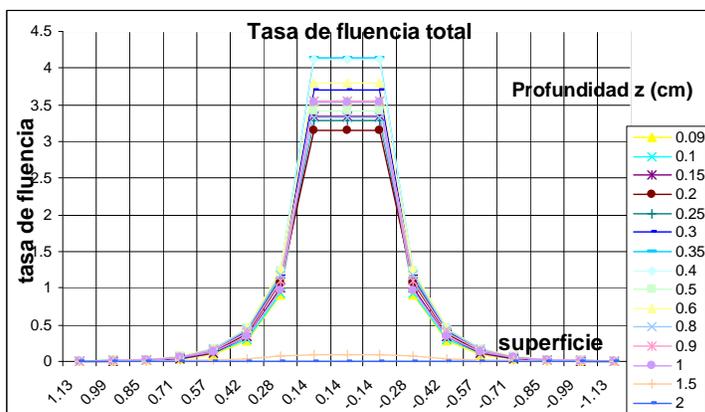


Fig. 25 Tasa de fluencia total con variación de  $z_0$  en  $z_0+na$  en relación a la superficie  $\rho$ . Se utiliza 3 fuentes a una distancia 0.3cm cada una

La distribución lateral muestra un área un poco mayor irradiada alrededor del centro del tumor que alcanza hasta una distancia en superficie de  $\rho$  de 0,90cm; es decir, que se tiene más distancia irradiada en relación con la irradiación de una sola fuente.

La distribución en profundidad muestra picos precisamente en los puntos donde se colocó la fuente es decir 0, 0.3, 0.6, 0.9 cm.

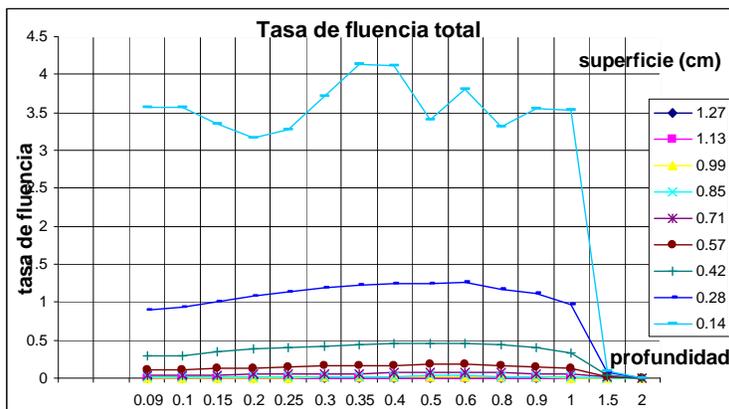


Fig. 26 Tasa de fluencia total con variación de  $z_0$  en  $z_0+na$  en relación a la profundidad  $z$ . Se utiliza 3 fuentes a una distancia 0.3cm cada una

Como se mencionó anteriormente, este modelo es válido para utilizarse en tumores a profundidad mediante la técnica esterotáxica. Aplicable tal vez en carcinomas profundos como espino-celular. A diferencia del modelo anterior, aquí no podemos poner un límite en la profundidad del tumor ya que al realizar un estudio *in vivo* este valor no se lo puede obtener hasta realizarse la exéresis tumoral y el examen histopatológico por lo que es suficiente utilizar 3 fuentes que tienen un alcance según el gráfico obtenido de 1,5cm, suficiente para estos tipos de carcinomas.

3. En este modelo se toma en cuenta fuentes de diferente y mayor longitud de onda que el rojo, por lo tanto diferente interacción con el tejido. Consideramos que la ecuación de tasa de fluencia en diferente longitud de onda sigue funcionando y que los valores del coeficiente de atenuación efectivo y de difusión no cambia. Esta última parte no es cierto ya que estos factores son dependientes de las características ópticas del tejido y su interacción con la luz.

Se utiliza la siguiente ecuación para su modelación:

$$\Phi_i(\rho, z) = \frac{1}{4\pi D} \left\{ \frac{\exp\left[-\mu_{\text{eff}}\left((z-(z_0+a))^2 + \rho^2\right)^{1/2}\right]}{\left((z-(z_0+a))^2 + \rho^2\right)^{1/2}} - \frac{\exp\left[-\mu_{\text{eff}}\left((z+z_0+a+2z_e)^2 + \rho^2\right)^{1/2}\right]}{\left((z+z_0+a+2z_e)^2 + \rho^2\right)^{1/2}} \right\}$$

Donde  $a$  es una constante que considera la distancia de penetración de la luz como función de la longitud de onda empleada, se utilizó valores de  $a$  desde 0 hasta 1,5 en pasos de 0,3 cm. Tenemos entonces:

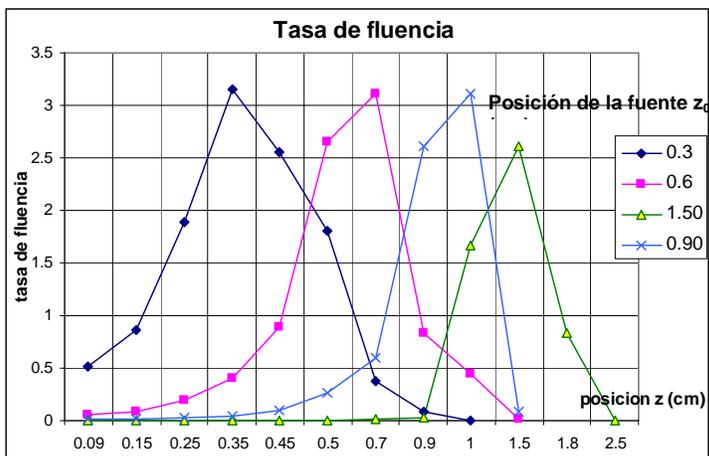


Fig. 27 Tasa de fluencia para diferentes longitudes de onda

Notamos que a medida que aumenta el pico de tasa de fluencia se desplaza hacia la derecha en posición (profundidad) por lo tanto tenemos una mayor area irradiada en profundidad útil para carcinomas profundos.

Este modelo se consideraría aplicable experimentalmente si se encontraría los coeficientes de absorción ,difusión y factor de anisotropía para cada una de las longitudes de onda a emplear además recordemos que al utilizar longitud de onda diferente que penetre mas tenemos mayores problemas en la superficie de la piel como quemaduras, técnica que es utilizada en otras aplicaciones dermatológicas (Nd-YAG)

## CAPÍTULO 5

### RESULTADOS

➤ Al realizar el análisis de la región tumoral y obtener los resultados histopatológicos de la pieza anatómica, se tienen 3 tipos de curvas de isoprobabilidad :

La curva de isoprobabilidad visual (MACRO) que es el límite que se puede observar sin necesidad de aplicar ninguna técnica y es graficada directamente.

La curva de isoprobabilidad por fluorescencia que van desde 0,1 a 100% de probabilidad de que existan células cancerosas.

La curva de isoprobabilidad referencial histopatológico (MICRO) que es el resultado del análisis histopatológico especial realizado sobre el tejido excorizado.

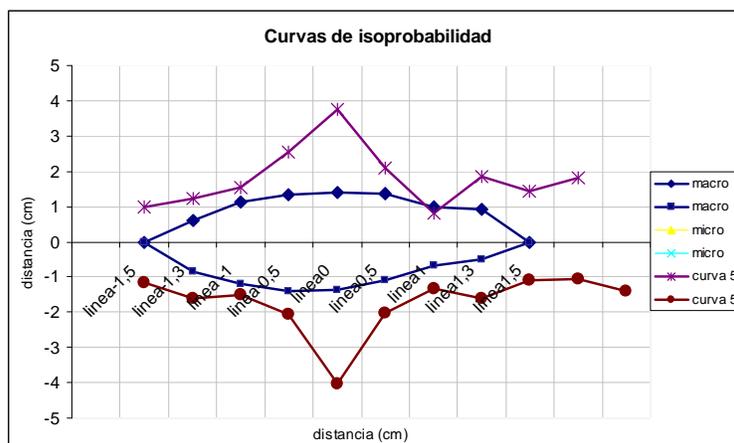


FIG 22. Tenemos las 3 tipos de curvas para un paciente en particular. La curva de isoprobabilidad visual (MACRO azul y violeta). La curva de isoprobabilidad por fluorescencia del 5% de probabilidad que exista células cancerosas. La curva de isoprobabilidad referencial histopatológico (MICRO amarillo y celeste). Notamos que tenemos 2 referencias de cada curva ya que tomamos la parte superior del tumor e inferior como independientes.

➤ Al usar la matriz con distribución radial, para la recolección de las medidas de fluorescencia, se observó que esta disposición de medida es de gran utilidad didáctica, es decir, sirve para presentar el informe a grosso modo a los médicos dermatólogos sobre los resultados de fluorescencia obtenidos, además se tiene mayor concentración en la recolección de datos en el centro tumoral que en las regiones externas o fronteras, perdiéndose gran cantidad de información de los puntos que quedan entre cada línea radial (pudiendo en ese lugar presentarse una deformación tumoral y no saberlo). Pese a esto, los resultados obtenidos en matrices radiales son alentadores pudiendo en futuro mejorarse la forma de obtención de espectros bajo este arreglo.

➤ Al usar matriz cuadrada, en la obtención de los datos de fluorescencia, se consigue una mejor distribución de espectros en el espacio del tejido tanto canceroso como sano ya que se tienen datos de manera continua (el barrido se efectúa cada 0,3 o 0,5cm) más cantidad de datos, por lo tanto las curvas de isoprobabilidad son más precisas para las lesiones.

➤ Se utilizaron ecuaciones exponenciales para caracterizar la conformación tumoral a lo largo de las líneas de matriz en base a sus respuestas fluorescentes relativas en el grafico distancia vs. probabilidad para obtener un coeficiente de correlación significativo ( $R^2$  del orden de 0.72) pero se prefirió utilizar su inversa biyectiva que es el logaritmo natural ya que con esto obtenemos un  $R^2$  más significativo (alrededor del 0.82), por lo tanto se ajusta mas a las curvas graficadas. Si se usan ecuaciones polinómicas, se logra ajustar bien todos los puntos pero a grandes distancias (del centro del tumor) el comportamiento es errático (aparecen otros u otro máximo dependiendo del grado de la aproximación polinómica considerada). Lo que debe quedar claro es que los puntos que se obtienen experimentalmente dependen no solo de la precisión instrumental (que sería buena en este caso) sino de otras fuentes de error relacionadas principalmente con la región de tejido donde incide la luz de excitación. Por lo que no necesariamente tenemos unas lecturas uniformes de fluorescencia. Lo que interesa es más la tendencia de crecimiento o decrecimiento, que se lo puede observar mediante una curva que involucre un ajuste de los puntos experimentales.

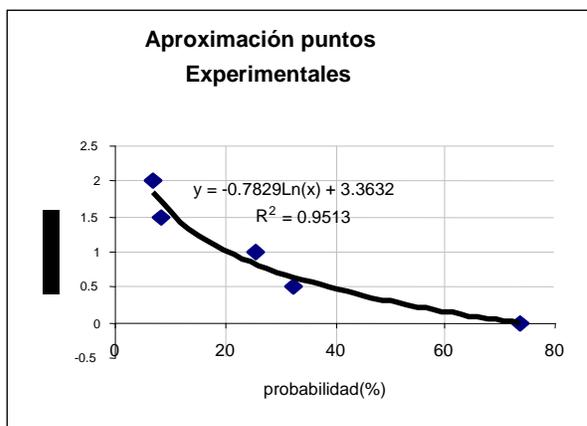


FIG. 23 Aproximación puntos experimentales. Se observa los valores medidos de la razón entre picos para una línea de matriz determinada (puntos negros) y su respectiva curva de ajuste (distancia vs. probabilidad de existencia de células tumorales).

➤ Por la definición de nuestro parámetro experimental, en algunos casos se dan valores negativos de porcentaje probabilidad, estos son desechados (puesto que no tienen sentido físico), y se deben específicamente a que una de las medidas de los picos que definen el parámetro experimental se confunden con el ruido del espectro. En

general, se observa que los valores siguen creciendo hasta el 100% en el centro del tumor y se reducen hasta el 0,1% en piel sana.

➤ También se ha realizado un “barrido de tejido” sin presencia de lesión visible con antecedentes de carcinoma basocelular extraído hace varios años y cuyo examen histopatológica demostraba bordes de la pieza anatómica extraída comprometidos. Dicho barrido se realizó en la parte interna del labio que presentaba malestar en la región bucal, Se observa que el máximo del pico de PpIX en mucosa oral se traslada al 637nm aproximadamente debiéndose esto a que la mucosa no tiene la capa queratósica como el tejido de piel al cual pertenecen los valores de espectro que hemos visto anteriormente.

➤ Después de aplicar el procedimiento descrito tanto de manejo de tumores como manejo de espectros de fluorescencia, se ha llegado a observar que el intervalo de curva de isoprobabilidad de fluorescencia 15% al 35% es el que contiene o rodea los tumores analizados,

➤ Al realizar la relación entre verdaderos positivos de análisis de los tumores mediante fluorescencia y el total de muestra de pacientes, se obtiene la sensibilidad de la técnica que es del 94% y al realizar la relación entre áreas microscópica y de fluorescencia, se obtiene la especificidad, que es del 65%.

➤ En la fase tratamiento, se encontró la tasa de fluencia en cualquier punto en el tejido para una fuente puntual, por medio de la ecuación de transporte (16), resuelta en la aproximación de difusión (42) para el caso estacionario y en medio infinito, y ésta es:

$$\phi(\vec{r}) = Q_s \frac{\mu_{eff}^2}{4\pi\mu_a r} e^{-\mu_{eff} r} \left[ \frac{mW}{cm^2} \right]$$

Donde se observa que depende de los coeficientes de absorción y dispersión reducida.

➤ En la aproximación estacionaria para la geometría de un medio semi-infinito donde un haz incidente delgado y ultracorto equivale a la geometría de medio semi-infinito con una fuente puntual ubicada a una profundidad  $z_0 = [(1-g)\mu_s]^{-1}$  [49] y la tasa de fluencia en la superficie extrapolada del medio es cero  $\Phi(r, t) = 0$  (como condición de borde) se tiene que la ecuación de la tasa de fluencia en un punto P( $\rho, z$ ) es

$$\Phi(\rho, z) = \frac{1}{4\pi D} \left\{ \frac{\exp\left[-\mu_{eff} \left((z - z_0)^2 + \rho^2\right)^{1/2}\right]}{\left((z - z_0)^2 + \rho^2\right)^{1/2}} - \frac{\exp\left[-\mu_{eff} \left((z + z_0 + 2z_e)^2 + \rho^2\right)^{1/2}\right]}{\left((z + z_0 + 2z_e)^2 + \rho^2\right)^{1/2}} \right\}$$

Donde:  $z_0$  es la posición de la fuente de luz, y  $z_e$  es la ubicación de la frontera extrapolada

D coeficiente de difusión y  $\mu_{\text{eff}}$ , coeficiente de atenuación efectiva

$$\rho = \sqrt{x^2 + y^2}$$

☛ Con las mismas condiciones de borde para un haz incidente delgado, se obtiene la tasa de fluencia para el caso de  $n$  haces donde se tiene tres arreglos:

1. Para  $n$  fuentes separadas una distancia  $a$  en la superficie  $\rho$  del tejido a tratarse relacionándose entre si mediante la ecuación  $\rho_t = an$ , donde  $\rho_t$  es la longitud desde el centro del tumor al punto mas externo del tumor a irradiarse ; se obtiene que la distribución en profundidad es semejante al de una sola fuente puntual habiendo tan solo una extensión en la distribución lateral en las dimensiones del área total abarcada por la fuente
2. En este modelo se colocan varias fuentes a diferentes profundidades  $z_0$ ,  $(z_0+an)$  y para mantener la simetría del método de imágenes empleado se varia también el punto de referencia interpolado  $z_e$ ,  $(z_e+an)$ . La distribución lateral muestra una mayor área irradiada alrededor del centro del tumor que alcanza hasta una distancia en  $\rho$  de 0.90cm; es decir, que se tiene más distancia irradiada en relación con la irradiación de una sola fuente. La distribución en profundidad de la tasa de fluencia total muestra 4 picos precisamente en los puntos donde se coloco la fuente es decir 0, 0.3, 0.6, 0.9 cm.
3. En este modelo se toma en cuenta fuentes de diferente y mayor longitud de onda que el rojo, por lo tanto se tiene diferente interacción con el tejido. Consideramos que la ecuación de tasa de fluencia en diferente longitud de onda sigue funcionando y que los valores del coeficiente de atenuación efectivo y de difusión no cambia ya que estos factores son dependientes de las características ópticas del tejido y su interacción con la luz. Notamos que a medida que a aumenta la longitud de onda, el pico de tasa de fluencia se desplaza hacia la derecha en profundidad por lo tanto tenemos una mayor área irradiada en profundidad, útil para carcinomas profundos.

## CAPÍTULO 6

### DISCUSIONES

- ✓ Entre los tipos de curvas de isoprobabilidad que hemos explicado, podemos prescindir del visual ya que el paciente, objeto de estudio, puede tener cicatrices en este lugar por tratamientos anteriores o manchas en la piel, que puedan alterar la forma del tumor; los dos restantes son de gran importancia ya que gracias al resultado histopatológico, que se lo puede considerar real, se puede tomar la curva de isoprobabilidad que más se acople al tejido tumoral y compararla con la de los demás pacientes.
- ✓ En lesiones en donde encontramos placa de cicatriz no se tiene buena absorción de ALA que induce protoporfirina IX (PpIX) por lo tanto al medir su espectro es posible encontrar valores muy bajos de PpIX incluso semejantes a los de piel normal. Cuando se observa que los valores del parámetro “b/a” son muy bajos probablemente se deban a que tanto la lesión es muy alta en superficie de piel o esta ulcerada desprendiendo materia en descomposición por lo que el proceso de fluorescencia es apantallado o disminuido. El ALA en estos casos fue absorbido casi totalmente y/o eliminado, dejando poca cantidad para inducir PpIX y poder tener un espectro de fluorescencia normal. Esto valores no los tomamos en cuenta porque es obvio que en ese lugar existen células tumorales a un 100% (pueden ser reemplazadas por valores de otros puntos semejantes de tumor, sin embargo no es muy aconsejable porque la ecuación de ajuste que se obtendría en una línea dada sobre la conformación tumoral se alteraría). Aún así, se obtiene un buen acople entre la forma de tumor y curvas de iso-probabilidad. Para evitar esta interferencia o por lo menos reducirla al máximo, antes de aplicar el ALA, se debe limpiar cicatrices y partes duras pero evitando sangrado del tumor ya que la sangre contiene gran cantidad de hemoglobina con un pico de absorción en el 635nm; alterando de esta manera la luz de salida fluorescente, es decir el pico de PpIX, pudiéndose tener datos erróneos, recordemos que el tejido canceroso es muy vascularizado por lo que un fuerte rozamiento provoca sangrado fácil.
- ✓ Al encontrar la relación (b/a) de los máximos de los espectros de fluorescencia y observar que ese valor es muy bajo o muy alto respecto a su inmediato anterior en la línea que se está siguiendo, se procede a hacer correcciones de su valor tomando los

valores de  $b$  o  $a$  (de acuerdo con el criterio) de puntos que se encuentren alrededor del valor tomado inicialmente, es decir,  $\pm 1\text{nm}$  de diferencia en el espectro fluorescente. Aunque se está definiendo una mejor metodología, se puede decir que esto es aceptable ya que los espectros colectados producen valores fluctuantes debido a varios factores tanto internos del paciente (que ya se ha mencionado, como son: lesiones de piel de cualquier tipo) como externos (variaciones de luz de fondo que producen variaciones en los espectros)

- ✓ En las fluctuaciones de cambio para reducir o subir el valor de la razón  $b/a$  depende del valor de la intensidad del espectro y su estabilidad; en el caso de un espectro estable que lo obteníamos con una potencia de salida del diódo láser azul de  $1,5\text{mW}$ , tenemos que para el caso de valores altos (o sea  $b/a \gg 1$ ) como bajos ( $b/a \ll 1$ ); de unas cuantas décimas de nanómetro. Lo que no ocurre con valores bajos de potencia de salida ya que los espectros se desestabilizan causando fuertes fluctuaciones en el mismo y los valores de alrededor de los máximos tienden a variar en nanómetros ya que además tenemos espectros de baja intensidad y hasta casi nulos. Se podría utilizar como parámetros de medida no el valor de máximo de pico, sino un área determinada de pico.
- ✓ Para el caso actual, se recomienda trabajar con potencias de salida (incidencia a la piel) mayores a  $1,5\text{mW}$ .
- ✓ Se menciona el caso de un paciente en el que en su biopsia señala la presencia de un carcinoma espino-celular, al cual se le aplicó la técnica bajo estudio. Alrededor de 15 días a 1 mes después se le practicó la excéresis tumoral y cuyo resultado fue que no existía células cancerosas; sin embargo al realizarse las curvas de isoprobabilidad, se pronosticó un tumor de tamaño milimétrico. Esta diferencia de resultados se pudo deber a dos aspectos: 1. Una posible regresión espontánea del tumor luego de un traumatismo (en este caso por el examen de biopsia: debido a que se producen procesos inflamatorios que pueden servir de estímulo para que el tumor se reabsorba), que es muy poco probable; 2. Al realizarse la biopsia y considerando que el tamaño del tumor era de  $0,2 \times 0,3\text{ mm}$  (todo el tumor fue extraído en la pieza anatómica). Al momento de aplicar nuestra técnica se detectaba gran concentración de PpIX en el centro en donde había estado el tumor y esta respuesta se pudo deber al residuo de sangre que como dijimos tiene una absorción en el  $635\text{nm}$  lo que alteró el resultado y llevó a una conclusión errónea. 3. Al realizar la biopsia se pudo haber dejado pocas células cancerosas, las cuales, al realizar el corte seriado de  $3\text{ mm}$  de separación en

el examen histopatológico fueron pasadas por alto, es decir, aún el corte de 3mm resultó muy grande para la cantidad de células que quedaron y por lo tanto no pudieron ser evaluadas en el microscopio. Como sabemos de cada corte de 3mm se obtiene una pieza con el micrómetro del orden de micras y esta pieza no contenía las células cancerosas; este punto tiene mayor peso que el 1.

- ✓ Cuando se trata de un barrido en una región sin presencia de lesión, se toma todas las líneas de la matriz cuadrada por entero, es decir sin dividir las en superior e inferior para encontrar su respectiva ecuación característica; pero se recomienda no obtener un solo tipo de ecuación a lo largo de todo el barrido ya que no tenemos un referente sobre el cual asegurar los datos dados por fluorescencia; solo obtener los resultados de a/b en cada línea y graficar el barrido de la lesión. Esto servirá de referencia al médico al momento de emitir criterio. Se está tratando de analizar una metodología que permita un barrido de recolección de espectros fluorescentes que se podría aplicar en cualquier parte del cuerpo en casos de antecedentes de melanoma de piel tratada anteriormente. Con la finalidad de asegurar el bienestar de la piel que se está estudiando.
- ✓ En todos los pacientes se sugiere que una hora antes de realizarse la aplicación del láser, deben ingerir alimentos ricos en vitamina C y hierro ya que esto produciría un mejor espectro de auto-fluorescencia de piel. Esto se justifica debido a que el ALA es el primer paso del ciclo hemo y que al final tenemos la PpXI que pasa al ciclo del hierro por acción de la enzima ferroquelatasa. Al adicionar vitamina C y hierro provocamos mayor eficiencia en este ciclo y por lo tanto valores aceptables de fluorescencia en estos fluoróforos. El uso de la vitamina C está recomendado por varios artículos en la lucha contra el cáncer [52].<sup>50</sup>
- ✓ El uso de la ecuación de tasa de fluencia utilizada para describir la interacción de la luz roja- infrarroja en el tejido, puede servir para la misma descripción pero con diferentes longitudes de onda (mayores) a las utilizadas, con la condición de encontrar los valores del coeficiente de absorción, dispersión y el factor de correlación explícitamente para cada longitud de onda.

## CAPÍTULO 7

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### Conclusiones

- El mapeo del tumor mediante un modelo simple de análisis, de los datos de fluorescencia recolectados en forma de matriz, permite la obtención de curvas de isoprobabilidad que a su vez permiten enmarcar la región tumoral, donde se recomienda utilizar la curva del 12% para asegurar buenos resultados en las lesiones.
- Al superponer la forma del tejido sobre la matriz y reemplazarlo con plástico transparente tenemos mejor colocación del tejido sobre la matriz disminuyendo el error de toma de valores. Como sabemos, la piel es muy versátil; por lo que necesitamos un material que se amolde y permita ingresar la punta de la fibra óptica para realizar las respectivas mediciones en especial si tenemos lesiones sobre el nivel de la piel normal por eso se sugiere mejor el reemplazo de papel por plástico transparente.
- El criterio de excisión de la región infectada definida por el cirujano podría ser reemplazada por un criterio más técnico en base a las curvas de iso-probabilidad definidas. La ventaja es que el médico podría realizar la exéresis tumoral sin incluir en la pieza anatómica piel sana y con una buena probabilidad de que no existan células tumorales y recidivas futuras. Esto va en beneficio del paciente tanto a nivel estético como psicológico. La desventaja es que el láser de 400nm, tiene una profundidad de penetración de alrededor de 3mm por lo que en lesiones cancerosas profundas no se podría realizar un buen diagnóstico.
- Se debería desarrollar un equipo LIF que permita la recolección de espectros de una manera más efectiva y que la potencia de salida mínima requerida del diodo láser debe ser mayor a 1.5 mW en una área de salida de aproximadamente 0.28 cm<sup>2</sup> onda continua.
- Se tiene una sensibilidad del 94% eso indica que la curva de isoprobabilidad encontrada del 15% al 35% nos da de manera precisa la probabilidad que exista células tumorales y es válida para ser usada en los protocolos para manejo de cáncer de piel no melanoma a nivel dermatológico, en cuanto a la especificidad del 65% hemos expresado que la técnica no distingue patologías ni diferencia entre una neoplasia benigna (lunares) o maligna (carcinoma baso-celular o espino-celular) por lo que para este propósito se recomienda incorporar una técnica diferente.

## Recomendaciones

- La aplicación del ALA y el diagnóstico mediante fluorescencia debe ser complementado por el tratamiento de los cánceres no melanoma, mediante la irradiación de la zona afectada por una dosis pre-determinada de luz roja, llamado tratamiento foto-dinámico.
- Se recomienda utilizar un cuarto a poca luz o por lo menos con luz constante (que la camilla no este cerca de ventanas), ya que esto influiría en las mediciones tomadas (al inicio de la sesión, tomamos el espectro de la luz de fondo y restamos del espectro de interés si tenemos variación de dicha luz de fondo, el espectro que obtenemos seria alterado). En estos casos, volver a sustraer la luz de fondo y empezar de nuevo con las mediciones
- En el estudio de la distribución de luz en el tejido con fuente puntual se observa que a la profundidad  $z_0$  se tiene el máximo de tasa de fluencia, y cumple con la ecuación de transporte estacionaria.
- Para una fuente de luz homogénea incidentes en todo el tejido canceroso , se observa que su decaimiento es suave desde  $z=0.07$  ( $z_0$ ) hasta alrededor de 0.7cm que casi se vuelve constante con valores de fluencia semejantes a cero
- La dosis a emplearse para la fase tratamiento con una fuente de 635nm se ha fraccionado en 5 partes para un total de  $100\text{mW}/\text{cm}^2$  donde los tiempos de irradiación están acordes con la distribución de la luz roja en el tejido, suficiente para producir una foto-activación en el área a irradiarse.
- De los tres modelos obtenidos al aplicar la ecuación de la tasa de fluencia en medio semi-infinito con varias fuentes, se recomienda utilizar el segundo modelo, ya que para su uso se necesitan diferentes fuentes de la misma longitud de onda y de acuerdo a la profundidad del tumor se las coloca a lo largo del eje z de tal manera que en los gráficos Tasa de fluencia vs. Profundidad se observe una buena delimitación en profundidad del tejido canceroso. Para esta aplicación se recomienda cuantificar la profundidad del tumor mediante una biopsia tipo "punch" pre tratamiento realizada por el dermatólogo donde al analiza que tipo de tumor se va a irradiar y si los bordes laterales y profundos están comprometidos; con este resultado(profundidad) y el de fluorescencia(superficie),obtener las distancias a colocarse las fuentes para obtener una irradiación optima(grafico Tasa de fluencia vs profundidad/superficie)

## CAPÍTULO 8

### FUTUROS TRABAJOS

➤ En cuanto al fluorosensor utilizado para la fase diagnóstico, se espera construir un acoplamiento de escaneo que pueda recolectar los datos como un arreglo de matriz cuadrada mucho más rápido.

➤ Como se ha mencionado, la presencia de mutaciones en p53 también puede ser utilizada en la valoración de márgenes en la extirpación de neoplasias ("márgenes moleculares"), pues la valoración molecular de p53 permite afinar aún más en la predicción de las recurrencias locales del tumor el estudio genético de p53 basado en biología molecular del ADN mediante la técnica de diagnóstico por extracción y análisis de ADN llamado PCR in situ

➤ Se espera también construir un prototipo para la fase tratamiento integrada por una fuente de luz de 635nm, onda continua y una potencia de  $100\text{mW}/\text{cm}^2$  probada primero *in vitro* sobre tejidos excorizados y luego en pacientes del Servicio de Dermatología del HCAM

➤ Para comprobar la eficiencia de la fase tratamiento, el uso de la técnica de diagnóstico por extracción y análisis del ADN llamado PCR de Biología Molecular es el paso próximo a realizarse conjuntamente con el Servicio de Genética del HCAM.

➤ A nivel mundial se estudia nuevas drogas derivados de la Hematoporfirina humana HDP como agente fotosensibilizante el cual tenga menos complicaciones a la hora de administrar al paciente como no crear fotosensibilidad en paciente, menos tiempo de recuperación luego de aplicado dicha droga debido a la fotosensibilidad en especial al agente aplicado vía intravenosa ya que recorre todo el sistema para concentrarse en una sola región (región cancerosa), mayor selectividad en tejido neoplásico, una farmacodinámica eficiente(rápido desalojo del cuerpo), entre otros

➤ El uso de la ecuación de la tasa de fluencia en un medio semi-infinito para longitudes de onda superiores a la roja y los valores de los coeficientes de absorción y difusión para cada longitud de onda utilizada deberían ser estudiados para crear una generalización del modelo de la interacción de la luz con el tejido

## GLOSARIO

**Fotoblanqueo (Photobleaching):** destrucción irreversible de los productos de la fluorescencia desde una intensidad excesiva de la estimulación de la luz

**Necrosis :** muerte de un determinado tejido. Gangrena.

**Apoptosis celular:** fenómeno por el cual las células mueren una vez terminada su función. También se denomina muerte celular programada. Este tipo de muerte celular es vital en la homeostasis tisular porque cuando se altera se producen enfermedades degenerativas como la enfermedad de Alzheimer, daño isquémico, desórdenes autoinmunes y varios tipos de cáncer.

**Derivado de la Hematoporfirina Humana:** sustancia química preparada mediante tratamiento de hematoporfirinas (porfirina en la que dos anillos pirrólicos tienen una cadena lateral de metilo y otra de propionato, mientras que los otros dos anillos pirrólicos tienen una cadena lateral de metilo y una de 1- hidroxietilo) con ácido acético- ácido sulfúrico que se concentra selectivamente en el tejido tumoral metabólicamente activo entre los que tenemos el ácido delta Aminolevulínico, la verteporfirina,

**Carcinoma Basocelular:** neoplasia que se inicia generalmente con una pequeña pápula ligeramente elevada que puede curar y luego reaparecer, formando finalmente un tumor liso que se extiende por debajo del mentón e infiltra tejidos más profundos, incluso el hueso. Pocas veces da metástasis pero algunas veces puede extenderse a los ganglios linfáticos. El carcinoma basocelular no es frecuente en la mucosa bucal. Algunos autores lo denomina epiteloma basocelular. Conjuntamente con el carcinoma espinocelular son llamados cáncer de piel no melanoma.

**Carcinoma Espinocelular:** carcinoma cuyas células tienden a diferenciarse del mismo modo que las células de la epidermis, es decir formando células espinosas y sufriendo cornificación. Puede aparecer en cualquier órgano con epitelio escamoso estratificado y es el tumor maligno más común de la cavidad bucal, siendo sus sitios habituales la lengua, el piso de la boca, la mucosa alveolar, el paladar y la mucosa bucal. También es muy frecuente en el esófago. El tumor típico presenta una lesión ulcerada costrosa de varios milímetros a algunos centímetros de tamaño. Está generalmente bien. Las lesiones predisponentes son quemaduras, radiodermatitis, leucoplasia y queratosis

actínica; otros factores etiológicos pueden ser tabaco, alcohol, sífilis, luz solar y deficiencias nutricionales.

**Recidiva:** recaída, recurrencia o repetición de una enfermedad o proceso o de un patrón de comportamiento en particular, la repetición de un comportamiento delictivo.

**Exéresis tumoral:** extirpación o escisión quirúrgica de un tumor.

**Acido delta Aminolevulínico:** Es un agente fotosensibilizante que induce PpIX puede ser aplicado por vía tópica e intravenosa. La formación del ALA es el primer paso de la vía biosintética del grupo hemo. Al final de dicha vía se encuentra la Protoporfirina IX (PpIX) a la cual se le incorporará el hierro gracias a la acción de la enzima ferroquelatasa.

**Protoporfirina IX:** es un cromóforo cuyo espectro de emisión fluorescente presenta un máximo en la región del rojo (alrededor de 635nm). La síntesis de protoporfirina IX es esencialmente en la médula ósea e hígado y comienza cuando se condensa Succinil co-A del ciclo de Krebs y Glycina y se obtiene delta-Aminolevulinato. Es la primera reacción de una vía específica que da lugar a la síntesis de porfirinas. La delta-Aminolevulinato sintasa es regulada negativamente parcialmente por el exceso del grupo hemo.

**Exéresis tumoral:** extirpación o escisión quirúrgica de un tumor.

**Espectro fluorescente.** Es la relajación radiactiva total que produce una molécula que ha sido previamente excitada. La emisión puede ocurrir como una distribución ancha en longitud de onda o en picos agudos, con longitudes de onda menor a la luz de excitación.

**Cromóforo.** Grupo de átomos en alguna molécula orgánica capaz de absorber energía electromagnética en la región visible y en la ultravioleta. Estos átomos son capaces de dar coloración a la sustancia que contiene las moléculas. De un grupo cromóforo se puede generar fluorescencia o fosforescencia bajo determinada condición. A estas moléculas se les llama fluoróforos.

**Reacción foto-química.** Las moléculas excitadas ópticamente pueden empezar una transformación con la consecuente liberación de energía.

## ANEXOS

### ANEXO 1. Protocolo individual pacientes

Fecha:  Protocolo No:

#### DATOS DEL PACIENTE:

Nombre: \_\_\_\_\_  
 HCL: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_  
 Dirección: \_\_\_\_\_  
 Raza: Blanca: \_\_\_\_\_ Mestizo \_\_\_\_\_ Negro: \_\_\_\_\_ Indio: \_\_\_\_\_  
 Teléfono 1: \_\_\_\_\_ Teléfono 2: \_\_\_\_\_  
 Instrucción: \_\_\_\_\_  
 Estado Civil: \_\_\_\_\_  
 Ocupación: \_\_\_\_\_  
 Observaciones: \_\_\_\_\_

#### ANTECEDENTES:

##### APP

Diagnóstico patológico - \_\_\_\_\_  
 Tratado anteriormente de lo diagnosticado: \_\_\_\_\_  
 Toma medicación actualmente. Cuál es: \_\_\_\_\_  
 Fecha y hora de haber tomado medicación: \_\_\_\_\_  
 Q.T: \_\_\_\_\_ R.T. \_\_\_\_\_ OTROS: \_\_\_\_\_

APF: \_\_\_\_\_  
 APQ: \_\_\_\_\_

Observaciones: \_\_\_\_\_

#### DESCRIPCIÓN DE LA LESIÓN:

Tamaño: Largo: \_\_\_\_\_ Ancho: \_\_\_\_\_ Profundidad: \_\_\_\_\_  
 Descripción física: Color: \_\_\_\_\_ Consistencia: \_\_\_\_\_  
 Dolor: \_\_\_\_\_ Prurito: \_\_\_\_\_ Sangrado: \_\_\_\_\_  
 Observaciones: \_\_\_\_\_

#### ANÁLISIS DE DATOS LIF

##### MATRIZ OBTENIDA

Potencia Láser \_\_\_\_\_  
 Observaciones: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

#### Evaluación lesión :

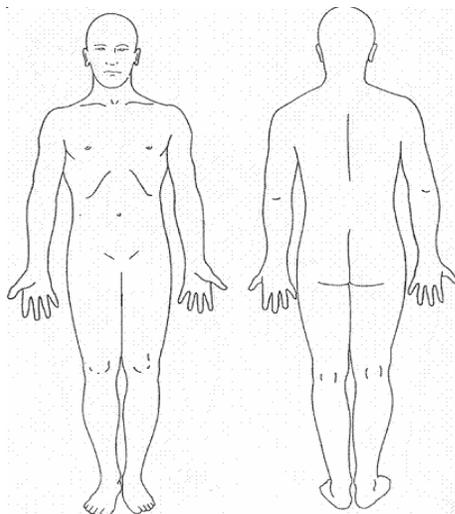
Inmediata: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Mediato(15 días) : \_\_\_\_\_

Tardío: \_\_\_\_\_

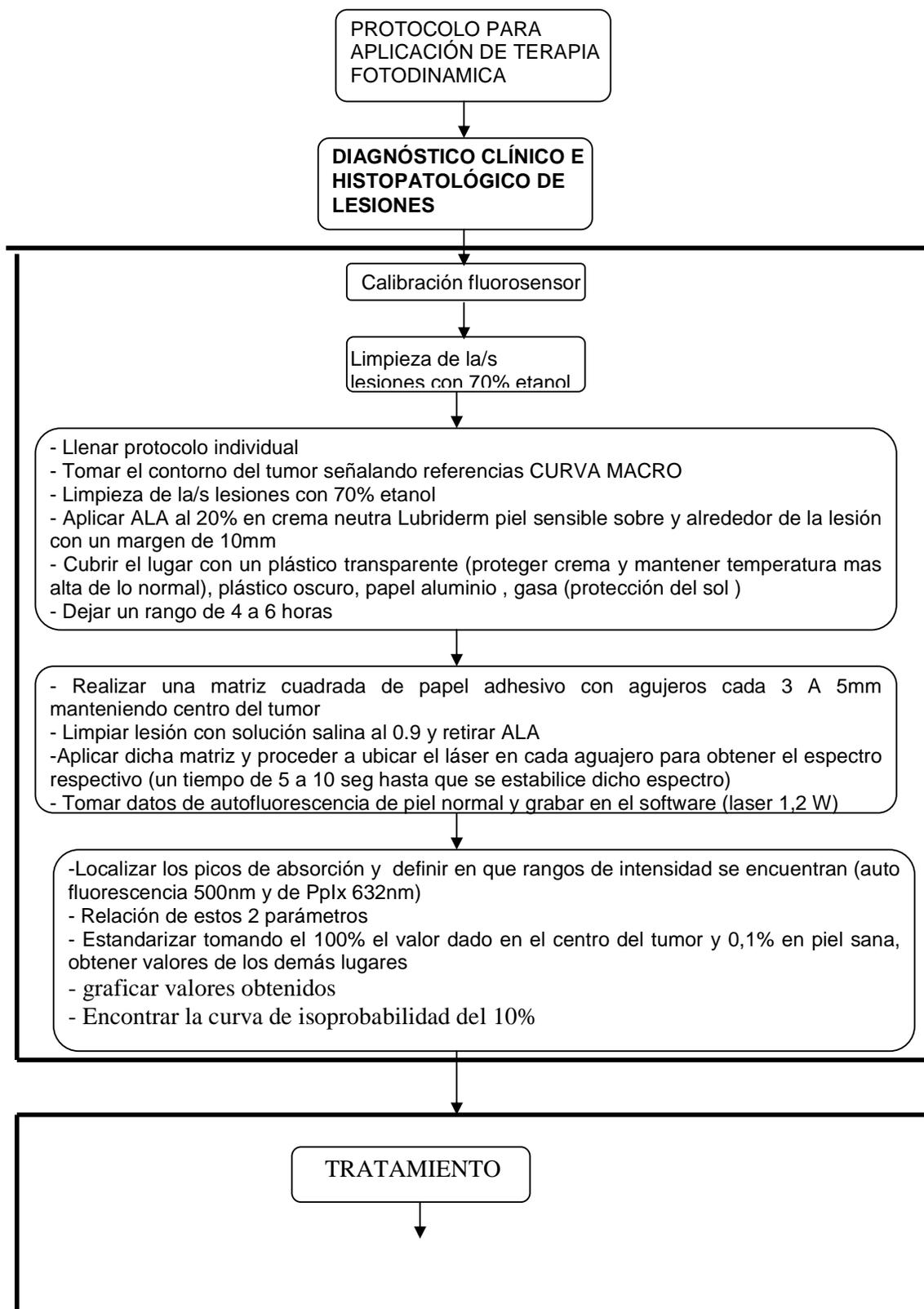
Observaciones: \_\_\_\_\_

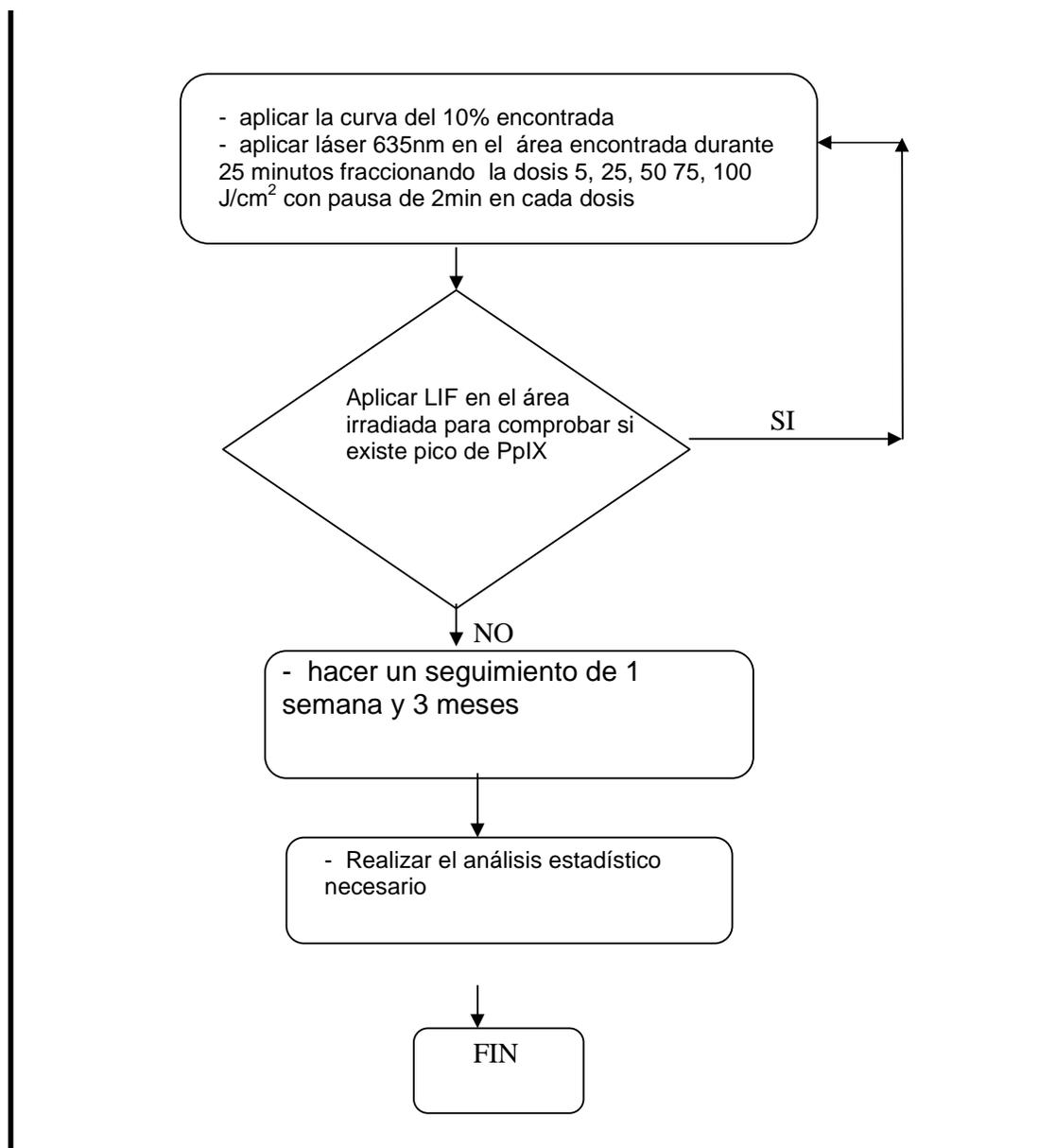
**LOCALIZACIÓN:**



\_\_\_\_\_  
FIRMA RESPONSABLE

## ANEXO 2. PROTOCOLO GENERAL (DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO)





### **ANEXO 3. PROTOCOLO DERMATOLOGO**

#### **Criterio de inclusión:**

- Mayores de 18 años
- Pacientes con tendencias a hacer queloides
- Queratosis extensas
- Pacientes que rehúsan cirugía
- Pacientes con marcapasos
- Pacientes con edad avanzada
- Con alteraciones en la coagulación
- Sin tratamiento específico por lo menos en 30 días antes sin uso de medicina tópica o sistémica( fotosensibilizantes, inmunosupresores)
- Pacientes en los que se han probado otras técnicas sin resultados

#### **Criterio de Exclusión:**

- Pacientes con historial de fotosensibilidad
- Gestantes
- Pacientes de radioterapia, quimioterapia hormonoterapia, etc.
- En estado hematológico delicado

NOTA: pedimos de manera especial al personal medico dermatológico recomendar al paciente realizarse este estudio antes de comenzar su respectivo tratamiento

## ANEXO 4. PROTOCOLO DEL FÍSICO-MEDICO

### PREPARACIÓN:

- Recibir al paciente enviado por el médico con cordialidad
- Hablarle sobre el procedimiento a seguir
- Conseguir aprobación del paciente ( firmar hoja de aceptación)
- Llenar datos en la hoja de PROTOCOLO INDIVIDUAL DE PACIENTE
- Explicarle la HOJA DE INSTRUCCIONES DE PACIENTE
- Proporcionarle los materiales necesarios para su preparación al diagnóstico
- Concertar cita

### DIAGNÓSTICO LIF:

- **PREGUNTAR AL PACIENTE SI EL ALA FUE COLOCADO SIGUIENDO LAS INSTRUCCIONES DADAS** (es importante que cumpla las **4 horas** colocado el ALA) caso contrario dar una nueva cita
- Para las respectivas mediciones :
  1. Crear una carpeta con el nombre del paciente y subcarpetas con las horas en las que se tomó espectro( esto en caso que al paciente se le pueda tomar mediciones cada hora)
  2. Limpiar fibra óptica y revisar que el sistema fluorosensor – software (00lbase32) este funcionando normalmente
  3. Guardar background con un tiempo de integración 100mseg , average 10 y reducir escala de (intensidad) a 2000
  4. Quitar los apósitos de la lesión y limpiar con suero fisiológico si necesita ayuda del medico dermatológico solicitarla.
  5. Tomar datos de fluorescencia completando el PROTOCOLO INDIVIDUAL DE PACIENTE
  6. Realizar la respectiva área de matriz utilizando la curva del 10% del tumor

## ANEXO 5. PROTOCOLO CIRUJANO - DERMATOLOGO

Los protocolos para excéresis de tumor ya están establecidos, el presente sigue su mismo lineamiento pero con las variaciones que involucran el realizar el estudio que se está llevando a cabo.

### PRE CIRUGIA

- Pedir al paciente se realice exámenes de laboratorio (biometría hemática, química sanguínea, pruebas de coagulación)
- Realizar una valoración pre-operatoria (Electro-cardiograma, rayos X de tórax) .

### CIRUGIA

Cuando el paciente esta listo para intervención quirúrgica en quirófano con el personal necesario, se lleva a cabo el siguiente procedimiento que se generaliza para todo tipo de cáncer:

- Asepsia antisepsia
- Fijar campos alrededor de la zona a operar
- Demarcacion de la lesion y el margen de seguridad (violeta de genciana)
- Exceresis de la lesión, colocando un hilo de referencia.
- Usar pinzas quirurgicas diferentes pre y post exceresis del tumor
- Lavar el área quirurgica y cambiar de guantes a cirujano previo a la sutura

El margen de seguridad es decir la zona de piel sana perilesional se establece de acuerdo al tipo histológico, al tamaño de la lesion y a la zona anatomica donde esta localizada y si es primario o recurrente [52] .Los promedios en general van de 4 hasta 1 cm

### POST CIRUGIA

- Enviar la pieza anatómica para el respectivo estudio Histo- patológico
- Seguimiento de evolución por consulta externa periódicamente: cada mes el primer año, cada 2 meses el segundo, cada 3 meses el tercero. Esto en caso de carcinoma. Espinocelular. En el caso de carcinoma Basocelular, el paciente puede retornar cada 3 meses; hasta completar 5 años post quirúrgico.

## **ANEXO 6. PROTOCOLO HISTOPATOLÓGICO**

- Recibir muestra (pieza quirúrgica)
- Registrar datos como número de Historia Clínica, número patológico

### **AREA DE MACROSCOPIA**

- Verificar datos de pedido para confundir con otros pacientes.
- Observación y realización de cortes de la pieza cada 3mm
- Descripción de forma tamaño, características de la superficie (ulcerado formaciones elevadas, color, consistencia)
- Rotulación de los cortes seriados transversales del tejido para no perder direccionamiento: vértice, superior inferior, hilo de referencia.
- Colocación en casetas debidamente rotuladas. Cuando el tejido no entra en caseta, se realiza cortes en las 4 direcciones tomando tanto tejido canceroso como tejido sano y se verifica hasta donde ha llegado el tumor. El tamaño de caseta estándar es 3 x 2.5cm. Se puede también realizar los cortes habituales pero no en todo el tejido, cortando en la mitad el tejido, se deja un poco de tejido tumoral y los demás cortes siguiendo el protocolo establecido.
- Colocación de casetas en fijador (formol al 10%)

### **AREA HISTOTECNOLOGIA**

- Colocación de casetas en alcohol, formol, cidol.
- Colocación de casetas en parafina para formar bloques
- Corte de bloques en micrótopo para colocar en placas
- Placa teñida

### **AREA HISTOPATOLOGICA**

- Estudio de placas al microscopio
- Diagnóstico
- Análisis de bordes comprometidos en cada muestra de placa (medición de distancia que existe del tumor al borde del tejido)
- Gráfico de la reconstrucción del tejido con valores dados de distancias.

## **ANEXO 7. INSTRUCCIONES AL PACIENTE**

### **PEDIMOS REALIZAR EL SIGUIENTE PROCEDIMIENTO 4 HORAS ANTES DE LA CITA DADA PARA GARANTIZAR LA EFECTIVIDAD DE ESTE PROCEDIMIENTO**

1. Limpiar las lesiones designadas con alcohol antiséptico
2. Aplicar ALA generosamente sobre la lesión y sus alrededores de manera uniforme
3. Cubrir la zona con el plástico transparente
4. Colocar el apósito e inmovilizar los alrededores con esparadrapo
5. Colocar el plástico negro tapando lo anterior e inmovilizar los alrededores con esparadrapo
6. Anotar la hora exacta a la que fue colocada e informar al médico en su cita
7. En caso de no cumplir la aplicación de ALA a la hora señalada, favor llamar al 084419088 para concertar una nueva cita

NOTA: gracias por seguir el procedimiento, cualquier inquietud háganoslo saber

**ANEXO 8. CONSENTIMIENTO DEL PACIENTE****AUTORIZACION DEL PACIENTE**

Yo, ..... Paciente del Hospital  
.....del Servicio de Dermatología ; ya informado  
del procedimiento a realizármeme acepto formar parte de esta investigación sin  
posibilidades de demandas legales en el futuro ; y autorizo utilizar los datos adquiridos  
en dicha investigación .

FIRMA DEL PACIENTE  
NUMERO DE CEDULA

**ANEXO 9. HOJA DE DATOS DEL ACIDO DELTA AMINOLEVULÍNICO****delta-Aminolevulinic acid hydrochloride**

5-Amino-4-oxopentanoic acid hydrochloride

Catalog # A167

[5451-09-2]

|  
In StockFormula  $C_5H_{10}ClNO_3$ 

&gt;98%

Mass: 167.59

125mg

1g

5g

\$12

\$65

\$285

More information - Cert. of Analysis, MSDS, UVSA (most recent items may not be available online)

[MSDS](#)

Product Categories Click to browse products within each category

[Porphyrins Precursors](#)

**ANEXO 10. IDENTIDADES PARA RESOLUCION DE INTEGRALES**

Consideremos A y B vectores arbitrarios y C un escalar todo independiente de s

$$\int_{4\pi} \vec{A} \cdot \vec{s} d\vec{s} = 0$$

$$\int_{4\pi} \vec{s} (\vec{s} \cdot \vec{A}) d\vec{s} = \frac{4\pi}{3} \vec{A}$$

$$\int_{4\pi} C \vec{s} d\vec{s} = 0$$

$$\int_{4\pi} (\vec{A} \cdot \vec{s})(\vec{B} \cdot \vec{s}) d\vec{s} = \frac{4\pi}{3} (\vec{A} \cdot \vec{B})$$

$$\int_{4\pi} \vec{s} (\vec{A} \cdot \vec{s})(\vec{B} \cdot \vec{s}) d\vec{s} = 0$$

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Dermatología. Falabella R. Victoria J., Fundamentos de Medicina. Corporación para Investigaciones Biológicas, sexta edición..
- [2] Oncológica. Fundamentos Moleculares y su Aplicación clínica. Lozano Ramón
- [3] Técnicas de biología molecular en el diagnóstico en dermatología. GARCÍA-ROJO M<sup>1</sup>, MORILLO-castro a. Dermatología peruana - vol. 9, suplemento 1, diciembre - 1999
- [4] p53 function and dysfunction. Volelseein e, kinzler kw. Cell 1992, 70: 532.
- [5] Over expression of p53 protein in basal cell carcinomas of the skin. Shea cr, mcNutt ns, volikenandt m, et al am j pamol 1992, 141:25
- [6] expression of p53 in premalignant and malignant squamous epithelium. Oncogen gusterson ba, anbazhagan r, warren w, et al. 1991, 6: 1785-9.
- [7] Frequent clones of p53mutated keratinocytes in normal human skin. Jonason as, kinala s, price gj, restifo rj, spinelli h, persing j, et al. Proc natl acad sci usa 1996, 93: 14025-9
- [8] Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck. Brennan ja, mao u, hruban rh, et al. N engl j med 1995, 332:429.
- [9] Accumulation of p53 protein as an indicator of p53 gene mutation in breast cancer, occurrence of false positives and false-negatives. Lehmann d, rohn ch, schimid m, graeff h, loseH. Drag mol parthol 1993: 2:36-41,
- [10]<sup>9</sup> El Mundo, SALUD Y MEDICINA 31-07-1998. salud@el-mundo.es . Miriam López Blanco
- [11] (<http://www.mayo.edu/>)
- [12] Pautas para la terapia photodynamic tópica: informe de un taller del grupo británico de Photodermatology. C.A.MORTON, S.B.BROWN, dic. 6 2001
- [13] Photodynamic therapy for the dermatologist. Kittisak s. Medicine, august 20, 2002.
- [14] Endogenous protoporphyrin ix, a clinically useful photo sensitizer for photodynamic therapy. Kennedy, jc, photochem photobiol b. 1992 jul 30, 14(4): 275-92
- [15] Terapêutica fotodinâmica com ácido delta-aminolevulínico em neoplasias queratinocíticas superficiais-Renato Marchiori Bakos<sup>1</sup>; Lucio Bakos<sup>1</sup>. An. Bras. Dermatol. vol.78 no.2 Rio de Janeiro Mar./Apr. 2003
- [16] Interstitial photodynamic therapy diagnostic measurements and treatment in rat malignant experimental tumours. Stenberg m, Lund University Hospital. 2002
- [17] Photodynamic therapy and diagnostic measurements of basal cell carcinomas using esterified and non-esterified  $\delta$ -aminolevulinic acid. JOURNAL OF PORPHYRIS AND PHTHALOCYANINES. 2001; 5: 147-153.
- [18] Photodynamic Therapy utilising topical  $\delta$ -aminolevulinic acid in non-melanoma skin malignancies of the eyelid and the periocular skin. ACTA OPHTHALMOLOGICA SCANDINAVICA 1999:77:182-188
- [19] Efficacia di un protocollo di terapia fotodinamica con Acido delta-Aminolevulinico nella cheratosi attinica facciale e nel fotodanno diffuso.Jouji Nombra . MIE JAPAN. (2004)
- [20] photodynamic therapy and laser based diagnostic studies of malignant tumours. Wang i. Department of Oncology , Lund University. 1999. Isbn 91-628-3352-9.
- [21] delta aminolevulinic acid transport by intestinal and renal peptide transporters and its physiological and clinical implication. Doring, f, Walter, j. The American society for clinical investigation. Inc. Vol 101 number 12, june 1998, 2761-2767
- [22] delta aminolevulinic acid base photodynamic therapy. Photobiology.2002
- [23] Topical photodynamic therapy in basal and squamous cell carcinoma and penile bowen's disease with 20% aminolevulinic acid and exposure to red and infrared light. Harth y. Hirshovitz b. Harefuah 1998
- [24] Principles of clinical Photodynamic Therapy. Stepp h. Acta endoscópica laser research laboratory University of Munich vol. 33 no. 4 2003.
- [25] diode laser spectroscopy in extended wavelength ranges. Gustafsson u. Lund reports on atomic physics April 2000, isbn 91-7874047-9.
- [26] El poder terapéutico de la luz . La combinación de fármacos que sensibiliza el cáncer y la terapia con láser puede provocar la autodestrucción de algunos tumores. Blanco m. El Mundo. Jul 1999
- [27] laser in medicine. Goldman, l. Boca ratón London isbn 0-8493-1146-2
- [28] Pautas para la terapia fotodinámica tópica: informe de un taller del grupo británico de Photodermatology. C.A.MORTON, S.B.BROWN, dic. 6 2001
- [29] ala based photodynamic therapy of jurkat cells: temperature dependence. Miah m. Pakistan journal of biological sciences 5(7): 770-773, 2002
- [30] Photodynamic Therapy for choroidal neovascular disease: photosensitizer and clinical tred. Ophthalmol Clin Noth Am. Lim JI. 2002 473-478

- 
- [31] A review of progress in clinical photodynamic Therapy. Zheng Huang. Technol Cancer Res Treat 2005 283-293.
- [32] Systemic photodynamic therapy is a safe and effective treatment for psoriasis. Boehncke WH, Elshorst- Schmidt. Arch Dermatol 2000 Fe. 136(2). 271-271
- [33] distribución de la PpXI en condiloma ano genital virus de la Papiloma Humana principal causa del cáncer de utero. Dougherty TJ, Kaufman JE.. Cancer Re 1980 2628-35
- [34] Topical ALA photodynamic Therapy for the treatment of acne vulgaris Hongcharu W, Taylor Cr.. Invest Dermatol 2000 115(2) 183-193
- [35] Photodynamic Therapy for hirsutis Grossman M, Winverly J.
- [36] Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumours Dougherty TJ, Kaufman JE.. Cancer Re 1978 2628-35
- [37] Photodynamic Treatment for cancers of the head and neck Feyh J.. Feyh J. J. Photochim Photobiol 1996 175-177
- [38] Lasers in medicine. Waynant Ronald. CRC PRESS. 2002
- [39] Methods, Instrumentation and mechanisms for optical characterization of tissue and treatment of malignant tumours. Sara Palsson. Doctoral Thesis. Department of Physics Lund Institute of Technology. 2003
- [40] Optical analysis of biological media. Jan Sorensen Dam. Doctoral Thesis. Department of Physics Lund Institute of Technology
- [41] Development and Application of three dimensional light distribution model for laser irradiated tissue. G. Yoon A J Welch. IEEE j. Quant Electr QE 23 1721-1733.
- [42] Summary of optical properties in optical thermal response of láser irradiated tissue. W. F. Cheong. Eds. A.J. Welch , M.J.C. Van Gemert pp 275-303.
- [43] Implementación de un método de análisis cuantitativo y cualitativo por espectroscopia de fluorescencia inducida por láser .e. Mejía, o. Aya. . Revista colombiana de física , vol 30, no. 1 .Universidad Industrial de Santander
- [44] Fluorescencia Inducida por láser : principios y aplicaciones. François piuzzi laboratoire francis perrin cea-cnrs
- [45] Compact fiber optic fluorosensor using a continuous wave violet diode laser and an integrated spectrometer. Svanber , S. Lund Institute of Technology. Department of physics.2000
- [46] Montaje y operación del fluorosensor BDCF basado en un diodo láser azul con aplicaciones en medicina y vegetación verde. Coloma Juanita. Escuela Politécnica Nacional . 2002
- [47] Estimation of the Protoporphyrin IX photodynamic Threshold Dose. Palsson Gustafsson, Lotta Stenram Unne. Lund Institute of Technology. Department of physics.2000
- [48] Biomedical and Atmospheric applications of optical spectroscopy in scattering media. Johannes Swartling. Lund Institute of Technology
- [49] Nuclear Reactor Analysis. Duderstadt J, Hamilton L. Wiley N.Y. 1976 pp. 140-144
- [50] Determinación de compatibilidad e identidad. Dermatología peruana - vol. 9, suplemento 1, diciembre - 1999
- [51] Las vitaminas C y E podrían ayudar a reducir el riesgo de cáncer de los fumadores. *Artículo por HealthDay, traducido por Hispanicare HealthDay*
- [52] Márgenes quirúrgicos para extirpación de carcinomas cutáneos primarios. Muñoz p, Ilancapi p. Revista chilena de dermatología. 2004 ;20(1):26-36.