



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA  
ÁREA ACADÉMICA DE COMPUTACIÓN Y ELECTRÓNICA**

**LICENCIATURA EN INGENIERÍA EN ELECTRÓNICA Y  
TELECOMUNICACIONES**

**ESTIMACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA DE LA TERAPIA  
FOTODINÁMICA EN HONGOS DERMATOFITOS E  
IMPLEMENTACIÓN DE DISPOSITIVO ELECTRÓNICO DE  
TERAPIA**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**INGENIERO EN ELECTRÓNICA Y  
TELECOMUNICACIONES**

P R E S E N T A

**LUIS DANIEL LUNA HERNÁNDEZ**

DIRECTORES DE TESIS:

**DRA. KARINA ALEMÁN AYALA**

**DRA. TERESITA SPEZZIA MAZZOCO**

**DR. JULIO C. RAMÍREZ SAN JUAN**

ABRIL, 2018



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**  
**Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería**  
*Institute of Basic Sciences and Engineering*  
**Área Académica de Computación y Electrónica**  
*Computer Science and Electronics Department*

Mineral de la Reforma, Hidalgo, a 13 de marzo del 2018.

**Número de control:** ICBI-AACyE/386/2018  
**Asunto:** Autorización de impresión de Tesis

PDIET. Luis Daniel Luna Hernández  
 Presente.

Por este conducto le comunico que el Jurado asignado al trabajo de titulación de nombre "Estimación de la dosis letal media de la terapia fotodinámica en hongos dermatofitos e implementación de dispositivo electrónico de terapia" después de ser revisado en reunión de sinodales, ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

- PRESIDENTE: Ing. Emmanuel Gutiérrez Rojas
- PRIMER VOCAL: Dra. Karina Alemán Ayala
- SEGUNDO VOCAL: Dra. Rosa Ángeles Vázquez García
- TERCER VOCAL: Dra. María Isabel Reyes Valderrama
- SECRETARIO: Dr. Esteban Rueda Soriano
- PRIMER SUPLENTE: Ing. Benigno Martínez Gutiérrez
- SEGUNDO SUPLENTE: Ing. Mauricio Hernández Castillo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Sin otro particular, le reitero a usted la seguridad y mi atenta consideración.

Atentamente  
 "Amor, Orden y Progreso"

Ing. Emmanuel Gutiérrez Rojas  
 Coordinador de la Licenciatura en

Ingeniería en Electrónica y Telecomunicaciones



Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería  
 Área Académica de Computación y Electrónica

EGR/pov

Ciudad del Conocimiento  
 Carretera Pachuca - Tulancingo km. 4.5  
 Colonia Carboneras  
 Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184  
 Tel. +52 771 7172000 ext. 6320  
 aacye\_icbi@uaeh.edu.mx



[www.uaeh.edu.mx](http://www.uaeh.edu.mx)

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	7
DEDICATORIA.....	8
RESUMEN .....	9
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1. ANTECEDENTES.....	11
1.1.1 ANTECEDENTES DE LA FOTODINÁMICA .....	11
1.1.2 FOTOSENSIBILIZANTES .....	13
1.1.3 MEDIOS DE CULTIVO .....	13
1.1.4 DISPOSITIVO LÁSER .....	14
1.1.5 DIODO EMISOR DE LUZ.....	15
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
1.3 JUSTIFICACIÓN.....	16
1.4 HIPÓTESIS.....	16
1.5 PROPUESTA DE SOLUCIÓN .....	16
1.6 OBJETIVOS.....	17
1.6.1 OBJETIVO GENERAL.....	17
1.6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	18
2.1 HONGOS DERMATOFITOS.....	18
2.1.2 TIPOS Y CARACTERÍSTICAS DE LOS HONGOS DERMATOFITOS.....	18
2.1.3 DERMATOFITOS ANTROPOFÍLICOS.....	19
2.1.4 DERMATOFITOS ZOOFÍLICOS.....	19
2.1.5 DERMATOFITOS GEOFÍLICOS.....	20
2.2 MEDIOS DE CULTIVO.....	20
2.4 TRATAMIENTO DE TERAPIA FOTODINÁMICA.....	22
2.4.1 MECANISMO DE ACCIÓN .....	22
2.4.2 FOTOSENSIBILIZACIÓN .....	22
2.4.3 ESTADOS EXCITADOS Y FOTOSENSIBILIZACIÓN .....	23
2.4.4 FOTOSENSIBILIZANTES .....	25
2.4.5 DOSIS DE LUZ.....	27
2.4.6 DOSIS DE COLORANTE (FOTOSENSIBILIZANTE) .....	28

2.4.7	MUERTE CELULAR.....	28
2.4.8	APOPTOSIS.....	28
2.4.9	ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO .....	29
2.4.10	NECROSIS.....	30
2.4	ELEMENTOS UTILIZADOS EN LA TERAPIA FOTODINÁMICA .....	31
2.4.2	LÁSER.....	32
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....		33
3.1	PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.....	33
3.2	INOCULACIÓN DE ESPORAS EN MEDIOS DE CULTIVO.....	35
3.3	RECOLECCIÓN DE MUESTRA PARA APLICACIÓN DE PDT .....	36
3.4	TRATAMIENTO CON TERAPIA FOTODINÁMICA .....	38
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		40
4.1	RESULTADOS DE APLICACIÓN DE PDT CON DISPOSITIVO LÁSER .....	40
4.2	CONTEO DE COLONIAS POSTERIOR A TERAPIA FOTODINÁMICA (LD50) .....	43
4.3	PRUEBA EN TERAPIA FOTODINÁMICA UTILIZANDO LOS DIODOS EMISORES DE LUZ.....	44
CONCLUSIONES.....		50
TRABAJO FUTURO .....		50
GLOSARIO .....		51
REFERENCIAS.....		54

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Termas romanas expuestas a la luz solar. (Robledo, 2014).....	11
Figura 2: Juego de aparatos ideado por Finsen para tratar el lupus.(Robledo, 2014) .....	12
Figura 3: Componentes del primer láser (Müller, 2010).....	14
Figura 4: Lámparas LED de distintos colores. (BBC, Mundo, 2012) .....	15
Figura 5: Tiña corporal. (Gayosso, 2017) .....	18
Figura 6: A) Cultivo de T. Rubrum; B) Morfología microscópica de T. rubrum(Gayosso, 2017). .....	19
Figura 7: A) Cultivo de M. Canis; B) Morfología microscópica de M. Canis. (Gayosso, 2017).20	20
Figura 8: Medio de cultivo Agar Dextrosa Sabouraud en placa de Petri.....	20
Figura 9: Colonias de Candida (sp) después de irradiación con Terapia Fotodinámica (Arboleda, y otros, 2014) .....	22
Figura 10: Estado fundamental de una molécula y estados excitados que se forman por absorción de energía a partir del estado fundamental. (Fresnadillo, 2012) .....	23
Figura 11: Estado fundamental singlete (S0) y estados excitados singlete (S1) y triplete (S2). Los símbolos ( $\uparrow\downarrow$ ) y ( $\uparrow\uparrow$ ) representan electrones apareados y desapareados. (Fresnadillo, 2012) .....	24
Figura 12: Representación del proceso de fotosensibilización para un fotosensibilizante (Sens). Estados excitados (*). (Fresnadillo, 2012) .....	24
Figura 13: Diagrama de Jablonski sobre la excitación triplete(Espinosa Taxis, Vázquez Cruz, Sánchez Alonso, Pérez Munive, & Larriba Calle, 2015) .....	25
Figura 14: Proceso de Apoptosis en la célula.(Ormaza, 2015) .....	29
Figura 15: Representación gráfica del proceso de necrosis en la célula. (Investigación, 2014) ..	30
Figura 16: Proceso de Autofagia en la célula. (Boya, 2017) .....	31
Figura 17: Diodo Emisor de Luz. (Bernardo, 2014).....	31
Figura 18: Medidor de pH (Servo Vendi, 2017).....	33
Figura 19: A) Medio de cultivo preparado para esterilizarse. B) Autoclave para esterilización. Foto en colaboración con Erick Ivan Barros de la Cruz. ....	34
Figura 20: A) Zona esterilizada por medio de mecheros de alcohol. Foto en colaboración con Erick Iván Barros de la Cruz; B) Placas de Petri estériles.....	34
Figura 21: A) Placa de Petri con cepa de hongo para recolección de esporas; B) Placa de Petri con medio de cultivo para siembra de esporas.....	35
Figura 22: A) Pipeta Accumax PRO; B) Puntas utilizadas en la pipeta Accumax PRO.....	36
Figura 23: Papel filtro. ....	36
Figura 24: División de recuadros de la cámara de Neubauer.(Celeromics, 2017). ....	37
Figura 25: A) Cámara de Neubauer; B) Microscopio de Contraste de Fase Leica DMI3000B..	38
Figura 26: Microplaca de 96 pozos.....	38
Figura 27: A) Espejo; B) Objetivo de Microscopio; C) Microplaca con muestra; D) Mechero de alcohol; E) Láser He-Ne Uniphase. Foto en Colaboración con Erick Iván Barros de la Cruz. 39	39
Figura 28: Cultivo de Hongo Microsporum canis sin tratamiento de PDT.....	40
Figura 29: Cultivo de Hongo Microsporum Canis irradiado por láser de 633nm a una cantidad de 10 J/cm <sup>2</sup> .....	40
Figura 30: Cultivo de Hongo Microsporum Canis irradiado por láser de 633nm a una cantidad de 20 J/cm <sup>2</sup> .....	40
Figura 31: Cultivo de Hongo Microsporum Canis irradiado por láser de 633nm a una cantidad de 30 J/cm <sup>2</sup> .....	40
Figura 32: Cultivo de Hongo Microsporum Canis irradiado por láser de 633nm a una cantidad de 40 J/cm <sup>2</sup> .....	41

Figura 33: Cultivo de Hongo <i>Microsporium Canis</i> irradiado por láser de 633nm a una cantidad de 50 J/cm <sup>2</sup> .	41
Figura 34: Cultivo de Hongo <i>Microsporium Canis</i> irradiado por láser de 633nm a una cantidad de 60 J/cm <sup>2</sup> .	41
Figura 35: Cultivo de Hongo <i>Microsporium Canis</i> irradiado por láser de 633nm a una cantidad de 70 J/cm <sup>2</sup> .	41
Figura 36: Cultivo de Hongo <i>Microsporium Canis</i> irradiado por láser de 633nm a una cantidad de 80 J/cm <sup>2</sup> .	42
Figura 37: Cultivo de Hongo <i>Microsporium Canis</i> irradiado por láser de 633nm a una cantidad de 90 J/cm <sup>2</sup> .	42
Figura 38: Cultivo de Hongo <i>Microsporium Canis</i> irradiado por láser de 633nm a una cantidad de 100 J/cm <sup>2</sup> .	42
Figura 39: Gráfico que representa la inactivación de esporas conforme a la cantidad de luz irradiada.	44
Figura 40: LED Superflux (tipo piraña).	44
Figura 41: A) Detector del Luxómetro; B) Fotodetector; C) LED. Foto en colaboración con Erick Iván Barros de la Cruz.	45
Figura 42: LED de alta potencia.	46
Figura 43: A) Diagrama de circuito de LED's en serie interconectados al driver. Foto en colaboración con Erick Iván Barros de la Cruz.	46
Figura 44: Circuito de LED's físico. Foto en colaboración con Erick Iván Barros de la Cruz.	46
Figura 45: A) Control de Hongo (referencia); B) Muestra tratada a 5 J/cm <sup>2</sup> con 2 repeticiones; C) Muestra tratada a 5 J/cm <sup>2</sup> con 3 repeticiones; D) Muestra tratada a 20 J/cm <sup>2</sup> con 2 repeticiones. Foto en colaboración con Erick Iván Barros de la Cruz.	49

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más grande agradecimiento a los doctores que estuvieron dando seguimiento a esta investigación y que siempre fueron mi guía en todo lo que necesite. A la Dra. Karina Alemán Ayala, quien fue parte esencial por ser mi asesora y por quien comencé a trabajar esta tesis dentro de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; a la Dra. Teresita Spezzia Mazzoco que junto con el Dr. Julio César Ramírez San Juan, el Dr. Rubén Ramos García y el estudiante de doctorado en óptica M.C. Julián Ramírez Ramírez nos abrieron las puertas para aprender sobre la Terapia Fotodinámica dentro del proyecto Ventanas al Cerebro que se desarrolla dentro del Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica.

Por todas sus atenciones, conocimientos, tiempo invertido, por confiar en este trabajo...  
GRACIAS.

## **DEDICATORIA**

A todas las personas que estuvieron para darme ánimos durante este camino, que no me dejaron solo ni un momento y que me alentaron día con día a seguir adelante. A mi mamá que se esforzó día tras día trabajando para que yo siguiera en la universidad, a mi hermana que siempre fue un motivo para seguir, a mi novia y su familia que se preocupaban por preguntar cómo iba en el trabajo, a mi padre que bien o mal siguió apoyándome de alguna forma. Y por supuesto, a Dios, porque me puso en este camino para aprender tantas cosas, para esforzarme y no dejar de ser valiente.



## RESUMEN

La terapia fotodinámica es un método que pretende tratar afecciones del cuerpo humano de la manera menos invasiva posible, de la mano de ésta un factor que resulta representativo son los dispositivos a través de los cuales es aplicada. Actualmente el dispositivo principal consta de un arreglo de láser, pero en el desarrollo de esta investigación se implementó el uso de un dispositivo de LED's.

Los experimentos llevados a cabo fueron sobre muestras de hongos dermatofitos, por medio de luz láser y también luz LED, en los cuales se observó como estas son afectadas al aplicar la terapia fotodinámica con distintos parámetros de tiempo y cantidad de luz. Para utilizar la luz LED hubo que medir la potencia luminosa de estos elementos electrónicos para encontrar el que fuese adecuado para desarrollar un dispositivo de terapia.

Dichos experimentos fueron realizados desde la creación del medio de cultivo, la siembra de la cepa del hongo y hasta la aplicación de la terapia fotodinámica con láser y LED's respectivamente. Los conteos de colonias que se realizaron posteriormente a la aplicación de la terapia fotodinámica permitieron visualizar la inhibición del hongo en cada prueba realizada.

Al finalizar se obtuvo la dosis letal media de la muestra del hongo y se observó la factibilidad de utilizar un dispositivo con luz LED para la terapia fotodinámica, en lugar de la luz láser, logrando su optimización.

## **CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN**

En la actualidad abundan ciertas enfermedades que afectan directamente el órgano más grande en el ser humano, la piel, muchas de estas enfermedades se dan por la presencia de organismos fúngicos que se alojan como huéspedes en ésta y crecen provocando diversos malestares.

Los tratamientos que brindan solución a estas enfermedades van desde medicamentos hasta lo que hoy se conoce como Terapia Fotodinámica.

La terapia fotodinámica da solución a estos padecimientos de una manera en la que el cuerpo humano no es invadido por algún medicamento que pudiera llegar a provocar efectos contraproducentes en el paciente. El uso de un colorante y la radiación de la correcta longitud de onda en un haz de luz permiten a la terapia fotodinámica eliminar en cierta cantidad de sesiones las lesiones en la piel del paciente. Sin embargo, un factor que afecta hoy día el uso de ella es la cantidad de tiempo de las sesiones, la cantidad de estas y su costo. Es visible que la terapia fotodinámica requiere de optimizarse para que pueda expandirse por completo.

Hoy en día y con los avances tecnológicos se cuenta con dispositivos que permiten reducir gastos de energía y dinero obteniendo incluso mejores resultados, uno de ellos es el dispositivo LED.

Un dispositivo diseñado con tecnología LED para la aplicación de la terapia fotodinámica ayudaría a que esta pueda optimizarse exponencialmente ya que su costo de producción sería bajo y por lo tanto más pacientes tendrían a su alcance dicho tratamiento. Además, el hecho de ser portable permitiría que una sesión pudiese llevarse incluso hasta el hogar del paciente y brindaría incluso una mayor comodidad para el mismo.

## 1.1. ANTECEDENTES

### 1.1.1 ANTECEDENTES DE LA FOTODINÁMICA

El origen de la luz como una terapia en la medicina y en la cirugía se puede remontar desde la antigüedad hasta los tiempos modernos. La fototerapia comenzó en el antiguo Egipto, Grecia y en la India, pero desapareció durante muchos siglos y fue redescubierta por la civilización occidental a principios del siglo XX. La captación selectiva de un fotosensibilizante por un tejido neoplásico o un microorganismo y su excitación a través de la irradiación subsiguiente que llevan a la destrucción celular es el principio básico de la terapia fotodinámica (PDT), no es una idea nueva. La utilización de diversos productos vegetales con el objeto de mejorar los resultados de la fototerapia data del 1400 a.C. y es descrita en un libro indio sagrado, Atharva Veda. (McDonagh, 2001).



*Figura 1: Termas romanas expuestas a la luz solar. (Robledo, 2014).*

Hace tiempo, se pensó que la luz del sol era el único aspecto en la cura de los trastornos como el vitíligo, psoriasis, el raquitismo, cáncer de piel, incluso la psicosis. Este proceso de tratamiento es conocido como fototerapia, antes llamada helioterapia. Sin embargo, con el paso del tiempo y el avance de la ciencia, se descubrió que por lo general existen sustancias endógenas que se presentan en la curación de dichos trastornos y que el proceso fotodinámico presenta un medio más preciso para explicar las capacidades curativas de la luz. (Robledo, 2014) (Fig. 1).

### 1.1.1.1 FOTOTERAPIA MODERNA

La fototerapia comenzó a florecer de nuevo a finales de 1800 y principios de 1900. El médico y sanador natural de Suiza, Arnold Rikki, volvió a introducir los poderes curativos de la luz solar que había caído en el olvido durante muchos siglos. En este sentido, es por lo que se le considera el pionero de la fototerapia moderna. Siguiendo los mismos procesos de evolución, los intentos de tratamiento comenzaron con la utilización de la luz solar que más tarde se reemplazó por las fuentes de radiación artificial ultravioleta. En el primer cuarto del siglo XX, la fototerapia se hizo famosa y se aplicaba ampliamente en el norte de Europa y en ciudades de Norteamérica. Una gran contribución para la fundación de la fototerapia moderna fue la del médico danés Niels Ryberg Finsen (1860-1904). Dueño de un instituto médico en Copenhague donde trataba a sus pacientes con la luz del sol en un intento por curar el lupus vulgaris (tuberculosis de la piel) y prevenir la cicatrización en pacientes con viruela (Fig. 2)(Robledo, 2014) (Daniell & Hill, 1991).



*Figura 2: Juego de aparatos ideado por Finsen para tratar el lupus.(Robledo, 2014)*

En sus primeros intentos utilizó la luz solar pero pronto cambió a fuentes de luz artificial o luz solar filtrada. En 1893 se dio cuenta que los pacientes con viruela mostraron mejores resultados con la luz roja. Más tarde, en 1903, demostró el efecto beneficioso de los rayos UV en el cuerpo humano, lo que le llevó a la generación artificial de rayos UV.

Hoy en día, se puede utilizar una amplia gama de fuentes de luz coherentes (láser) y no coherentes (LED's). Las fuentes de luz láser incluyen: los láseres de colorante bombeado por argón o láseres de vapor de metal y láseres de neodimio dopado con granate de itrio y aluminio y de frecuencia doblada (Nd: YAG). Las fuentes no láser incluyen el filamento de tungsteno, el arco de xenón, los halogenuros metálicos y las lámparas fluorescentes. También se están utilizando nuevos desarrollos como los diodos emisores de luz (LEDs) y láseres en femtosegundos. (Robledo, 2014)

### 1.1.2 FOTONSENSIBILIZANTES

En 1900, Oscar Raab y cols. describieron la captación de algunos colorantes, como el naranja de acridina, para sensibilizar microorganismos, como el paramecio, para su destrucción por una exposición posterior a una fuente de luz. Además, descubrieron que esta reacción necesitaba de la presencia de oxígeno y Von Tappeiner, director del Instituto de Farmacología de la Universidad de Munich, le dio el nombre de “acción fotodinámica” o “efecto fotodinámico”.

En 1905, Von Tappeiner y Jodblauer fueron los primeros en aplicar la PDT para el tratamiento del cáncer de piel. Además, esta acción fotodinámica comenzó a estudiarse para el tratamiento de otras enfermedades cutáneas como condylomata lata, lupus vulgar, herpes simples, *molluscum contagiosum*, pitiriasis versicolor, psoriasis. Al inicio se usaba la eosina como fotosensibilizador y la irradiación empleada era la fuente de luz blanca.

En los años posteriores, fueron ensayadas varias sustancias fotosensibilizantes, principalmente, las porfirinas. Los primeros experimentos fueron realizados, en 1911, con la hematoporfirina y, desde entonces, las porfirinas se mantuvieron como las sustancias más eficaces y más estudiadas en la PDT.

Posteriormente, a principios de los 60, en la Clínica Mayo, Lipson y Schwartz demostraron que la administración intravenosa de hematoporfirina en pacientes con cáncer, conducía a su acumulación preferencial en los tejidos tumorales. El problema de estos fotosensibilizadores era que la acumulación cutánea estaba asociada a un lento aclaramiento de la piel, lo que llevaba a una fotosensibilidad a largo plazo que requería fotoprotección durante las 4-6 semanas posteriores a la realización de la PDT. En el intento de evitar este efecto adverso los investigadores comienzan a estudiar formulaciones tópicas de porfirinas. (Robledo, 2014) (Moan, 1990)

### 1.1.3 MEDIOS DE CULTIVO

Se puede decir que la microbiología empieza su verdadero desarrollo como ciencia en el momento en que se descubre el microscopio y comienza la observación de los primeros microorganismos, pero es indudable que la puesta a punto de los medios de cultivo y la utilización del agar como solidificante, marcan dos importantes puntos de inflexión en su evolución.

La primera noticia de la utilización de medios de cultivo llega del micólogo Brefeld, que consiguió aislar y cultivar esporas de hongos en medios sólidos realizados a base de gelatina. En el año 1882 tiene lugar uno de los grandes avances de la microbiología en relación con los medios de cultivo: el médico alemán Walter Hesse introduce el agar-agar (polisacárido extraído de algas rojas) como solidificante. (Universidad de Buenos Aires, 2016).

### 1.1.4 DISPOSITIVO LÁSER

El 16 de mayo de 1960, Theodore Maiman, de los Laboratorios de Investigación Hughes, consiguió fabricar el primer láser operativo. (Fig. 3) El logro ponía fin a una carrera que había ocupado a investigadores y laboratorios durante varios años. Según la versión de los Laboratorios Bell, el acontecimiento clave se remonta a 1958. En diciembre de ese año aparecía en *Physical Review Letters* un artículo en el que Arthur L. Schawlow y Charles H. Townes sentaban los principios de un hipotético amplificador de luz basado en el fenómeno de emisión estimulada de radiación. (Müller, 2010)

Por aquel entonces, Gordon Gould, estudiante de doctorado de la Universidad de Columbia, en Nueva York, ya había desarrollado sus propias ideas para la fabricación de un láser. Su trabajo data de 1957, como demuestra el registro notarial que hizo de sus apuntes, donde acuñaba el término "láser" como acrónimo de Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation.



*Figura 3: Componentes del primer láser (Müller, 2010)*

En su artículo, Schawlow y Townes proponían la idea de disponer espejos en los extremos de una cavidad en la que un medio óptico previamente excitado emitiría luz. La radiación se reflejaría sucesivamente en los espejos, con lo que todos los fotones se alinearían en una misma dirección.

Theodore Maiman fue uno de los lectores del artículo que decidió comprobar la viabilidad de la idea. Eligió un cristal de rubí como medio óptico y lo emplazó entre dos espejos de plata. Para conseguir la excitación en el cristal, dispuso a su alrededor una potente lámpara de destellos. El

dispositivo funcionó. Por fin, el láser se había convertido en algo más que un proyecto teórico basado en un postulado sugerido por Albert Einstein en 1917. Al poco tiempo, los Laboratorios Bell mejoraron el prototipo de Maiman con la fabricación de un láser que operaba de manera continua en vez de pulsada. Con independencia de su polémico origen, la aparición del láser desencadenó una avalancha de patentes e innovaciones que aún continúa hasta el día de hoy. (Müller, 2010).

### 1.1.5 DIODO EMISOR DE LUZ

El 9 de octubre de 1962 el científico estadounidense Nick Holonyak fue pionero de un dispositivo que revolucionó la tecnología de iluminación y con el tiempo hizo que las lámparas incandescentes se volvieran obsoletas. Un LED (siglas en inglés de Diodo Emisor de Luz) es un componente electrónico de dos terminales que permite la circulación de la corriente eléctrica a través de él sin intermediación de un gas, como sucede en los bombillos tradicionales. Los LED que desarrolló Holonyak emitían una luz roja de baja intensidad. (BBC, Mundo, 2012)

En un principio, los bombillos LED invadieron la industria de la decoración navideña. Pero con el desarrollo del LED de varios colores, ahora son la fuente de iluminación de televisores, estadios y casinos. (Fig. 4)

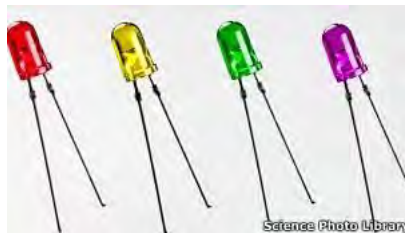


Figura 4: Lámparas LED de distintos colores. (BBC, Mundo, 2012)

Se trata de un desarrollo revolucionario, porque ha permitido generar luz a menor costo y por más tiempo que con la tradicional iluminación de radiación infrarroja. Los bombillos ya no tardan minutos en prenderse, no se calientan y rara vez se funden. (BBC, Mundo, 2012).

## 1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hoy en día los tratamientos para afecciones de la piel como lo es la terapia fotodinámica representan un gran avance en la ciencia biomédica, esto debido a que su principal objetivo es tratar afecciones en el ser humano por medio de un tratamiento no invasivo, es decir, que no

penetran físicamente en el cuerpo. Aunado a esto, por ser un tratamiento nuevo este tiene un inconveniente:

- Los dispositivos para efectuar la terapia fotodinámica resultan caros debido al uso de láser y por ende la terapia puede representar un problema que afecte la economía de los pacientes.

### **1.3 JUSTIFICACIÓN**

La terapia fotodinámica representa un medio por el cual se evita invadir físicamente el cuerpo humano para poder tratar algunas enfermedades. Actualmente se tratan el acné, afecciones por hongos en la piel y se hacen pruebas con células de cáncer de piel, incluso en un futuro se tiene planteado contribuir en el área de la neurología.

Como se puede ver, estamos frente a un gran avance en medicina, que, aunque no esté designado para todas y cada una de las enfermedades, representará un punto de partida para el desarrollo de más tratamientos en el futuro.

Es por todo lo anterior que trabajar en la optimización de estos tratamientos es de gran importancia, ya que de esta manera se puede lograr expandirla a más lugares y ponerla al alcance de la mayoría de las personas que requieran de su aplicación.

### **1.4 HIPÓTESIS**

El diseño de un dispositivo basado en un arreglo de LED's ayudaría a la optimización, innovación y mejora de la terapia fotodinámica, haciendo que esta sea más accesible, eficaz y versátil.

### **1.5 PROPUESTA DE SOLUCIÓN**

Hoy en día los LED's se conocen como una fuente de luz que consume menor energía a un precio más accesible con resultados de calidad bastante altos. Para la optimización de la Terapia Fotodinámica se pretende sustituir el dispositivo láser por uno que incluya los LED's adecuados para proporcionar la potencia luminosa necesaria para la irradiación de muestras in vitro en laboratorio.



## 1.6 OBJETIVOS

### 1.6.1 OBJETIVO GENERAL

Optimizar la terapia fotodinámica aplicada en hongos dermatofitos por medio de la selección de los LED's adecuados para la mejora de costos, portabilidad y tiempo.

### 1.6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar metodología para la preparación de medios de cultivo, soluciones y la manipulación de hongos.
- Aplicar terapia fotodinámica a muestras de hongos para establecer una referencia mediante el dispositivo láser.
- Realizar pruebas con LED's para observar su funcionalidad en experimentos *in vitro* de terapia fotodinámica.
- Analizar la viabilidad del uso de LED's en estudios *in vitro* sobre la terapia fotodinámica para trabajos futuros.

## CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 HONGOS DERMATOFITOS

Los dermatofitos son un grupo de hongos taxonómicamente relacionados que tienen capacidad para invadir el tejido queratinizado (piel, pelo y uñas) del hombre y animales y producir una infección, dermatofitosis, llamada comúnmente tiña. (Fig. 5) (Rubio, Rezusta, Tomás, & Ruesca, 1999)



Figura 5: Tiña corporal. (Gayosso, 2017)

#### 2.1.2 TIPOS Y CARACTERÍSTICAS DE LOS HONGOS DERMATOFITOS

Los dermatofitos se dividen en tres géneros que se distinguen por las características de sus macroconidios, en el género *Trichophyton*, el género *Microsporum* y el género *Epidermophyton*. (Rubio, Rezusta, Tomás, & Ruesca, 1999).

Los hongos del género *Trichophyton* tienen macroconidios alargados cuya porción distal es redondeada y presentan una pared delgada y lisa. Miden de 8 a 50  $\mu\text{m}$  y tienen entre 4 y 6 septos (pared que divide dos cavidades o dos masas de tejido). Los hongos del género *Microsporum* tienen macroconidios fusiformes y presentan una pared gruesa y rugosa con hoyuelos o prominencias que semejan equínulas (tubérculos). Miden de 8 a 15  $\mu\text{m}$  y suelen tener entre 5 y 15 septos. Los hongos del género *Epidermophyton* tienen forma de mazo o bastón y son redondeados en su polo distal. Tienen la característica de nacer individualmente o en racimos y presentan pared gruesa y lisa. (Bonifaz, 2000).

Los dermatofitos se dividen en tres grupos de acuerdo con su preferencia por un ambiente (dermatofitos antropofílicos, zoofílicos y geofílicos), se cree que la especificidad por un hospedero animal se debe a las diferencias de queratina. (Bonifaz, 2000).

### 2.1.3 DERMATOFITOS ANTROPOFÍLICOS

Los dermatofitos antropofílicos, como su nombre indica, tienen preferencia por el tejido humano. Entre los dermatofitos antropofílicos encontramos a *T. rubrum*, causante de pie de atleta y dermatofitosis crónicas. Los dermatofitos antropofílicos pueden ser transmitidos de manera directa (a través de contacto con lesiones activas en otro individuo) o indirecta (por peines, calcetines, ropa, toallas, etc.). Entre las especies más representativas encontramos al *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*. (Fig. 6) (Gayosso, 2017)

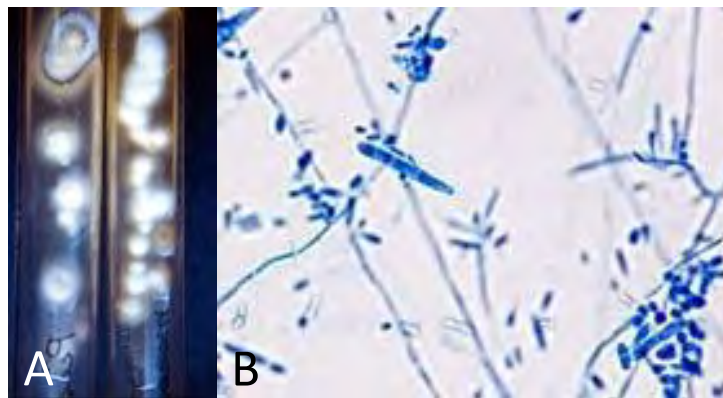


Figura 6: A) Cultivo de *T. Rubrum*; B) Morfología microscópica de *T. rubrum*(Gayosso, 2017).

### 2.1.4 DERMATOFITOS ZOOFÍLICOS

Este tipo de dermatofitos coloniza a mamíferos y aves. Cuando el humano es infectado por este tipo de hongos desarrolla una respuesta inmunitaria mayor. *M. canis* infecta perros y gatos ocasionando que las partículas infectantes se depositen en el ambiente doméstico provocando infecciones familiares. Los dermatofitos zoofílicos de importancia médica son: *M. canis*, *T. mentagrophytes*, entre otros. (Fig. 7) (Bonifaz, 2000)



Figura 7: A) Cultivo de *M. Canis*; B) Morfología microscópica de *M. Canis*. (Gayosso, 2017).

### 2.1.5 DERMATOFITOS GEOFÍLICOS

Los dermatofitos geofílicos son un grupo de dermatofitos que viven en el suelo y tienen la habilidad de colonizar sustratos con queratina, por ejemplo, pelos, plumas, escamas de piel y uñas. Al ser un ambiente no favorable para estas especies su sobrevivencia está mermada por agentes bióticos (pH, nutrientes, humedad y sales) y abióticos (temperatura, luz, clima, altitud). (Bonifaz, 2000).

### 2.2 MEDIOS DE CULTIVO

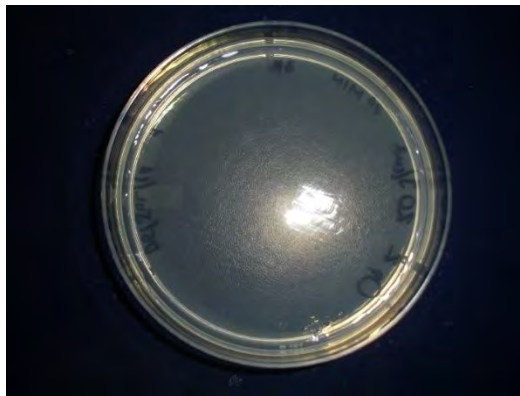


Figura 8: Medio de cultivo Agar Dextrosa Sabouraud en placa de Petri.

Un medio de cultivo es un conjunto de componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos. (Fig. 8).

## 2.3 TRATAMIENTOS EXISTENTES

Este tipo de tratamientos requieren en primera instancia de la identificación del hongo dermatofito a tratar, una vez hecho esto se elige el antimicótico tópico o sistémico adecuado para este y se le administra al paciente. En este tipo de tratamiento el diagnóstico es muy importante ya que de este depende el funcionamiento correcto del mismo.

- **SISTÉMICO:** El tratamiento sistémico está indicado en afectaciones extensas cutáneas (no susceptibles por tanto al tratamiento tópico). Algunos de los medicamentos utilizados son:
  - o Griseofulvina
  - o Itraconazol
  - o Ciclodextrina
  - o Fluconazol
  - o Terbinafina
  
- **TÓPICO:** El tratamiento tópico de las dermatofitosis es posible en lesiones limitadas, se debe utilizar en pacientes embarazadas o durante la lactancia. Este tipo de tratamiento puede administrarse como adyuvante al sistémico o bien para evitar recurrencias post-tratamiento. Al penetrar en la dermis, los diversos compuestos tópicos retardan el crecimiento de los dermatofitos. Algunos de los utilizados son los siguientes.
  - o Bencilamina
  - o Ciclopiroxolamina
  - o Griseofulvina Tópica
  - o Haloprogin
  - o Pómada de Whitfield

La correcta aplicación e ingesta de los tratamientos anteriores es importante para obtener buenos resultados de curación. La mayoría de los fallos en estos casos se presentan debido a un mal diagnóstico, tratamientos simultáneos con alguna otra medicación o no se absorbe adecuadamente. (Palacio, Garau, & Cuétara, 2002)

## 2.4 TRATAMIENTO DE TERAPIA FOTODINÁMICA

La terapia fotodinámica (PDT) es una técnica innovadora con aplicaciones biomédicas que utiliza sustancias activadas por una fuente de luz de una longitud de onda específica. La fotoactivación induce una cadena de efectos fotoquímicos y fotobiológicos que provocan cambios irreversibles en las células expuestas, eventualmente llevándolas a la muerte. Debido a la accesibilidad de la piel, gran parte de las aplicaciones de la terapia fotodinámica se han desarrollado en dermatología. (Fig. 9) (Lyon, Moreira, Moraes, Santos, & Resende, 2011)

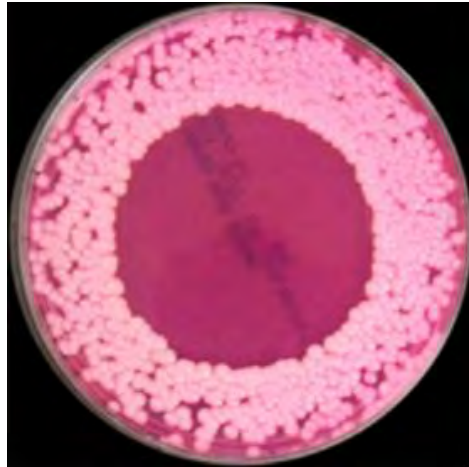


Figura 9: Colonias de *Candida* (sp) después de irradiación con Terapia Fotodinámica (Arboleda, y otros, 2014)

### 2.4.1 MECANISMO DE ACCIÓN

El mecanismo de acción de la PDT resulta de la interacción de fotones de luz visible a una longitud de onda específica con las moléculas de un fotosensibilizante. Se generan especies reactivas por la interacción entre la luz y el tejido biológico causando un estrés oxidativo. El estrés oxidativo representa un disturbio en el balance entre los pro-oxidantes (causantes del daño) y los antioxidantes, lo cual lleva a las células a la muerte. (Lyon, Moreira, Moraes, Santos, & Resende, 2011)

### 2.4.2 FOTONSENSIBILIZACIÓN

La generación de moléculas en estado excitado o activado, es decir, con exceso de energía lo cual provoca que estas sean más reactivas, es denominada fotosensibilización. Dicho proceso requiere la utilización de colorantes denominados sensibilizadores o fotosensibilizantes. (Fresnadillo, 2012)

### 2.4.3 ESTADOS EXCITADOS Y FOTSENSIBILIZACIÓN

El estado energético fundamental de cualquier molécula corresponde a su configuración o distribución electrónica de menor energía. Los estados electrónicamente excitados se forman cuando éstas absorben energía, normalmente en forma de luz. (Fig. 10). En ellos, las moléculas tienen configuraciones electrónicas diferentes y más energéticas que la del estado fundamental.

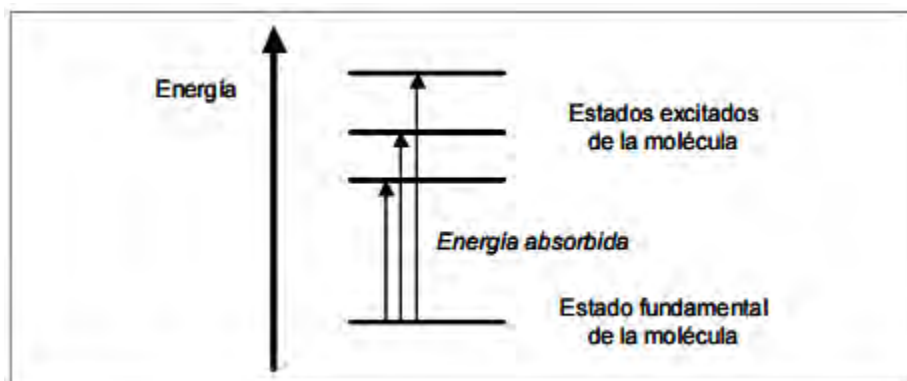


Figura 10: Estado fundamental de una molécula y estados excitados que se forman por absorción de energía a partir del estado fundamental. (Fresnadillo, 2012)

Los estados excitados o activados, a diferencia del estado fundamental, presentan configuraciones electrónicas que tienen una duración limitada, por lo que tienden a regresar a la configuración de mínima energía del estado fundamental pasado un corto lapso. Este periodo, que puede tener una duración entre los picosegundos ( $10^{-12}$  s) y los milisegundos ( $10^{-3}$  s), está caracterizado por el tiempo de vida media (o simplemente tiempos de vida) ( $T$ ), tiempo requerido para que el número de moléculas excitadas caiga a una fracción ( $1/e$ ) de su valor original. El tiempo de vida media es característico de cada estado excitado y del medio que circunda a las moléculas.

Una molécula presenta un estado energético de carácter singlete cuando sus dos electrones más externos se encuentran apareados, es decir, cuando tienen números cuánticos de espín opuestos. Así mismo, una molécula presenta un estado energético de carácter triplete cuando sus dos electrones más externos se encuentran desapareados o paralelos, esto es, cuando tienen números cuánticos de espín iguales. Normalmente, el estado fundamental de la mayoría de las moléculas presenta un carácter singlete ( $S_0$ ), mientras que los estados excitados de cualquier molécula pueden presentar carácter singlete ( $S_1$ ) y/o triplete ( $T_1$ ). (Fig. 11)

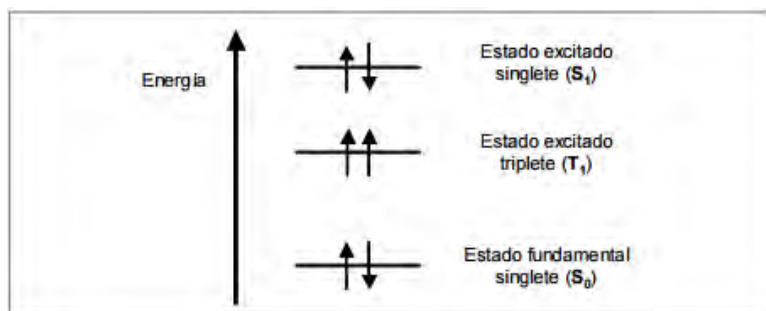


Figura 11: Estado fundamental singlete ( $S_0$ ) y estados excitados singlete ( $S_1$ ) y triplete ( $S_2$ ). Los símbolos ( $\uparrow\downarrow$ ) y ( $\uparrow\uparrow$ ) representan electrones apareados y desapareados. (Fresnadillo, 2012)

Normalmente, toda molécula que absorbe un fotón de luz puede alcanzar cualquiera de sus estados excitados. Sin embargo, las leyes de la mecánica cuántica establecen que, en ciertos casos, la probabilidad de la absorción de un fotón para alcanzar la excitación es baja, e incluso puede ser nula. Aquí es donde se recurre al proceso de fotosensibilización, en el cual se transfiere la energía de excitación electrónica de una molécula a otra.

La fotosensibilización supone que, mediante la absorción de luz, se genere el estado excitado de un colorante (fotosensibilizante), de manera que éste, durante el periodo de vida que se encuentre excitado, sea capaz de ceder o transferir su exceso de energía a otra molécula que se encuentre dentro del mismo medio circundante, obteniendo así un estado excitado de ésta. (Figs. 12, 13). La nueva molécula excitada puede reaccionar a otras especies químicas (Q) que existan dentro del medio, dando lugar a productos de reacción, o en caso de que este no sea el caso, regresará a su estado fundamental después de liberar su exceso de energía ( $\Delta E$ ) en el medio circundante (la energía puede liberarse en forma de fluorescencia, fosforescencia y en menor proporción como calor). (Fresnadillo, 2012).

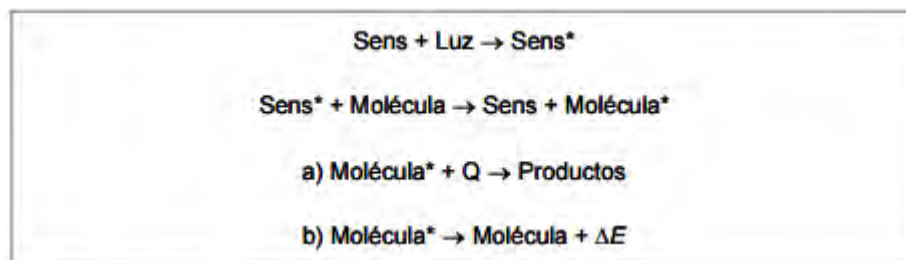


Figura 12: Representación del proceso de fotosensibilización para un fotosensibilizante (Sens). Estados excitados (\*). (Fresnadillo, 2012)



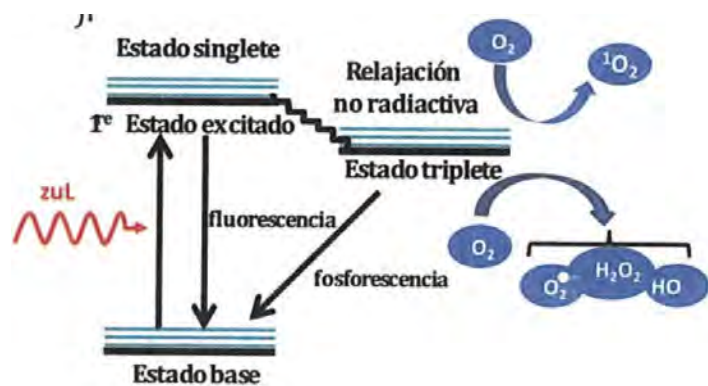


Figura 13: Diagrama de Jablonski sobre la excitación triplete (Espinosa Taxis, Vázquez Cruz, Sánchez Alonso, Pérez Munive, & Larriba Calle, 2015)

#### 2.4.4 FOTSENSIBILIZANTES

Los fotosensibilizantes son colorantes con la capacidad de absorber energía luminosa y transferirla a otra molécula. Un fotosensibilizante efectivo debería ser altamente lipofílico, con mínima o ninguna toxicidad en oscuridad, bajo potencial mutagénico y alta estabilidad química. Deben tener la habilidad para acumularse preferentemente en el tejido o célula blanco y ser rápidamente eliminados para prevenir fotosensibilización prolongada. Usualmente se ocupan ftaloocianinas, porfirinas y otros. (Tabla 1) (Moan, 1990)

Tabla 1: Fotosensibilizantes empleados de forma clínica y experimental en Terapia Fotodinámica. (Robledo, 2014)

Ftaloocianinas	- Cloroaluminumtetrasulfophtalocianina
	- Cinc II phtalocianina
	- Silicona naphthalocianina
	- Aluminum sulfonado phtalocianina
Derivados de Clorina	- Monoaspartilclorina e <sub>6</sub> (MACE)
	- Diaspartir clorina e <sub>6</sub> (DACE)
	- N-aspartil-clorina e <sub>6</sub> (Npe6)
	- Anadil-clorin e <sub>6</sub> sodium bacterioclorina a
	- Clorin e <sub>6</sub> monoetileno ácido diamino-monohidroclórico
	- Derivado anilo monoácido A de Benzoporfirina (BPD-MA; Verteporfín®)

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tin etiopurpurin</li> <li>- Meso-tetra (hidroxifenil)-clorina (Termoporfina, m-THPC; Foscan®)</li> </ul>
Porfínicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 9-Acetoxi-2, 7, 12, 17-tetra-N-propilporfícono</li> <li>- 2-Hidroxietil-7, 12, 17-tris (metoxietil) porfícono</li> <li>- 23-Carboxi-24-metoxicarbonilbenzol [2,3]-7, 12, 17-tris (metoxietil) porfícono</li> <li>- Bis-hidroxietil-7, 12-di-N-propilporfícono</li> </ul>
Porfirinas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Derivado de la hematoporfirina: Fotofrin® y sus derivados denominados Photoheme y Photosan</li> <li>- Dihematoporfirin éster/éter</li> <li>- Porfímero sódico</li> <li>- Tetrasodio-meso-tetrafenilporfirinsulfonato</li> <li>- Metalotetra-azaporfirina</li> <li>- 5,20-bis(4-sulfofenil)-10, 15-bis(2-metoxi-4-sulfofenil)-21-tioporfirina(21-tioporfirina)</li> </ul>
Precusores de Porfirinas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ácido 5-aminolevulínico</li> <li>- Ácido 5-aminolevulínico-metil, -propil, -etiléster</li> </ul>
Feoforbides	Feoforbide a, bacteriofeoforbide
Otros	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fluoresceínas (fluorescencia sódica, tetrabromfluoresceína-eosina); Antracenos (antraquinona, acridina naranja, amarilla); Hipericina; Furocumarinas (5-, 8-metoxipsolarenos); Derivados de clorofila; Purpurinas (metalopurpurina, tin-etiofurpurina SnET2); Fenotiazinas; Azul, violeta o verde de metileno; Hipocrelina; Rosa de bengala; Tetraclorosalicilinalida, Verding; Rhodamina 123, Lutetium texafirinas (Lu-Tex).</li> </ul>

Actualmente se evalúan nuevos compuestos naturales con propiedades fotosensibles. Los trabajos de (LN, y otros, 2011) donde se ve la susceptibilidad de *Candida* hacia un pigmento denominado curcumina que es fotosensible a los 408-430 nm de longitud de onda extraída de la planta *Curcuma longa* es un ejemplo de ello.

Es importante mencionar que, aunque hay un número significativo de compuestos fotosensibilizantes, solo unos cuantos han sido aprobados para su uso en seres humanos. (Mazzocco, García, & Juan, 2015)

#### 2.4.5 DOSIS DE LUZ

La cantidad de luz que se aplica en la PDT necesita ser medida y controlada para que solo tenga los efectos deseados, dado que no solo se puede aplicar la terapia con luz visible (Choi, 2012), es necesario tener en cuenta que una sobre exposición a radiaciones concretas puede desencadenar reacciones que pueden llegar a ser perjudiciales.

La dosis de luz es igual a la cantidad de energía aplicada en una superficie, lo cual puede expresarse como  $J/cm^2$ . Aquí el tiempo juega un papel muy importante, pues mientras más tiempo se tenga una fuente de luz radiando una superficie, mayor será la dosis de luz final. Por lo que podemos decir que la Dosis de luz  $J/cm^2$  es igual al flujo radiante de la fuente (W) por el tiempo de la sesión (s) entre la superficie radiada ( $cm^2$ ). La fórmula es la siguiente:

$$Dosis\ de\ luz\ (J/cm^2) = \frac{Potencia\ (W)\ por\ Tiempo\ (s)}{Área\ de\ la\ superficie\ (cm^2)} \dots (1)$$

Con un simple despeje en (1), se puede obtener la fórmula de cuánto tiempo se necesita radiar una superficie para poder obtener una dosis de luz definida. (Rodríguez Martín, 2001)

#### **2.4.6 DOSIS DE COLORANTE (FOTOSENSIBILIZANTE)**

La dosis utilizada en las pruebas de terapia fotodinámica es de 40  $\mu\text{M}$  de azul de metileno, obtenida de una solución PBS con 200  $\mu\text{M}$  del colorante. Esta solución se obtiene a partir de la fórmula de molaridad y el peso molecular del azul de metileno que es 319.85 g/mol.

Esta solución madre se diluye de 1:5 y de ese modo se obtienen 40  $\mu\text{M}$  que al combinarse en los experimentos con la muestra de hongo en 50 micro litros cada uno, esta se diluye a 20  $\mu\text{M}$ . (Spezzia Mazzoco, Torres Hurtado, Ramírez San Juan, & Ramos García, 2016)

#### **2.4.7 MUERTE CELULAR**

Para que la célula pueda mantenerse viva en el medio en que habita, debe permanecer en constante estado de homeostasis, produciendo de esta manera una respuesta adaptativa, la cual varía según el tipo, la agresividad o la duración del agente causal de algún estímulo. Dentro de las respuestas que este puede producir se encuentran la adaptación o la lesión celular, que posteriormente puede ocasionar la muerte de la célula.

La lesión celular, puede ser de dos tipos: reversible, en la cual la célula puede recobrar su integridad estructural y funcional una vez retirado el agente agresor (autofagia); e irreversible, en la cual la célula no logra producir una reparación, por lo tanto este proceso deriva en muerte celular, que se produce por: necrosis resultante de una agresión aguda y la apoptosis o muerte celular programada, realizada por agentes inmunitarios propios del organismo. (Flores, 2014) Estás pueden tener un agente causal común o en ocasiones la apoptosis suele evolucionar a necrosis y la muerte celular en el proceso de autofagia puede presentar muchas de las características de la apoptosis. (Dubin & Stoppani, 2000)

#### **2.4.8 APOPTOSIS**

La apoptosis o muerte celular programada, es un proceso en el que se eliminan células innecesarias para el organismo. Dicho proceso se encuentra regulado por el sistema inmunitario y las citoquinas del organismo.

El proceso consiste en una disminución gradual del citoplasma en la célula, a su vez se produce una condensación del núcleo, se genera una salida de electrolitos con posterior pérdida de tamaño de la célula, el retículo endoplásmico liso forma pequeñas membranas llamadas cuerpos apoptóticos, los cuales a su vez son digeridos ya sea por células cercanas o por macrófagos sin producir ningún proceso inflamatorio, esto debido a que se mantienen factores que siguen siendo identificados como propios del organismo. (Fig. 14)

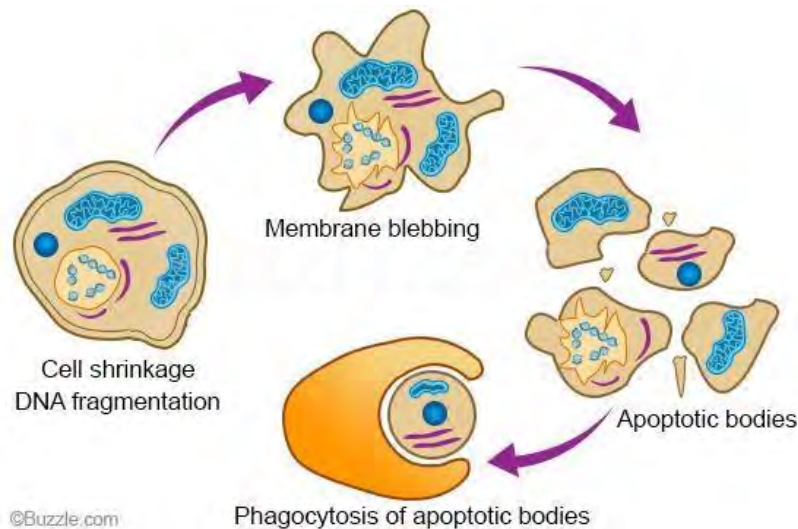


Figura 14: Proceso de Apoptosis en la célula. (Ormaza, 2015)

En el proceso de apoptosis se encuentran las siguientes estructuras:

- **Receptores de muerte:** Estas se encargan de transmitir señales de apoptosis.
- **Proteínas Bc 1-2:** Familia de proteínas relacionadas con la respuesta apoptótica, algunas de estas son proapoptóticas a diferencia de otras que son antiapoptóticas; las apoptóticas pueden actuar como sensores de daño celular.
- **Proteína P53:** Esta proteína es la que se encarga de ejecutar la apoptosis en respuesta a agentes que dañan el ADN.
- **Caspasas:** Son las principales proteínas responsables del proceso de apoptosis. (Flores, 2014)

Dentro del proceso de apoptosis se involucra la mitocondria de la célula, esta se encarga de mantener la vida celular a través de la producción de ATP (Adenosín Trifosfato) y provocar la muerte por medio de la liberación de proteínas. (Jordan, 2003)

Se sabe que la célula en ciertos ambientes genera de manera constante ROS (Reactive oxygen species, Especies Reactivas de Oxígeno), la generación excesiva de estos productos o compuestos provoca un estrés oxidativo, daño intracelular de moléculas y membranas. Esto puede llevar a la apoptosis y la detención del ciclo celular. (Toro, 2006)

#### 2.4.9 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Las moléculas (ROS), se forman a partir del oxígeno molecular ( $O_2$ ). Los ROS regulan varios procesos celulares como producción de hormonas, comunicación entre células, unión de

proteínas, por citar algunos. Sin embargo, la producción excesiva de ROS resulta nociva para los organismos ya que induce la muerte celular debido al estrés oxidativo generado. (Marquez, 2012)

#### 2.4.10 NECROSIS

Este tipo de muerte celular se considera como aquel sin signos de apoptosis o autofagia. La necrosis abarca un conjunto de cambios morfológicos consecuencia de una desnaturalización de proteínas intracelulares, lo cual afecta a la digestión de enzimas por parte de la célula, derivándose en un daño mortal con pérdida de la membrana celular y producto de este proceso se produce el derramamiento (extravasación) de su contenido.(Fig. 15) Durante el proceso de necrosis la célula suele adquirir distintos patrones de lesión que se diferencian de acuerdo a su forma de desarrollo o morfología. (Flores, 2014)



Figura 15: Representación gráfica del proceso de necrosis en la célula. (Investigación, 2014)

#### 2.4.11 AUTOFAGIA

La autofagia es un proceso de degradación celular en el cual los organelos son secuestrados en una vesícula simple o de doble membrana y liberados en el interior de un organelo degradativo, vacuola/lisosoma, para la ruptura y reciclaje de las macromoléculas resultantes. (Fig. 16)

Este proceso es esencial para mantener la homeóstasis celular, esto involucra la degradación de proteínas en ausencia prolongada de nutrientes como fuentes de energía y la remoción de organelos dañados para su posterior reposición. (Boya, 2017)

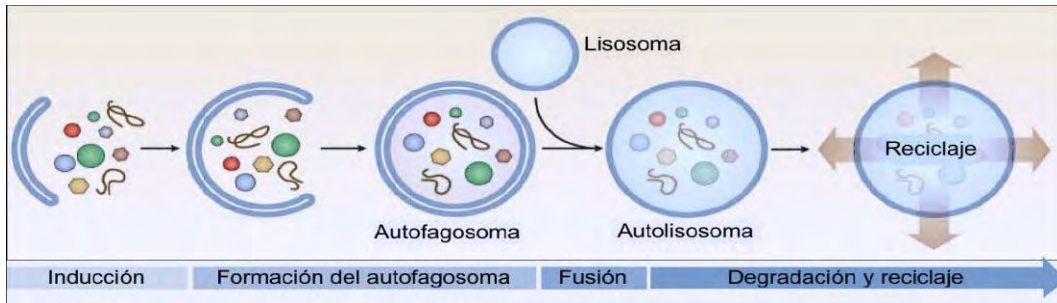


Figura 16: Proceso de Autofagia en la célula. (Boya, 2017)

## 2.4 ELEMENTOS UTILIZADOS EN LA TERAPIA FOTODINÁMICA

### 2.4.1 DIODO EMISOR DE LUZ

Un LED es un componente opto electrónico pasivo y, más concretamente, un diodo que emite luz. (Española, 1952)

Son convencionalmente utilizados como fuentes luminosas aproximadamente monocromáticas, ofreciendo las ventajas de ser compactas, durables y económicas. (Camacho, Schmid, & Vázquez, 2004) (Fig. 17)



Figura 17: Diodo Emisor de Luz. (Bernardo, 2014)

Un LED genera luz de una manera radicalmente diferente a otras fuentes luminosas, como lámparas incandescentes o las lámparas fluorescentes. En los LED's, un bajo voltaje de corriente continua circula a través de dos capas de material semiconductor, resultando en la generación de fotones de un limitado rango de frecuencias. (BBC, BBC, 2015)

El color de la luz depende del material semiconductor utilizado y del tipo de dopaje que se realice en este. Las combinaciones más comunes incluyen InGaAlP (Indio Galio Aluminio Fosforo), AlGaAs (Arseniuro de Galio y Aluminio), AlGaP (Fosforo de Aluminio y Galio). Un LED reduce su intensidad luminosa de manera gradual con el tiempo. Aun así, se estima que la vida de los dispositivos LED alcanza las 50,000 horas de funcionamiento. (Greenpeace, 2008)

## 2.4.2 LÁSER

Un láser es un dispositivo que emite luz a través de un proceso de amplificación óptica basado en la emisión estimulada de radiación electromagnética. El término “láser” se originó como un acrónimo para “amplificación de luz por emisión estimulada de radiación”. (Gould, 1959)



## CAPÍTULO III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Parte de esta sección fue elaborada en colaboración con el alumno Erick Iván Barros de la Cruz de la Licenciatura en Ingeniería en Electrónica y Telecomunicaciones, quién ha realizado de igual manera un trabajo de tesis que tiene como base la Terapia Fotodinámica.

### 3.1 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Un medio de cultivo es un sustrato o una solución de nutrientes que permite el desarrollo de microorganismos. En las condiciones de laboratorio, se debe sembrar sobre el medio de cultivo elegido las muestras en las que los microorganismos van a crecer y multiplicarse para dar colonias.

Para trabajar con el hongo *Trichophyton mentagrophytes* se realizaron medios de cultivo de agar dextrosa sabouraud, éste se distingue por ser utilizado para el cultivo de mohos y levaduras patógenas y no patógenas.

La preparación del medio requirió diluir 75 gramos de agar dextrosa sabouraud en un litro de agua destilada, se recomendó diluir en un inicio en 500 ml ya que el volumen aumenta conforme se agrega el agar y al final se tuvo más de un litro de medio.

Una vez que se tuvo el medio bien disuelto se ajustó el pH de este a 5.6, esto ayuda al mejor crecimiento de agentes fúngicos e incrementa la inhibición del crecimiento de bacterias que pudiesen contaminar el cultivo. Al realizar la medición el indicador de pH (Fig. 18) mostró una cantidad menor a 5.6, entonces se tuvo que alcanzar ese valor agregando alguna solución base (NaOH, Hidróxido de Potasio), en el caso contrario se agregó una solución ácida (HCl, Ácido Clorhídrico) para disminuirlo.



Figura 18: Medidor de pH (Servo Vendi, 2017).

Antes de vaciar el medio de cultivo este tuvo que esterilizarse, para esto se colocó en un matraz (Fig. 19), se tapó con papel aluminio y se colocó dentro de un autoclave. Dentro de este se

mantuvo por 15 minutos a una presión de 15 libras durante 15 minutos. La presión debe respetarse para no caramelizar la dextrosa del medio si se sobrepasan las 15-16 libras.



Figura 19: A) Medio de cultivo preparado para esterilizarse. B) Autoclave para esterilización. Foto en colaboración con Erick Ivan Barros de la Cruz.

El vaciado del medio se realizó dentro de un área esterilizada que puede ser una campana de flujo o una superficie limpia con algunos mecheros de alcohol colocados alrededor, como en este caso. Cada que se destapaba el matraz la boquilla debió pasarse por el fuego para descontaminarse, el contenido se vertió en las placas de Petri hasta cubrir toda su superficie (aprox. 25 ml). (Fig. 20) Al termino de esto, se colocaron las placas en un recipiente cerrado para evitar que se contaminaran y esperar a que el medio se cuajase para sembrar hongo dentro de ellas.

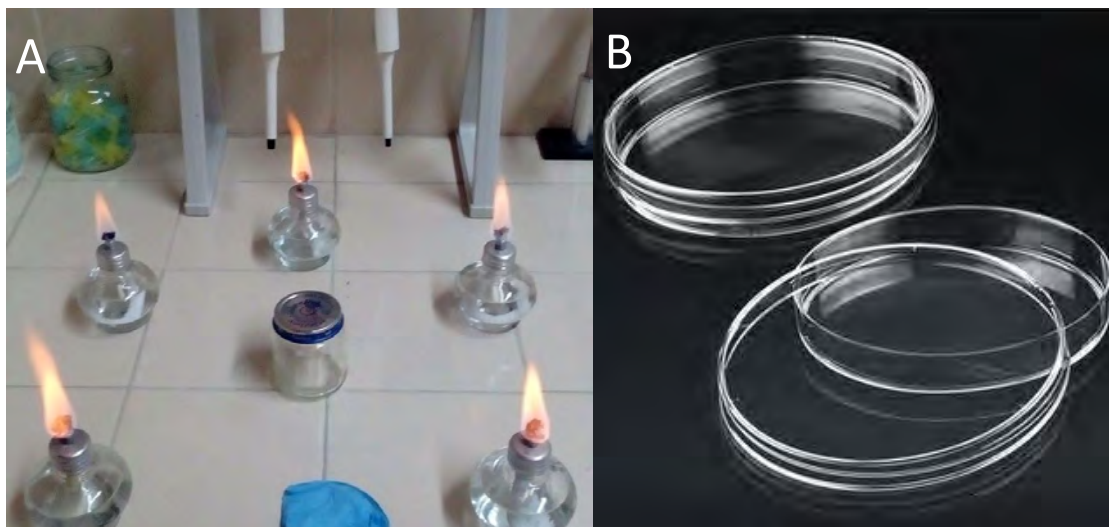
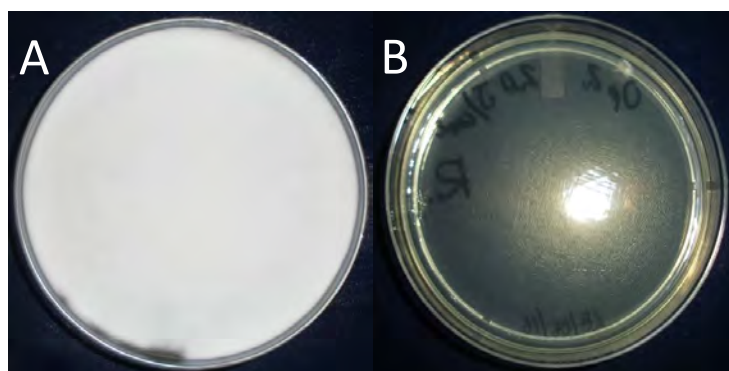


Figura 20: A) Zona esterilizada por medio de mecheros de alcohol. Foto en colaboración con Erick Iván Barros de la Cruz; B) Placas de Petri estériles.

### 3.2 INOCULACIÓN DE ESPORAS EN MEDIOS DE CULTIVO.

Una vez que se tuvieron las placas de Petri con medio de cultivo se procedió a sembrar dentro de ellas las esporas del hongo que vamos a ocupar para la PDT. Este proceso se realizó dentro de un área estéril por medio de mecheros para evitar que, si llegaran a volar esporas, estas no contaminaran el área adyacente o las mismas placas.

Por medio de un instrumento llamado asa se tomaron las esporas, antes que nada, se quemó la punta de esta en un mechero para eliminar cualquier contaminante presente en ella. Para enfriar el asa y no matar las esporas bastó con sumergirla un poco en el medio de cultivo. El hongo se encuentra más activo en la parte más externa (debido a su crecimiento radial), o micelio, de ahí se tomó la muestra y se trasladó con cuidado a la placa de Petri; es posible colocarlas de dos maneras: estrías o por punción, en esta tesis utilizamos la forma estriada. Al terminar de sembrar se quemó una vez más el asa para evitar contaminar y guardó las placas de Petri al interior de un horno con temperatura de 30° centígrados cubierto por completo para evitar el paso de luz. Esto último ayuda al mejor crecimiento de las cepas, ocurriendo esto en aproximadamente 14 días para que estas maduren. (Fig. 21)



*Figura 21: A) Placa de Petri con cepa de hongo para recolección de esporas; B) Placa de Petri con medio de cultivo para siembra de esporas.*

### 3.3 RECOLECCIÓN DE MUESTRA PARA APLICACIÓN DE PDT

La realización de una prueba de PDT requirió tomar una muestra de hongo proveniente de las cepas que se sembraron en el medio de cultivo. Para la realización de esto se tomó una placa con hongo de 14 días de crecimiento y por medio de una pipeta Accumax PRO (Fig. 22) se agregaron 10 mililitros de solución PBS (solución buffer de fosfatos)(esta solución se logró al mezclar 2015 mg de NaCl (Cloruro de Sodio), 55 mg de KCl (Cloruro de Potasio), 287.5 mg de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Fosfato Disódico) y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fosfato Monopotásico) en 250 ml de agua destilada, aumentando su pH a 7.4 y puesto en el autoclave a 15 Lb por 15 min para esterilizar) directamente sobre la placa evitando tocar el hongo con la punta (esto es para no contaminar la solución PBS del frasco mientras se coloca en la placa).

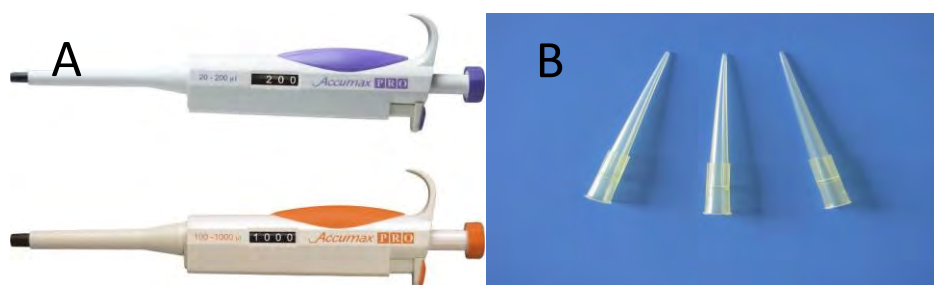


Figura 22: A) Pipeta Accumax PRO; B) Puntas utilizadas en la pipeta Accumax PRO

Una vez que tenemos los 10 mililitros en la placa, se procedió a raspar con la punta de la pipeta toda la superficie para resuspender las esporas.



Figura 23: Papel filtro.

Acabando de raspar toda la muestra, ésta se colocó dentro de un papel filtro (Fig. 23) para captar solamente las esporas que aún no germinan dentro de un frasco y trabajar de una mejor manera en el microscopio. El filtro tiende a pasar de manera muy lenta el líquido a través de él así que se debe colocar un guante completamente estéril y apretar por fuera el filtro para ayudar a que este proceso sea más rápido.

Se obtuvo una muestra del hongo deseado, pero puede que en ella se tuvieran demasiadas esporas que podrían dificultar el conteo de colonias en los resultados después de la PDT, así que por medio de una cámara de Neubauer se hizo un conteo de las esporas que pudiesen haber dentro de un mililitro de muestra a través de un microscopio de contraste de fase (Leica DMI3000 B) (Fig. 25), para determinar esta cantidad lo que se hizo fue utilizar la fórmula de la cámara de Neubauer asociada a los recuadros número 3 de ésta. (Fig. 24)

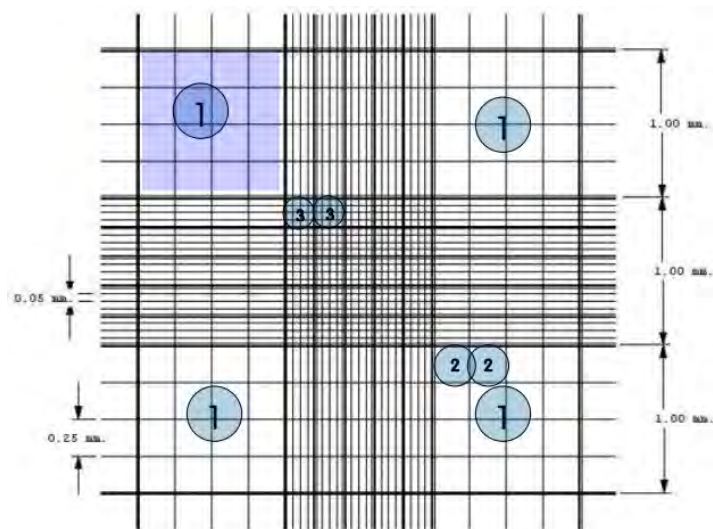


Figura 24: División de recuadros de la cámara de Neubauer. (Celeromics, 2017).

Tomando en cuenta las características de área ( $\text{mm}^2$ ) y volumen (ml) de los recuadros se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Área} = 0,2 \text{ mm} \times 0,2 \text{ mm} = 0,04 \text{ mm}^2 \dots (2)$$

$$\text{Volumen} = 0,04 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 4 \times 10^{-3} \text{ mm}^3 = 4 \times 10^{-6} \text{ ml} \dots (3)$$

Una vez obtenida la concentración de spora, se diluyó hasta obtener una concentración cercana a  $5 \times 10^5$ , se prefiere esta concentración ya que reduce significativamente la cantidad de colonias que lleguen a crecer dentro de las placas Petri, puesto que se tenían  $6.57 \times 10^6$  esporas por ml se propuso que se dividiera entre 20 dando como resultado  $3.3 \times 10^5$ . Esto dio la pauta a que por cada tanto que se pusiera de la muestra con esporas se necesitarían 19 tantos más de solución PBS. Conociendo lo anterior, se tomaron 100  $\mu\text{l}$  de la muestra y 1900  $\mu\text{l}$  de PBS los cuales se colocaron en un frasco y se revolviaron para lograr diluir nuestra muestra. Además, de que es necesario que todos los experimentos se realicen a la misma concentración.

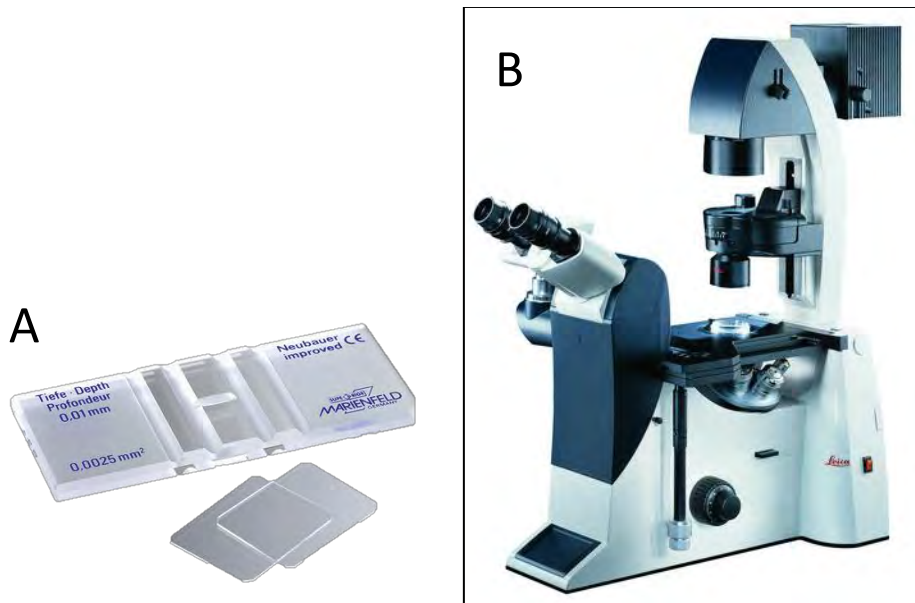


Figura 25: A) Cámara de Neubauer; B) Microscopio de Contraste de Fase Leica DMI3000B.

### 3.4 TRATAMIENTO CON TERAPIA FOTODINÁMICA

La muestra diluida que se obtuvo de la cepa se colocó junto con una solución de azul de metileno con una concentración de 40  $\mu\text{M}$  dentro de una microplaca de 96 pozos (Fig. 26), en una cantidad de 50 microlitros por cada uno. A continuación, se procedió a colocar la placa en incubación durante 30 minutos a 30° C, esto para que el fotosensibilizante penetre en las células del hongo.

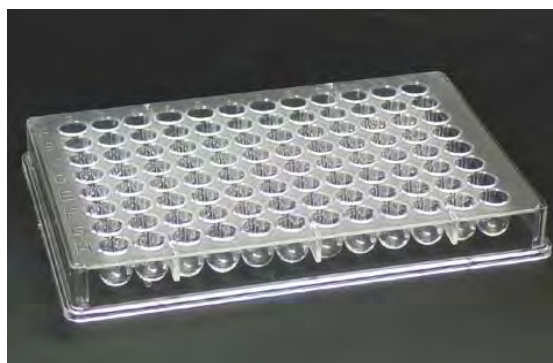


Figura 26: Microplaca de 96 pozos.

Una vez incubado el hongo, este se irradió en la microplaca durante cierto tiempo dependiendo de la cantidad de luz que quiera dosificarse a la muestra por medio de un láser He-Ne de luz roja (633 nm de longitud de onda) a una potencia de 17 mW de la marca Uniphase.

Para la realización de las irradiaciones se hizo un arreglo con el láser, un espejo para desviar el haz de luz hacia la microplaca, un objetivo de microscopio 10x para hacer más grande el haz de luz y que este abarcara por completo cada pozo de la microplaca, también se incluyó un mechero

de alcohol para mantener el área libre de contaminación y por último, se colocó alrededor de los pozos con muestra tinta china para que al momento de irradiar no se afectarán las muestras adyacentes con la luz del láser. (Fig. 27)

Para los experimentos a realizar en relación con la dosis letal media (LD50) se utilizaron diferentes cantidades de luz para irradiar la muestra de hongo, las cuales fueron desde  $10 \text{ J/cm}^2$  hasta  $100 \text{ J/cm}^2$  aumentando la cantidad de luz en  $10 \text{ J}$  por cada experimento.



*Figura 27: A) Espejo; B) Objetivo de Microscopio; C) Microplaca con muestra; D) Mechero de alcohol; E) Láser He-Ne Uniphase. Foto en Colaboración con Erick Iván Barros de la Cruz.*

Por último, se inocularon las muestras en placas de Petri estériles, que en un lapso de 3 a 4 días permitieron ver los resultados del tratamiento. De igual manera se inoculó una muestra de hongo sin tratamiento como control para efectos comparativos.

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 RESULTADOS DE APLICACIÓN DE PDT CON DISPOSITIVO LÁSER

A continuación, se muestran los resultados que se obtuvieron en las placas de Petri luego de un lapso de 3 a 4 días de incubación a 30° C. (Fig. 28-38)



*Figura 28: Cultivo de Hongo Microsporum canis sin tratamiento de PDT.*



*Figura 30: Cultivo de Hongo Microsporum Canis irradiado por láser de 633nm a una cantidad de 20 J/cm².*



*Figura 29: Cultivo de Hongo Microsporum Canis irradiado por láser de 633nm a una cantidad de 10 J/cm².*



*Figura 31: Cultivo de Hongo Microsporum Canis irradiado por láser de 633nm a una cantidad de 30 J/cm².*

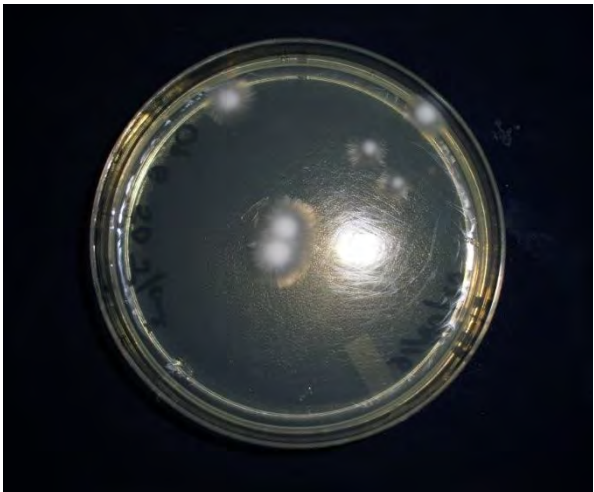




*Figura 32: Cultivo de Hongo Microsporium Canis irradiado por láser de 633nm a una cantidad de 40 J/cm<sup>2</sup>.*



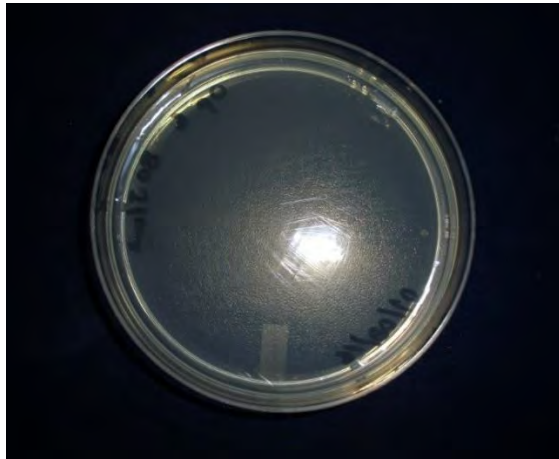
*Figura 34.: Cultivo de Hongo Microsporium Canis irradiado por láser de 633nm a una cantidad de 60 J/cm<sup>2</sup>.*



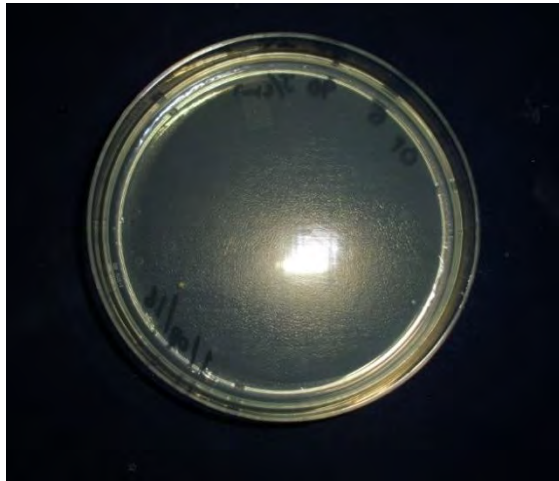
*Figura 33: Cultivo de Hongo Microsporium Canis irradiado por láser de 633nm a una cantidad de 50 J/cm<sup>2</sup>.*



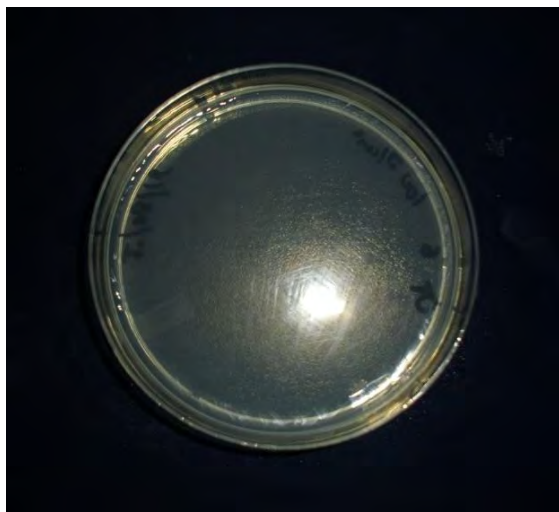
*Figura 35: Cultivo de Hongo Microsporium Canis irradiado por láser de 633nm a una cantidad de 70 J/cm<sup>2</sup>.*



*Figura 36: Cultivo de Hongo Microsporium Canis irradiado por láser de 633nm a una cantidad de 80 J/cm<sup>2</sup>.*



*Figura 37: Cultivo de Hongo Microsporium Canis irradiado por láser de 633nm a una cantidad de 90 J/cm<sup>2</sup>.*



*Figura 38: Cultivo de Hongo Microsporium Canis irradiado por láser de 633nm a una cantidad de 100 J/cm<sup>2</sup>.*

#### 4.2 CONTEO DE COLONIAS POSTERIOR A TERAPIA FOTODINÁMICA (LD50)

Una vez que se realizaron cada una de las radiaciones con diferentes cantidades de luz las placas se incubaron por 3 días y se procedió a realizar el conteo de las colonias en cada placa de Petri. Este procedimiento trata de tomar la placa de Petri de manera que la luz de una lámpara pase a través de ella haciendo que pequeños puntos blancos (colonias) puedan verse. Luego de esto se marca cada una de las colonias para no contarla al doble, si la placa cuenta con demasiadas colonias y estas se encuentran esparcidas de forma uniforme en la superficie del agar, se puede contar la mitad de la placa y al final multiplicarla esta cantidad por dos.

A continuación, se muestra una tabla en la que se han registrado los datos anteriores incluyendo la luz radiada, la cantidad de colonias en las placas Petri y el porcentaje de colonias de cada tratamiento respecto al control del hongo (placa sin tratamiento de PDT).

Tabla 2: Conteo de colonias en placas de Petri y su porcentaje respecto a la placa sin tratamiento de PDT

Sepa Tratada	Microsporium Canis (Op 6)				Conteo de Control de Hongo
	CFU Placa 1	CFU Placa 2	Promedio	Porcentaje de acuerdo al control de hongo	
10 J/cm <sup>2</sup>	920	850	885	76.20%	1160
20 J/cm <sup>2</sup>	358	318	338	29.13%	
30 J/cm <sup>2</sup>	145	22	83.5	7.10%	
40 J/cm <sup>2</sup>	2	1	1.5	0.12%	
60 J/cm <sup>2</sup>	3	0	1.5	0.12%	
70 J/cm <sup>2</sup>	4	1	2.5	0.21%	
80 J/cm <sup>2</sup>	0	0	0	0.00%	
90 J/cm <sup>2</sup>	0	0	0	0.00%	
100 J/cm <sup>2</sup>	0	0	0	0.00%	

Tomando en cuenta la tabla anterior se puede estimar la dosis letal media de luz que se debe dosificar para eliminar el 50% del hongo, graficando la dosis de luz contra el porcentaje de hongo que quedaba en las placas después del tratamiento. (Fig. 39)

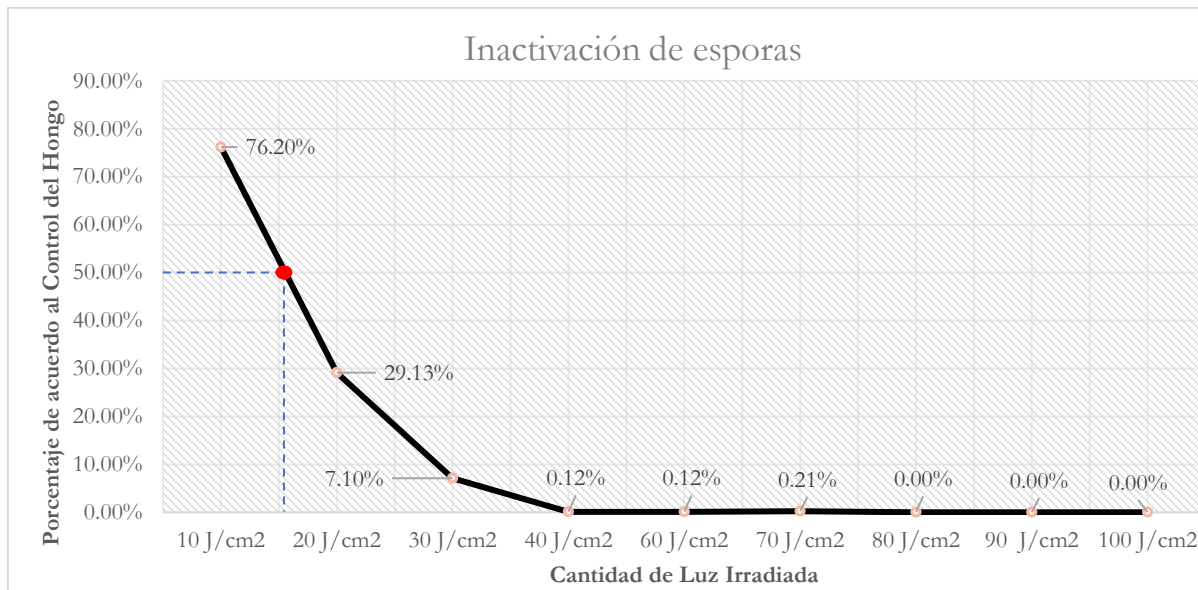


Figura 39: Gráfico que representa la inactivación de esporas conforme a la cantidad de luz irradiada.

Si se observa atentamente el gráfico y se hace una extrapolación, aproximadamente se está eliminando el 50% de las esporas con 16 J/cm<sup>2</sup> de luz con una concentración de 40 μM de fotosensibilizante.

### 4.3 PRUEBA EN TERAPIA FOTODINÁMICA UTILIZANDO LOS DIODOS EMISORES DE LUZ

Antes de diseñar un dispositivo para terapia fotodinámica a partir del diodo emisor de luz en sustitución del láser, se hicieron algunas pruebas para saber si éste era factible para la terapia fotodinámica.

En primera instancia se intentaron utilizar LED's convencionales (superflux o tipo piraña) (Fig. 40), ya que son de los más baratos en el mercado.



Figura 40: LED Superflux (tipo piraña).

En primer lugar, hubo que medir la intensidad luminosa de estos LED's ya que si esta es mucho menor que la potencia que entrega el láser no resultaría factible su utilización para el diseño del dispositivo. Por medio de un luxómetro (Fig. 41) es que se logró medir la potencia luminosa en Watts que entrega cada LED. En este caso la potencia luminosa que se midió en cada LED superflux fue de 0.26 mW, por lo tanto, si se toma en cuenta que el láser utilizado en los experimentos anteriores entrega una potencia de 17 mW concluimos que este tipo de LED's no es factible para su uso en la terapia fotodinámica. Si se tratara una muestra con este tipo de LED's tendríamos que irradiarla por aproximadamente 3 horas.

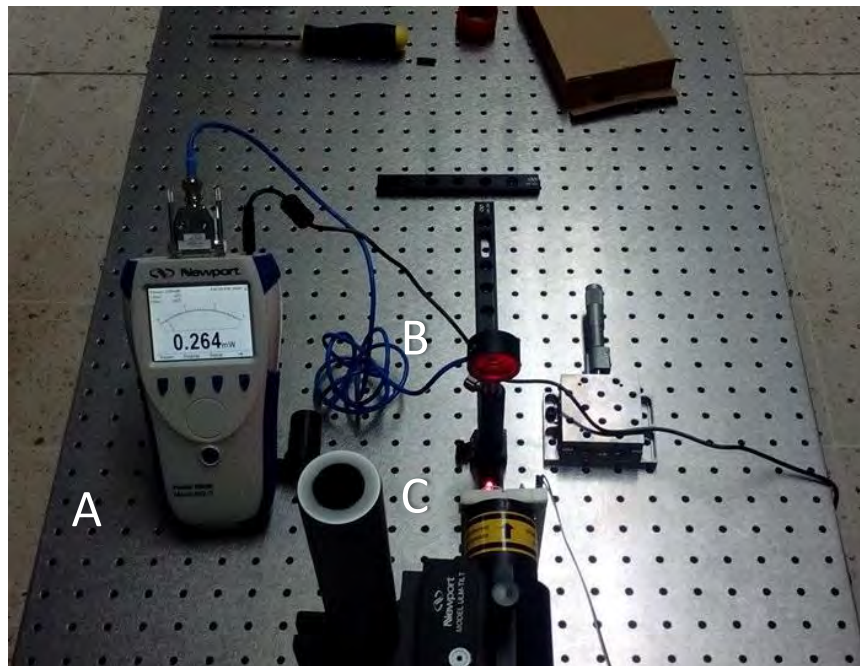


Figura 41: A) Detector del Luxómetro; B) Fotodetector; C) LED. Foto en colaboración con Erick Iván Barros de la Cruz.

Entonces, lo que se pensó para solucionar este problema de falta de luminosidad fue usar LED's de alta potencia (Fig. 42). Este tipo de dispositivos tienen un diseño más completo y debido a esto brindan una mayor luminosidad, en la medición con el luxómetro se obtuvieron 25.1 mW. El uso más común de estos LED's se aprecia comúnmente en presentaciones exteriores arquitectónicas para brindar efectos de color. El precio de estos LED's definitivamente no es igual o menor que el de los anteriores, pero, si es considerablemente más barato que un láser. Estos LED's se encuentran con un valor aproximado de \$50.00 pesos mexicanos cada uno.



Figura 42: LED de alta potencia.

Lo que se hizo a continuación fue diseñar un circuito con LED's de potencia (Fig. 43-44) para realizar pruebas en el laboratorio y tener así una prueba concreta de que en realidad son factibles para la terapia fotodinámica. Lo primero que se hizo fue una simulación del circuito.

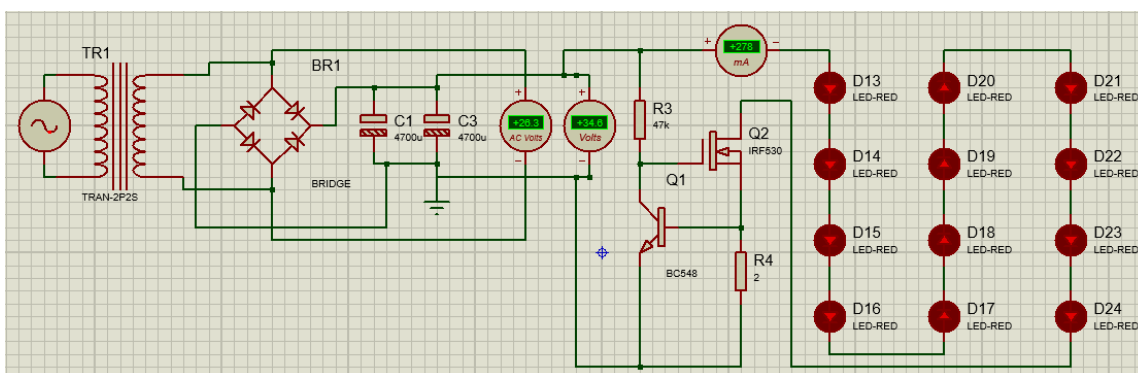


Figura 43: A) Diagrama de circuito de LED's en serie interconectados al driver. Foto en colaboración con Erick Iván Barros de la Cruz

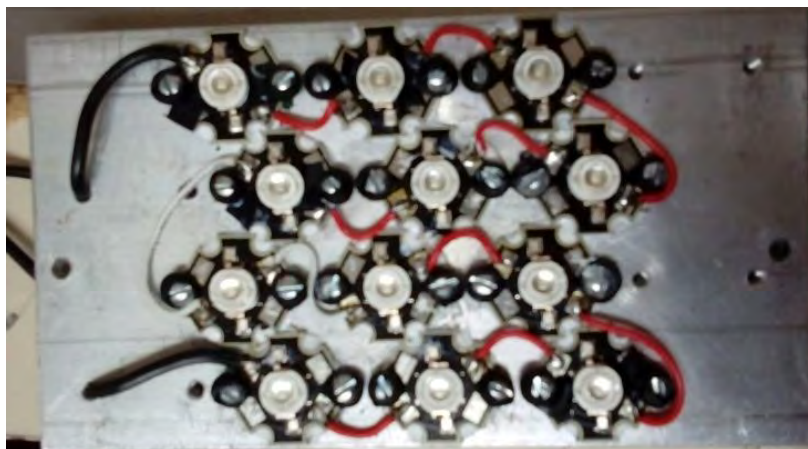


Figura 44: Circuito de LED's físico. Foto en colaboración con Erick Iván Barros de la Cruz.

Para la alimentación de estos LED's que necesitan cada uno de 2-2.6V para encender se utilizó un driver, el cual se encarga de administrar una corriente estable al circuito (300mA aproximadamente), ya que, si esta corriente varía, entonces la potencia luminosa también lo haría. Ya que los LED's no trabajan con corriente alterna sino con corriente continua, el driver transforma la tensión adaptándola al voltaje que se necesita y la corriente de alterna a continua para alimentar correctamente el circuito.

Ahora lo que se prosiguió a realizar fueron pruebas en muestras de hongo, esta vez *trichophyton mentagrophytes* y el experimento fue por medio de repeticiones de irradiación. Lo anterior consiste en realizar una irradiación con cierta cantidad de luz sobre la muestra y después de poner a incubar esta muestra por media hora a 30° C para después volver a irradiar con la misma cantidad de luz las veces que se consideren necesarias. Las pruebas realizadas con el dispositivo LED fueron de Control de Luz (sin colorante) a 20 J/cm<sup>2</sup>, 5 J/cm<sup>2</sup> ambas con 2 y 3 repeticiones.

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos del conteo de esporas en las muestras de hongo tratadas después de 2 a 3 días de incubación. Se incluyen los conteos de Control de luz, de las muestras tratadas con Terapia Fotodinámica y el Control de hongo. Este último no fue tratado de ninguna forma y se utilizó solo como referencia.

Tabla 3: Conteo de Colonias en terapia fotodinámica con LED's

Conteo de Colonias (Op 2)				FECHA	
Tipo de Control	Cantidad de Luz Irradiada				
	20 J/cm <sup>2</sup>		5 J/cm <sup>2</sup>		
	2 Rep.	3 Rep.	2 Rep.	3 Rep.	
Control de Luz	1900	1428	1500	836	07-jul-17
PDT	11	49	1046	14	
	Sin irradiación de Luz				
Control de Hongo	2196				

Se analizaron los datos y se apreció claramente como la Terapia Fotodinámica aplicada por medio de un dispositivo LED funciona de manera aceptable. Como se ve en la tabla anterior, la muestra que no fue tratada de ninguna manera tuvo un conteo de colonias de 2196 unidades; los mejores resultados obtenidos con el tratamiento de Terapia Fotodinámica a 20 J/cm<sup>2</sup> con 2 repeticiones y 5 J/cm<sup>2</sup> con 3 repeticiones presentaron 11 y 14 UFC; se inactivaron las esporas del hongo en un 99.37% y en un 99.5% respectivamente.

En los resultados que se obtuvieron en la estimación de la dosis letal media con el dispositivo láser, el más acercado a los obtenidos con el dispositivo LED fue la irradiación con 70 J/cm<sup>2</sup> dejando 4 colonias de 1160 unidades que tuvo su Control de Hongo, eliminando en un 99.79% el hongo.

Ahora, si se analiza esto en cuestiones del tiempo se tiene que cada irradiación tarda:

- 5 J/cm<sup>2</sup>: 1 min. 4 s. rad. x 3 rep + 1hr 30 min de incubación = 1 hr 33 min 12 s.

- $20 \text{ J/cm}^2$ : 4 min 14 s. rad. x 2 rep. + 1 hr de incubación = 1 hr. 8 min. 28 s.
- $70 \text{ J/cm}^2$ : 22 min rad. x 1 rep. + 30 min incubación = 52 min. (láser)

Para dosis letal media:

$16 \text{ J/cm}^2$  (láser): 5 min 1 s rad + 30 min incubación = 35 min 1 s.

$16 \text{ J/cm}^2$  (LED): 3 min 25 s rad + 30 min incubación = 33 min 25 s.

Se observa que de entre las irradiaciones con LED's si hay una diferencia considerable de tiempo al final del tratamiento, por lo tanto, sería más beneficioso utilizar los  $20 \text{ J/cm}^2$  en 2 repeticiones a pesar de que es mayor tiempo de irradiación. Después de esto se aprecia que ahora el tratamiento realizado con el dispositivo láser con  $70 \text{ J/cm}^2$  de luz abarca un tiempo de solo 52 minutos. La diferencia de tiempo con el dispositivo LED a  $20 \text{ J/cm}^2$  no es muy grande y siendo así el uso de este es muy viable. Se puede notar como con una sola exposición con el dispositivo se tarda mucho menos que con un láser, lo cual reduce la invasividad del tratamiento en cuanto a la densidad de luz irradiada, reduciendo al mínimo posibles efectos secundarios en personas sensibles.

Ahora bien si analizamos los datos para una misma cantidad de luz en ambos dispositivos basados en la dosis letal media antes calculada tenemos que el tiempo de radiación se reduce de 5 min 1 s a 3 min 25 s, representando una disminución de tiempo de aproximadamente el 32%.

La figura 45 representa las placas de Petri que se irradiaron para las pruebas anteriores. En primera se observa la placa que contiene el Control de Hongo sin ningún tratamiento seguida de las pruebas que se realizaron con 5 y  $20 \text{ J/cm}^2$ . Como se aprecia el tratamiento funciona con el dispositivo LED como se había mencionado anteriormente.



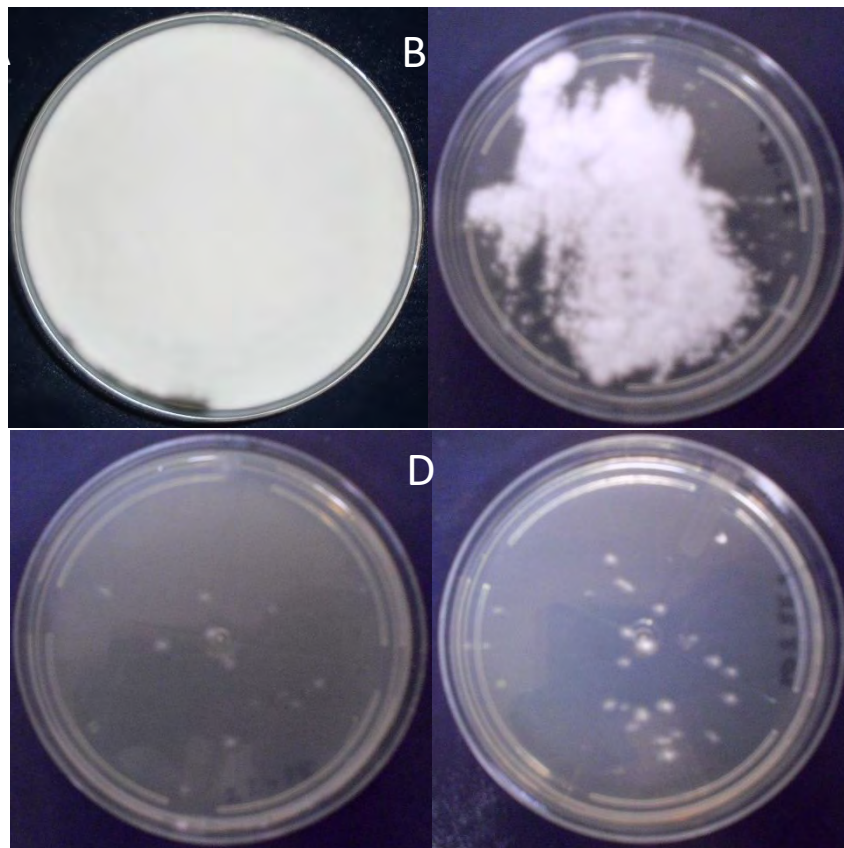


Figura 45: A) Control de Hongo (referencia); B) Muestra tratada a  $5 \text{ J/cm}^2$  con 2 repeticiones; C) Muestra tratada a  $5 \text{ J/cm}^2$  con 3 repeticiones; D) Muestra tratada a  $20 \text{ J/cm}^2$  con 2 repeticiones. Foto en colaboración con Erick Iván Barros de la Cruz.

## CONCLUSIONES

- Se obtuvo a partir de experimentos realizados con el dispositivo láser que la dosis letal media para muestras de *Microsporum Canis* y *Trichophyton Mentagrophytes*, es de aproximadamente 16 J/cm<sup>2</sup> con azul de metileno como fotosensibilizante a una concentración de 40 µM.
- Se logró apreciar la optimización de la terapia fotodinámica en hongos dermatofitos siendo el uso del LED mucho más viable que el láser al realizar la comparación de los tiempos de terapia para la dosis letal media entre ambos, obteniendo una reducción de tiempo de irradiación del 32%.

## TRABAJO FUTURO

Un dispositivo sencillo ha podido realizar un gran cambio en un ámbito de salud y eso resulta bastante importante ya que de esta manera más personas podrán acercarse a estos métodos nuevos para tratar múltiples afecciones. La creación de un dispositivo dirigido hacia la terapia in vivo sería un gran avance en el futuro, con LED's aún más pequeños que permitiesen la flexibilidad del mismo para adaptarse a los tejidos a tratar dependiendo de la afección. Es vital seguir haciendo investigaciones de este tipo, para mejorar en la ciencia, pero también para ayudarnos como seres humanos.

## GLOSARIO

**Adenosín trifosfato:** Es un nucleótido fundamental en la obtención de energía celular.

**Agua destilada:** Es aquella a la que se le han eliminado las impurezas e iones mediante destilación.

**Apoptosis:** Es una vía de destrucción o muerte celular programada o provocada por el mismo organismo, con el fin de controlar su desarrollo y crecimiento.

**Asa:** Es un instrumento de laboratorio que consta de una base que puede estar hecha de platino, acero, aluminio y un filamento que puede ser de nicromo, tungsteno o platino que termina o en un arito de 5 mm o en punta.

**Autoclave:** Aparato para esterilizar por vapor que consiste en un recipiente cilíndrico, de paredes resistentes; metálico, y con cierre hermético.

**Cámara de Neubauer:** Es un instrumento utilizado en medicina y biología para realizar el recuento de esporas y células en un medio líquido, que puede ser; un cultivo celular, sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, etc.

**Cepa:** Conjunto de organismos de la misma especie, colonia o cultivo, que tienen las mismas propiedades.

**Citoquinas:** Son los agentes responsables de la comunicación intercelular, proteínas que regulan la función de las células que las producen sobre otros tipos celulares.

**Colonias:** Término utilizado ampliamente como un grupo de seres vivos organizados bajo bases cooperativas.

**Desnaturalización:** Cambio estructural de las proteínas o ácidos nucleicos, donde pierden su estructura nativa y su óptimo funcionamiento.

**Distribución electrónica:** Indica la manera en la cual los electrones se estructuran o se modifican en un átomo de acuerdo con el modelo de capas electrónicas.

**Dopaje:** Proceso intencional de agregar impurezas en un semiconductor extremadamente puro (intrínseco) con el fin de cambiar sus propiedades eléctricas.

**Epoxi:** Una resina epoxi o poliepóxido es un polímero termoestable que se endurece cuando se mezcla con un agente catalizador o endurecedor.

**Especies Reactivas de Oxígeno (ROS):** Son un producto secundario frecuente de multitud de vías de obtención de energía y para el metabolismo de nutrientes.

**Fotosensibilizante:** Agente que tiene una respuesta exagerada a la luz. Este reacciona de manera distinta con diferentes longitudes de onda.

**Hifa:** Red de filamentos cilíndricos que conforman la estructura del cuerpo de los hongos multicelulares.

**Homeostasis:** Conjunto de fenómenos de autorregulación, conducentes al mantenimiento de una relativa constancia en la composición y las propiedades del medio interno de un organismo.

**Hongos dermatofitos:** Son hongos filamentosos que afectan a la epidermis y anejos cutáneos. La principal característica de ellos es que invaden las capas superficiales queratinizadas de la piel, pelos y uñas.

**Irradiar:** Despedir o emitir radiaciones luminosas, térmicas, magnéticas, etc.

**LED:** Un LED (del acrónimo inglés LED, light-emitting diode: ‘diodo emisor de luz’) es un componente optoelectrónico pasivo y, más concretamente, un diodo que emite luz.

**Lipofílico:** Capaz de disolver lípidos, ser disuelto en ellos o absorberlos.

**Lipófilo:** Que tiene tendencia a combinarse con los lípidos.

**Macrófagos:** Los macrófagos son un tipo de glóbulo blanco que se comen el material extraño en el cuerpo.

**Macromolécula:** Es una molécula de alto peso molecular conformada por subunidades más pequeñas como lo pueden ser ácidos nucleicos, proteínas o carbohidratos.

**Medio de cultivo:** Un medio de cultivo es una técnica de laboratorio que consta de un gel o una solución que contiene los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de pH y temperatura, el crecimiento de virus, microorganismos, células, tejidos vegetales o incluso pequeñas plantas.

**Micelio:** El micelio es la masa de hifas que constituye el cuerpo vegetativo de un hongo.

**Necrosis:** Es el patrón morfológico de la muerte patológica de un conjunto de células o de cualquier tejido en un organismo vivo, provocada por un agente nocivo que causa una lesión tan grave que no se puede reparar o curar.

**Nucleótidos:** Los nucleótidos son un tipo de biomoléculas formadas por la unión de una base nitrogenada, una pentosa y una molécula de ácido fosfórico.

**Oncosis:** Muerte celular accidental con hinchamiento.

**pH:** Coeficiente que indica el grado de acidez o basicidad de una solución acuosa.

**Pipeta:** Tubo de vidrio, generalmente graduado y más ancho por la parte central, usado en los laboratorios para transvasar pequeñas porciones de líquido

**Solución PBS:** Es una solución tampón o buffer empleada en la investigación biológica, bioquímica y de inmunología diagnóstica. Es una solución acuosa y salina que contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio.

## REFERENCIAS

- Arboleda, A., Miller, D., Cabot, F., Taneja, M., Aguilar, M., Alawa, K., . . . Parel, J. (2014). Assessment of rose bengal versus riboflavin photodynamic therapy for inhibition of fungal keratitis isolates. *PubMed*.
- Arias, A. G. (2008). ¿Qué es la luz? *Latin-American Journal of Physics Education*, 1-3.
- BBC. (10 de Octubre de 2012). *Mundo*. Obtenido de El invento que cambió la historia de la luz: [http://www.bbc.com/mundo/noticias/2012/10/121010\\_tecnologia\\_led\\_bombillo\\_50anos\\_luz\\_dp](http://www.bbc.com/mundo/noticias/2012/10/121010_tecnologia_led_bombillo_50anos_luz_dp)
- Bernardo, A. (8 de Octubre de 2014). *Blog Think Big*. Obtenido de <http://blogthinkbig.com/nobel-de-fisica-2014/>
- Bluetooth*. (2017). Obtenido de Bluetooth SIG: <https://www.bluetooth.com/what-is-bluetooth-technology/how-it-works>
- Bonifaz, A. (2000). *Micología Médica Básica*. México: Mendez Editores.
- Boya, P. (Enero de 2017). *Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular*. Obtenido de Autofagia: cómo nuestras células se reciclan: <http://www.sebbm.es/web/es/divulgacion/acercate-nuestros-cientificos/1878-patricia-boya-enero-2017-autofagia-como-nuestras-celulas-se-reciclan-especial-premio-nobel-de-fisiologia-o-medicina-2016>
- Camacho, M. L., Schmid, W. A., & Vázquez, J. C. (2004). *Caracterización de la Responsividad Espectral de LEDs como detectores ópticos en el alcance de 20°C a 75°C*. México.
- Ceballos, J. C. (5 de Enero de 2014). *Optica por la Cara*. Obtenido de Efectos nocivos de la luz sobre la retina: <http://opticaporlacara.com/2014/01/efectos-nocivos-luz-retina/>
- Celeromics. (2017). *Celeromics*. Obtenido de <http://www.celeromics.com/es/resources/Technical%20Notes/neubauer-chamber-cell-concentration/formula-camara-neubauer-concentracion-1.php>
- Daniell, M. D., & Hill, J. (1991). A history of photodynamic therapy. *ANZ Journal of Surgery*, 61(5), 340-348.
- Deal Extreme*. (2017). Obtenido de <http://www.dx.com/p/jy-mcu-arduino-bluetooth-wireless-serial-port-module-104299#.WW-O3XvbvIU>
- Doménech, A. (s.f.). *Universidad de las Islas Baleares*. Obtenido de Medios de Cultivo: <http://www.uib.cat/depart/dba/microbiologia/seminarios/1%20Medios%20de%20cultivo.pdf>

- Doutel, F. (18 de Agosto de 2015). *Xataka*. Obtenido de Guía del Arduinomaniaco: todo lo que necesitas saber sobre Arduino: <https://www.xataka.com/especiales/guia-del-arduinomaniaco-todo-lo-que-necesitas-saber-sobre-arduino>
- Dubin, M., & Stoppani, A. O. (2000). Muerte Celular Programada y Apoptosis-Función de las Mitocondrias. *Medicina (Buenos Aires)*, 375-386.
- Española, R. A. (1952). *Real Academia Española*. Perlado Páez.
- Espinosa Taxis, A. P., Vázquez Cruz, C., Sánchez Alonso, M., Pérez Munive, M., & Larriba Calle, G. (s.f.).
- Fernández, B. A., Varillas, R. B., García, C. H., Hernández, J. A., & Vázquez, C. R. (2010). *El láser, la luz de nuestros tiempos*. Salamanca: Isabel Arias Tobalina.
- Flores, A. G. (2014). Lesión y Muerte Celular. *Revista de Actualización Clínica Investiga*.
- Fresnadillo, D. G. (2012). Fotosensibilización y el sensibilizador: síntesis, propiedades y limitaciones. En D. G. Fresnadillo, *Solar Safe Water*. Madrid.
- Gayosso, P. M. (24 de Abril de 2017). *Facultad de Medicina, UNAM*. Obtenido de Dermofitosis: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/dermatofitosis.html>
- Gould, R. G. (1959). "The LASER, Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation". *The Ann Arbor Conference on Optical Pumping*, 128.
- Greenpeace. (2008). *Greenpeace*. Obtenido de Greenpeace Argentina: <http://www.greenpeace.org/argentina/Global/argentina/report/2008/4/leds.pdf>
- Investigación, A. d. (14 de Julio de 2014). *Taper-Equipamentos de Precisión Científica*. Obtenido de Apoptosis Temprana: Anexina V: <http://www.taper.pt/apoptosis-temprana-anexina-v/>
- iWonder. (10 de Enero de 2015). *BBC*. Obtenido de BBC Mundo: [http://www.bbc.com/mundo/noticias/2015/01/150102\\_iwonder\\_led\\_salvar\\_mundo\\_finde\\_dv](http://www.bbc.com/mundo/noticias/2015/01/150102_iwonder_led_salvar_mundo_finde_dv)
- LN, D., AC, P., AP, R., IL, B., CA, C., DP, J., . . . C, K. (2011). Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *PubMed*.
- Lyon, J. P., Moreira, L. M., Moraes, P. C., Santos, F. V., & Resende, M. A. (2011). Photodynamic therapy for pathogenic fungi. *Mycoses*.
- Marín, E. (2008). Escuchando la luz: breve historia y aplicaciones del efecto fotoacústico. *Latin-American Journal of Physics Education*, 212-214.
- Marquez, A. M. (2012). La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las mitocondrias de *Saccharomyces*. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 97-103.

- Mazzocco, T. S., García, R. R., & Juan, J. C. (2015). La terapia fotodinámica en las infecciones fúngicas. En A. P. Taxis, C. V. Cruz, M. P. Alonso, M. C. Munive, & G. L. Calle, *Temas Selectos de Microbiología Médica y Molecular*. Puebla.
- McDonagh, A. F. (2001). Phototherapy: from ancient Egypt to the new millennium. *Journal of Perinatology*, 21(S1), S7.
- MCI Electronics. (2016). Obtenido de Arduino.cl.
- Moan, J. (1990). Properties for optimal PDT sensitizers. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 5(3-4), 521-524.
- Müller, A. (2010). Los orígenes del láser. *Investigación y Ciencia*, 3.
- Ordoñez, J. L. (2012). Espectro electromagnético y espectro radioeléctrico. En J. L. Ordoñez, *Manual Formativo de ACTA* (págs. 17-31).
- Ormaza, M. (24 de Mayo de 2015). Obtenido de <http://chela0897.wixsite.com/marcelaormaza>
- Palacio, A. d., Garau, M., & Cuétara, M. S. (2002). Tratamiento Actual de las dermatofitosis. *Revista Iberoamericana de Micología*, 68-71.
- Robledo, H. (2014). Historia de la Terapia Fotodinámica. En H. Robledo, *Terapia Fotodinámica-Terapia Láser Baja Intensidad*. Vigo.
- Rubio, M., Rezusta, A., Tomás, J. G., & Ruesca, R. B. (1999). Perspectiva micológica de los Dermatofitos en el ser humano. *Revista Iberoamericana de Micología*.
- Servo Vendi. (2017). Obtenido de <https://www.servovendi.com/es/ph-metro-medidor-de-ph-digital-del-suelo-para-las-plantas-ph-98108-soil.html>
- Toro, G. D. (2006). Muerte celular programada. Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular. *Actas Hispanoamericanas de Patología*, 1-6.
- Universidad de Buenos Aires. (Agosto de 2016). *Microbiología e Inmunología*. Obtenido de <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioMedios.htm>
- Yurkanis Bruice, P. (2008). *Química Orgánica*. México: Pearson Educación.