



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Medición de temperatura por medio de sensores FBG en esferoides 3D de cáncer de mama expuestos a radiación microondas

Nicolas Ospina Mendivelso

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Eléctrica y Electrónica
Bogotá D.C., Colombia
2023

Medición de temperatura por medio de sensores FBG en esferoides 3D de cáncer de mama expuestos a radiación microondas

Nicolas Ospina Mendivelso

Tesis o trabajo de grado presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:
Magíster en Ingeniería - Automatización Industrial

Directora:

PhD. Margarita Varón Durán

Codirector:

PhD. Cristian Andrés Triana Infante

Línea de Investigación:

Tecnologías Fotónicas

Grupo de Investigación:

Electrónica de Altas Frecuencias y Telecomunicaciones (CMUN)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Eléctrica y Electrónica

Bogotá D.C., Colombia

2023

Tu memoria vivirá para siempre en los corazones de quienes te conocieron y te amaron. Tus seres queridos. Que tu alma allá arriba nos ayude a permanecer siempre unidos en tu memoria. Por quienes no están y con quienes me hubiese gustado compartir este momento Plutarco, Elizabeth, Cleotilde, Nestor, Andrés.

Agradecimientos

Quiero dedicar esta sección para agradecer a todas las personas que me han acompañado a lo largo de estos años de formación en la Universidad, ya que lo que soy hoy, es el resultado de todos los aportes que han hecho en mi vida.

Primero quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi directora de tesis Margarita Varón y a mi codirector Andrés Triana, por su continuo apoyo, motivación, orientación y en especial por su paciencia cuando me sentía vacilante, gracias por creer en mí. Además, me gustaría agradecer a Camilo Cano y a Edwin Pineda por la confianza, las discusiones perspicaces y sus inteligentes comentarios que resultaron siendo valiosos consejos, por su apoyo durante todo el período de estudio y especialmente por su paciencia durante el proceso de experimentación y redacción.

También agradezco a las personas del laboratorio CMUN, EMC e INMUBO: Jorge, Sebastián, Felipe, Carlos, Hector, Victoria y Sandra por sus acertados comentarios, sugerencias críticas, preguntas difíciles y por su apoyo invaluable durante este proceso.

Por último, a toda mi familia y amigos, especialmente a mis padres Eduardo y Elizabeth por su apoyo incondicional, amor, comprensión, esfuerzo, paciencia y excelente educación que me han brindado a lo largo de mi vida. Todo lo que soy es gracias a ustedes.

Resumen

Medición de temperatura por medio de sensores FBG en esferoides 3D de cáncer de mama expuestos a radiación microondas

En este documento se presentan los resultados de la caracterización de la temperatura en esferoides de cáncer de mama expuestos a tratamientos de hipertermia (HT). La hipertermia es una alternativa a los tratamientos convencionales para el cáncer, como lo son la cirugía, la radioterapia (RT) y la quimioterapia (QT), que tienen potenciales repercusiones funcionales, estéticas, emocionales y psicológicas que impactan significativamente en la calidad de vida de los pacientes.

Para conseguir las temperaturas requeridas en los tratamientos de hipertermia se hizo uso de dos sistemas de radiación por microondas. Un esquema de alta potencia basado en el uso de un magnetrón extraído de un horno microondas y otro de potencia moderada basado en el uso de amplificadores de estado sólido. El sujeto de prueba fueron esferoides de la línea celular MCF-7.

Para la medición de la temperatura fue diseñada una placa de cultivo prototipo con sensores FBGs embebidos en sus pozos. Esta placa se construyó haciendo uso de modelado por deposición fundida y se caracterizó bajo condiciones controladas de laboratorio.

Como resultado de las pruebas se obtuvieron curvas de caracterización de temperatura ante distintos esquemas de radiación. El desempeño de los sensores no se vio alterado al estar expuestos a un ambiente de fuerte interferencia electromagnética lo que permitió poder llevar a cabo mediciones en tiempo real. Basados en los resultados obtenidos con este sistema de caracterización, se proponen modificaciones para el mejoramiento de su desempeño.

Palabras clave: Hipertermia, Sensores FBG, Cáncer, Temperatura, Microondas, Cultivos celulares, Esferoides celulares.

Abstract

Temperature Measurement via FBG Sensors in 3D Breast Cancer Spheroids Exposed to Microwave Radiation

The following document presents the results of temperature characterizations in breast cancer cell spheroids exposed to hyperthermia (HT) treatments. Hyperthermia is an alternative to conventional treatments of breast cancer; treatments such as surgery, radiotherapy (RT) and chemotherapy (QT), which have potential functional, esthetic, emotional and psychological repercussions that significantly impact the quality of life of patients.

To achieve an increase in temperature for HT treatments, two microwave radiation systems were used. A high power setup based on the use of a magnetron extracted from a microwave oven and another of moderate power based on the use of solid state amplifiers. The test subject were spheroids from the MCF-7 cell line.

For the temperature measurement, a prototype culture plate was designed with FBGs sensors embedded in its wells. This plate was constructed using fused deposition modeling and characterized under controlled laboratory conditions.

As a result of the tests, temperature characterization curves were obtained under different radiation schemes. The performance of the sensors was not affected by being exposed to an environment of strong electromagnetic interference, which allowed measurements in real-time. Based on the results obtained with this characterization system, modifications are proposed to improve its performance.

Keywords: Hyperthermia, FBG sensors, Cancer, Temperature, Microwaves, Cell cultures, cellular spheroids.

Lista de Figuras

1-1. Gráfico de la distribución de los distintos tipos de cáncer presentes en los nuevos casos reportados en el año 2020.	2
3-1. Placa de cultivo MatTek de 24 pozos con sensores FBG.	13
3-2. Proceso de fabricación de la placa de cultivo prototipo	14
3-3. Secciones de la placa de cultivo prototipo.	15
3-4. Placa de cultivo prototipo construida.	16
3-5. Esquema de funcionamiento de un sensor FBG.	18
3-6. Cambios en la longitud de onda de Bragg, debido a variaciones de temperatura o presión en la fibra.	19
3-7. Espectro de reflexión del arreglo de sensores FBG	20
3-8. Efecto de las deformaciones en las mediciones en las mediciones de λ_B	22
3-9. Esquemático del montaje empleado para la caracterización de los sensores embebidos en la placa prototipo	22
3-10. Foto del montaje empleado para la caracterización de los sensores embebidos en la placa prototipo	23
3-11. Curvas de Temperatura T y cambios en la Longitud de Onda de Bragg $\Delta\lambda_B$ para la caracterización del arreglo de sensores FBG embebidos en la placa de cultivo prototipo.	24
3-12. Curvas Temperatura T y cambios en la Longitud de Onda de Bragg $\Delta\lambda_B$ para la caracterización de un sensor FBG a la intemperie.	25
3-13. Gráfica de $\Delta\lambda_B$ vs ΔT para el sensor de 1544 nm.	28
3-14. Resultados de la función de calibración para el sensor de 1539 nm.	29
3-15. Resultados de la función de calibración para el sensor de 1544 nm.	30
3-16. Resultados de la función de calibración para el sensor de 1549 nm.	30
3-17. Resultados de la función de calibración para el sensor de 1554 nm.	31
4-1. Esquemático del montaje del sistema de radiación por microondas basado en el uso de un magnetrón.	34
4-2. Montaje para el sistema de radiación por microondas basado en el uso de un magnetrón	34
4-3. Esquemático del sistema de radiación por microondas basado en el uso de un AES.	36

4-4. Montaje para el sistema de radiación por microondas basado en el uso de un AES	36
4-5. Imágenes obtenidas con el microscopio óptico invertido de algunos esferoides preparados para las pruebas de hipertermia.	37
4-6. Proceso de traslado de los esferoides desde las placas de cultivo Corning Costar de baja adherencia de 96 pozos a tubos de micro-centrífuga	38
4-7. En la incubadora los esferoides alcanzan una temperatura de 37 °C, después de esto son trasladados a la placa multipozo prototipo.	39
4-8. Prueba de calentamiento con magnetrón a una distancia de exposición de 26 cm	40
4-9. Prueba de calentamiento con magnetrón a una distancia de exposición de 20 cm	41
4-10. Prueba de calentamiento con AES a una distancia de exposición de 20 cm . .	43
4-11. Prueba de calentamiento con AES a una distancia de exposición de 15 cm . .	44
4-12. Prueba de calentamiento con AES a una distancia de exposición de 8 cm . .	45
4-13. Imágenes obtenidas con el citómetro de flujo de dos esferoides sometidos a radiación	47
4-14. Imagen obtenida con el citómetro de flujo de un esferoide del grupo de control en el que no se realizaron pruebas de hipertermia.	47
4-15. Resultados de muerte celular y porcentaje de Citotoxicidad de cada grupo de esferoides expuestos a los tratamientos de radiación.	49
A-1. Esquema del circuito requerido para alimentar al magnetrón	53
A-2. Launcher empleado para adaptar la antena del magnetrón al utilizado en las pruebas de radiación	54
A-3. Principales componentes de un amplificador de estado sólido AES	55
A-4. Esquema de conexión para adaptar la salida SMA del AES a guía de onda .	56

Lista de Tablas

3-1. Especificaciones importantes del arreglo de sensores FBG	20
3-2. Escalones de temperatura y duración en minutos empleados en la caracterización de los sensores.	24
3-3. Media, desviación estándar y tamaño de cada uno de los escalones obtenidos en la prueba de caracterización para cada uno de los sensores.	27
3-4. Compilado de los resultados de las gráficas de dispersión e histogramas de cada uno de los sensores	31
4-1. Parámetros de estudio de las tres pruebas del sistema de hipertermia con magnetrón a una distancia de 26 cm.	41
4-2. Parámetros de estudio de las tres pruebas del sistema de hipertermia con magnetrón a una distancia de 20 cm.	42
4-3. Parámetros de estudio de la prueba del sistema de hipertermia con AES a una distancia de 20 cm.	43
4-4. Parámetros de estudio de la prueba del sistema de hipertermia con AES a una distancia de 15 cm.	44
4-5. Parámetros de estudio de las dos pruebas del sistema de hipertermia con AES a una distancia de 8 cm.	45

Contenido

Agradecimientos	vii
Resumen	ix
Lista de figuras	xi
Lista de tablas	xiii
1. Introducción y justificación	2
1.1. Objetivo general	5
1.2. Objetivos específicos	5
2. Marco teórico	6
2.1. Alternativas a los tratamientos convencionales para el cáncer	6
2.2. Mecanismos de calentamiento	7
2.3. Sensores empleados para el monitoreo de temperatura en aplicaciones médicas	8
2.4. Modelos empleados para la prueba y validación de tratamientos de Hipertermia	10
2.5. Sensores embebidos en estructuras impresas en 3D	11
3. Implementación de las placas de cultivo con sensores FBG embebidos	13
3.1. Principio de funcionamiento de los sensores FBG	17
3.2. Caracterización en temperatura de la placa de cultivo con los sensores embebidos	19
3.2.1. Importancia de la caracterización	19
3.2.2. Toma de datos	23
3.2.3. Procesamiento de datos	26
4. Caracterización del proceso de hipertermia en esferoides de cáncer de mama.	33
4.1. Descripción de los montajes experimentales	33
4.1.1. Sistema de radiación con magnetrón	33
4.1.2. Sistema de radiación con amplificador de estado sólido (AES)	35
4.2. Proceso de preparación de los esferoides para las pruebas de hipertermia	37
4.3. Medición de los cambios de temperatura obtenidos en las pruebas de hipertermia	39
4.3.1. Pruebas llevadas a cabo en el sistema de radiación utilizando un mag-	
netrón	40
4.3.2. Pruebas llevadas a cabo en el sistema de radiación utilizando un AES	42

4.4. Resultados de la muerte celular producto de los tratamientos de hipertermia	46
5. Conclusiones y recomendaciones	50
5.1. Conclusiones	50
5.2. Trabajo futuro	51
A. Anexo: Explicación fuentes de microondas	52
A.1. El Magnetron	52
A.1.1. Principio de funcionamiento	52
A.2. Amplificador de estado sólido AES	54
B. Anexo: Código implementado en Python	57
Bibliografía	62

1. Introducción y justificación

En Colombia para una población total de 51 109 158 personas, durante el año 2020 el número de nuevos casos de cáncer fue de 113 221. Por otra parte, se reportaron 54 987 muertes a causa de esta enfermedad, dentro de los tipos de cáncer más comunes se encuentra el cáncer de mama con más de 15 509 casos; lo que representa el 14 % de la población afectada en ese año, a este le sigue el cáncer de próstata con el 13 %, el colorrectal con el 9 %, el de estómago con un 7 % y finalmente el de pulmón con el 6 %. Esto de acuerdo con las cifras entregadas por el observatorio nacional del cáncer [1].

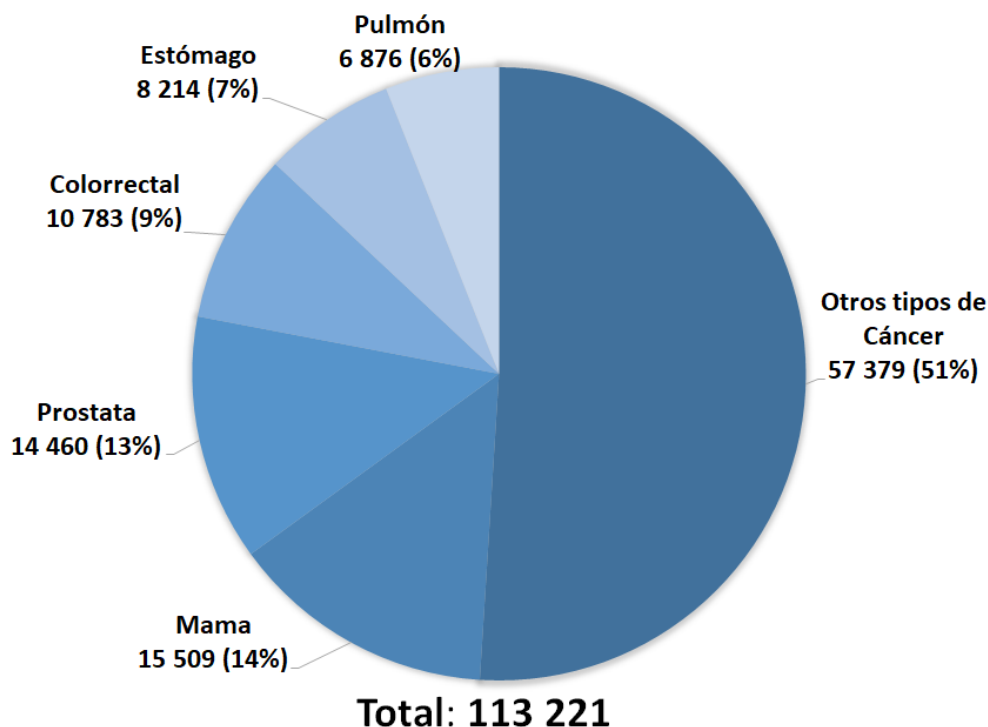


Figura 1-1.: Gráfico de la distribución de los distintos tipos de cáncer presentes en los nuevos casos reportados en el año 2020.

Dentro de las formas más habituales en Colombia para tratar el cáncer se encuentra la cirugía, la terapia por radiación (RT) y la quimioterapia (QT) [2, 3, 4, 5]. La cirugía se encuentra limitada por las habilidades del cirujano y la ubicación del tumor. Por otra parte la radioterapia se encuentra limitada por la máxima dosis de radiación que pueden tolerar los tejidos adyacentes al tumor. Adicionalmente, la muerte celular no se da de manera

instantánea, pudiendo durar semanas e incluso meses. Todo esto sin contar los efectos secundarios como: las telangiectasias, edemas, fibrosis y náuseas [6]. Finalmente la quimioterapia puede presentar una serie de efectos secundarios como lo son la nefrotoxicidad, desórdenes en la sangre, fatiga, pérdida de cabello, náuseas y vómito [7]. Todos los problemas mencionados anteriormente son causados por la falta de selectividad al tratar los tumores cancerígenos. Aunque estos tratamientos presenten resultados satisfactorios al destruir o retrasar el crecimiento del cáncer, estos conllevan una afectación de las áreas sanas circundantes.

Existe un tratamiento adicional conocido como la Hipertermia (HT), la cual consiste en elevar la temperatura en un área del cuerpo, en un rango que varíe de los 41 a los 48 °C. Este incremento en la temperatura es capaz de sensibilizar los tumores, por lo tanto se considera que la HT es un coadyuvante para la QT y la RT. En consecuencia el uso de la HT en conjunto con los tratamientos mencionados anteriormente puede reducir el tiempo de exposición o incluso la cantidad de dosis que son empleadas durante estas terapias [7, 8]. Estudios clínicos han demostrado que el uso combinado de la HT con la RT presentan un mejor desempeño en cohortes de pacientes de cabeza y cuello, mama, cuello uterino y melanoma [9] a diferencia de solo considerar tratamientos de RT.

La cuantificación de los efectos biológicos producidos es fundamental para la prescripción de la dosis del tratamiento de HT y la predicción de la respuesta que tendrá el área afectada [10]. Para lograr este objetivo, es importante desarrollar un modelo de daño celular preciso para caracterizar el proceso de muerte celular en diversas condiciones térmicas, lo que implica la necesidad de desarrollar instrumentos que permitan obtener una medición precisa de la temperatura.

El método seleccionado en este trabajo para lograr HT de manera local consiste en el uso de campos electromagnéticos en el rango de las microondas. Las fuentes de energía de microondas pueden perturbar los dispositivos de medición electrónicos y producir fenómenos de auto-calentamiento, resultando en lecturas de temperatura erróneas [11]. Debido a lo anterior, para medir la temperatura fueron usados sensores ópticos basados en Redes de Difracción de Bragg (FBGs). Estos sensores no se ven afectados por los campos electromagnéticos y permiten tomar medidas en tiempo real [12, 13].

En otros trabajos se ha propuesto la cuantificación de la respuesta biológica, basándose en datos de supervivencia de cultivos celulares clonogénicos 2D [14, 9, 15] y se han obtenido muchos otros modelos matemáticos [16, 17, 18]. Sin embargo, esos cálculos sobre los efectos biológicos de la HT no tienen en cuenta la dinámica del retraso o reducción del crecimiento tumoral después del tratamiento, entre otros mecanismos de muerte celular inducida [10]. Los esferoides tumorales son agregados 3D avasculares que brindan una mejor aproximación del comportamiento celular, imitando el microambiente fisiológico de los tumores in vivo y

proporcionando gradientes de oxígeno, nutrientes y productos de desecho. Por lo tanto, brindan un modelo que permite el estudio de diferentes tratamientos, considerando la dinámica de crecimiento inducida en la población celular [10]. En este trabajo para los diferentes tratamientos de hipertermia se utilizan esferoides de la línea celular de adenocarcinoma de mama MCF7.

En este proyecto se hizo uso de la impresión 3D para la construcción de gran parte de las estructuras requeridas para la prueba experimental, las piezas resultantes al no ser metálicas, no presentan reflexión o dispersión de energía de microondas [19]. Además, permiten desarrollar rápidamente alternativas a las estructuras de monitoreo de cultivos celulares convencionales. Estas alternativas son de bajo costo, personalizables y fáciles de usar en pruebas de laboratorio, además permiten la integración de sensores para monitorear fenómenos de interés que ocurren en los cultivos [20, 21].

Este trabajo tiene como objetivo evaluar la temperatura inducida en esferoides de cáncer de mama expuestos a un sistema de HT por microondas mediante el uso de sensores ópticos tipo FBG. El presente documento está organizado de la siguiente manera:

El segundo capítulo contiene un marco teórico de lo que son los tratamientos térmicos y sus efectos macroscópicos sobre las células y tumores cancerosos. Adicionalmente de habla de los mecanismos de calentamiento y los sensores empleados para el monitoreo de temperatura en aplicaciones médicas. Finalmente se presentan los modelos empleados para la validación de los tratamientos y los requisitos que deben tener las estructuras encargadas de alojar los cultivos celulares. El tercer capítulo presenta la implementación de las placas de cultivo con sensores FBG embebidos, describiendo el principio de funcionamiento de los sensores empleados y la caracterización en temperatura de la placa prototipo. El cuarto capítulo resume la descripción del montaje experimental, así como la preparación de los esferoides y su consecuente exposición ante dos esquemas de hipertermia por medio de dos fuentes de radiación microondas. Adicionalmente en este capítulo se explican cada uno de los montajes experimentales realizados y se dan los resultados de cada caso. En el último capítulo se presentan las conclusiones que derivaron del desarrollo del trabajo y se proponen algunos trabajos futuros.

1.1. Objetivo general

Evaluar la temperatura inducida en esferoides de cáncer de mama expuestos a un sistema de hipertermia por microondas mediante el uso de sensores ópticos tipo FBG.

1.2. Objetivos específicos

- Diseñar y construir el montaje experimental requerido para la toma de mediciones de temperatura.
- Diseñar e implementar placas de cultivo celular que integren sensores de temperatura ópticos tipo FBG.
- Caracterizar la variación de la temperatura en las pruebas de calentamiento de los cultivos celulares por medio de sensores FBG y realizar un análisis de los resultados obtenidos.

2. Marco teórico

2.1. Alternativas a los tratamientos convencionales para el cáncer

En conformidad con el trabajo de Sharma [7], el uso de calor con fines terapéuticos es un método tradicional que proviene desde épocas antiguas y ha venido presentando un aumento de popularidad desde el siglo XIX como tratamiento contra el cáncer, optimizándose en el siglo XXI, sin embargo, no se ha implementado del todo debido a la falta de tecnologías de medición de la temperatura.

En ocasiones, el mecanismo básico de la terapia térmica es controvertido debido a la falta de una comprensión completa de los efectos locales causados por la elevación de la temperatura en las células individuales. Todos los tratamientos térmicos se basan en elevar la temperatura de una parte del cuerpo o todo en su conjunto por encima de su temperatura normal durante un periodo de tiempo definido. El aumento de la temperatura a nivel celular provoca cambios en la elasticidad de los tejidos, la velocidad del flujo sanguíneo, la síntesis de proteínas, la disociación y la inactividad de las células desde minutos hasta varias horas o días [7].

Es muy importante comprender los diferentes mecanismos involucrados en la muerte celular inducida por los incrementos en la temperatura, los cambios a nivel celular que está genera y los diferentes mecanismos disponibles al momento de calentar estos grupos celulares y sus áreas circundantes.

La magnitud del gradiente de temperatura es el factor principal que clasifica los tratamientos térmicos y sus efectos macroscópicos sobre las células y tumores cancerosos en tres categorías [8]:

Tratamiento diatérmico: Este consiste en calentar tejidos y órganos desde la temperatura corporal estándar hasta alcanzar los 41 °C. Este cambio en la temperatura provoca el aumento del flujo sanguíneo además de un incremento de la velocidad de difusión de los biofluidos a través de las membranas celulares, no obstante las células siguen conservando su homeóstasis [8].

Tratamiento por hipertermia (HT): Para este se requiere poder generar un incremento de temperatura de manera local en un rango entre los 41 a los 48 °C este proceso se describe como clínicamente relevante donde se destaca que una comprensión completa del mecanismo que actúa a nivel celular en este rango de temperaturas está aún lejos de alcanzarse [8].

Este rango de temperaturas a nivel celular trae consigo un daño en la membrana, por lo tanto las células quedan aisladas e inmovilizadas, inhabilitando a su vez su capacidad de reparación y proliferación. Por otra parte este incremento de temperatura potencia la oxigenación del tumor y en este caso el oxígeno molecular O_2 es un potente radiosensibilizador, no obstante a temperaturas superiores a 42 °C, la vasculatura del tumor se daña, lo que provoca una disminución del flujo sanguíneo y por ende menos oxigenación lo que volvería al tumor radioresistente de allí la importancia de tener un mecanismo preciso para la medición de la temperatura en los tratamientos de hipertermia. [22].

Tratamiento térmico irreversible: Este incluye todos los tratamientos que aumentan la temperatura del tumor por encima de los 48 °C durante un tiempo relativamente corto. En este rango de temperaturas el efecto de la temperatura sobre las células/tejidos es drástico e irreversible [8].

En este proyecto se empleó la Hipertermia debido a la susceptibilidad que presentan las células cancerígenas sometidas a estrés por calor lo que es benéfico en tratamientos conjuntos con QT y RT, además de que la HT puede llevarse a cabo de manera focalizada haciendo uso de radiación microondas [23].

2.2. Mecanismos de calentamiento

En los tratamientos de hipertermia existen distintos métodos de calentamiento como lo son: calentamiento por microondas, cuyas frecuencias de operación oscilan entre los 433 a 2450 MHz; ondas de radio entre los 100 kHz a los 150 MHz; ultrasonido entre los 1 MHz y los 3 MHz; perfusión, donde la sangre del paciente es removida, calentada y bombeada de nuevo hacia la extremidad u órgano en conjunto con drogas para el cáncer; uso de nanopartículas; terapia fototérmica y terapias de calentamiento por medio de radiadores infrarrojos, entre otros [24, 25]. Entre todos los mencionados anteriormente, un tipo prometedor de técnicas de HT se llama hipertermia focalizada por microondas. En ésta se hace uso de una matriz de antenas de microondas para iluminar un tejido de manera que es posible guiar y enfocar las ondas electromagnéticas de manera que la energía pase al tumor [26, 27], lo que permite realizar una terapia de alta eficiencia y alta precisión sin afectar a otros tejidos sanos [26, 28].

La interacción entre el campo electromagnético y el medio puede explicarse en términos de la corriente de conducción, la polarización dieléctrica y la magnetización, sin embargo, debido

a que los tejidos son esencialmente no magnéticos solo se tienen en cuenta los dos primeros fenómenos [25].

Las microondas interactúan con la materia a nivel microscópico a través de sus átomos constituyentes, el campo eléctrico ejerce una fuerza en las cargas lo que resulta en un desplazamiento de deriva que es impuesto sobre los iones provocando un movimiento que se impone sobre su movimiento térmico aleatorio original, por consiguiente aparece una corriente de conducción en el tejido. Por otra parte, el campo eléctrico también interactúa con las moléculas polares del tejido causando pequeños desplazamientos y una reorientación con respecto a su posición de equilibrio ante la ausencia de un campo [25, 29].

Al incrementar la frecuencia, a las moléculas más grandes se les dificulta seguir los campos electromagnéticos que cambian rápidamente. Así que, macroscópicamente los efectos de las microondas sobre la materia están bien descritos por las cuatro ecuaciones de Maxwell en conjunto con las propiedades electrodinámicas de la materia. Las cuales son la permitividad eléctrica ϵ , la permeabilidad magnética μ y la conductividad eléctrica σ . Para el caso de los tejidos los mecanismos de absorción de la energía microondas se encuentran dominados por el comportamiento que posee el agua [25, 29].

Las microondas como se mencionó anteriormente permiten que los átomos giren, fenómeno que se conoce como excitación rotacional. En el caso de los dipolos eléctricos hace que estos se muevan frenéticamente. Lo interesante es que cuando estos dipolos hacen parte de materiales dieléctricos, las microondas los calientan [29]. Los tumores tienen una mayor conductividad eléctrica y, por lo general pueden absorber una mayor energía de microondas a comparación con los tejidos normales circundantes, lo que facilita que el efecto de las microondas se concentre en el tumor [28].

2.3. Sensores empleados para el monitoreo de temperatura en aplicaciones médicas

Gassino [19] abordó los distintos sensores disponibles en tareas de ingeniería con la finalidad de determinar cuáles son los más apropiados para el monitoreo de temperatura en procesos de ablación térmica, que aunque difiere de la HT es de utilidad para conocer qué tipo de sensores son los más apropiados para usar en entornos médicos. En este trabajo se destaca que los sensores metálicos delgados como lo son los termopares o las sondas pt100 son aprovechados debido a su facilidad de uso, bajo costo y simpleza al momento de la interrogación, además de que poseen un rendimiento metrológico adecuado. Sin embargo, para el campo de la medicina en los tratamientos que involucran radiación electromagnética para el calentamiento de los tejidos u órganos, la presencia de componentes metálicos en los sensores puede traer efectos

indeseados entre los cuales sobresalen: la reflexión o dispersión de la energía microondas que no permiten un calentamiento uniforme, fenómenos de autocalentamiento o también voltajes y corrientes inducidas en las partes metálicas del sensor que pueden alterar el valor de las mediciones.

Por otra parte, los sensores ópticos no presentan las anteriores desventajas, sin embargo su empleabilidad depende del tipo de técnica que se utilice para la medición de la temperatura [19]:

OTDR (Optical Time Domain Reflectometry): Los sensores basados en OTDR no pueden ser usados en aplicaciones médicas debido a su resolución espacial la cual es típicamente de 40 cm, un tamaño mucho más grande que la extensión del área a tratar en un tratamiento de HT, la cual ronda en el orden de unos pocos centímetros [19].

Por esto uno de sus usos es el monitoreo de estructuras civiles [30], por ejemplo, como sensores de temperatura distribuidos para la evaluación de las temperaturas de fraguado del concreto, pudiendo ser efectivo en distancias de hasta 20 km con una resolución espacial de 5 a 15 m.

OFDR (Optical Frequency Domain Reflectometry): Los sensores basados en OFDR aunque poseen una buena resolución espacial, del orden de 1 milímetro, buena precisión en la temperatura, por lo general 0.1 °C, y tasas de adquisición rápidas, hasta los 100 Hz, tienen el inconveniente de ser demasiado costosos además de que su montaje es complicado debido a la necesidad de fibras de referencia [19].

Debido a su resolución espacial y al hecho de ser un sensor distribuido se ha evaluado su uso en el desarrollo de prótesis con la finalidad de imitar la propiocepción del miembro original [31].

Termometría de Fluorescencia: Estos hacen uso de dopantes de tierras raras, aunque son prometedores solo permiten el monitoreo superficial, esto inhabilita su uso en órganos profundos [19].

El uso de materiales dopados como sensores de temperatura se basa en la capacidad de estos materiales de emitir fotones después de ser iluminados con luz y en el hecho de que esta transmisión de luz es dependiente de la temperatura, entre los materiales usados destacan el Praseodimio (Pr) y el Neodimio (Nd) [32].

FBGs (Fiber Bragg Gratings): Los sensores basados en redes de difracción de Bragg presentan un esquema de interrogación sencillo, donde usualmente solo se requiere una fibra óptica con una rejilla de Bragg incorporada y un instrumento de interrogación. Estos sensores poseen una buena resolución espacial, del orden de milímetros y tasas de adquisición de hasta 10 kHz [19]. Debido a su tamaño se ha propuesto el uso de sensores FBGs embebidos en sondas quirúrgicas con la finalidad de monitorear la temperatura

del hígado en procesos de ablación láser [33], ablación por radiofrecuencia [34, 35] y crioablación [36]. También han sido empleados en tareas de termometría para tratamientos de HT donde el diámetro de la fibra óptica era mucho menor si se compara con las sondas Bowman habitualmente utilizadas [37]. Los sensores FBG han sido probados en fantasmas por medio de catéteres de termometría, estos poseen espacios para la fibra óptica, una antena intersticial y una sonda Bowman de referencia. La fibra poseía 10 sensores FBG localizados a intervalos de 5 mm lo que permitía obtener mediciones de temperatura en una longitud de 5 cm, a diferencia de lo que sucedía con la sonda Bowman, donde está debía ser desplazada hacia adentro y hacia afuera del catéter para mapear la distribución de temperatura [37]. Adicionalmente la fibra fue recubierta con un polímero que poseía un coeficiente de expansión térmico mayor que el de la sílica, material del que se encuentra compuesta la fibra, esto permitía incrementar el estrés térmico ejercido sobre el sensor lo que aumentaba su sensibilidad [37].

Por lo descrito anteriormente en el trabajo de Gassino [19] y por trabajos que se han realizado previamente para la medición de temperatura en fantasmas expuestos a radiación microondas [38, 13] se opta por el uso de sensores FBG para la medición de temperatura en este proyecto.

2.4. Modelos empleados para la prueba y validación de tratamientos de Hipertermia

Existe poca información sobre el proceso dinámico de muerte celular inducida por calor y en qué medida las diferencias en los factores micro-ambientales y la distribución del ciclo celular contribuyen al aumento observado de la resistencia al calor de los tumores. Entender el funcionamiento de estos mecanismos es necesario para la predicción de la respuesta y la planificación de los tratamientos oncológicos [10]. A continuación se presentan los modelos que por lo general se usan para evaluar tratamientos de hipertermia:

Fantomas: Una alternativa para llevar a cabo pruebas de tratamientos es el uso de fantasmas. Un fantoma es toda construcción tangible-material o teórica-matemática, que se emplea especialmente en el área de la física médica con la finalidad de evaluar el comportamiento que esta estructura presenta al interactuar con una determinada forma de energía. Estas estructuras imitan características de interés de la muestra original, por ejemplo sus propiedades dieléctricas como la conductividad y la permitividad [39, 40]. El problema del uso de fantasmas es que estos al no poder emular los efectos ni las dinámicas biológicas existentes en una muestra real pueden alterar la percepción que se tiene sobre los procesos de calentamiento y muerte celular presentados en procesos de hipertermia [10].

Cultivos clonogénicos 2D: También se ha propuesto la cuantificación de los efectos biológicos producidos por la HT y la RT a partir del estudio de datos de supervivencia de células clonogénicas, en este tipo de pruebas se evalúa la capacidad que tienen las células tumorales para multiplicarse y formar colonias después de haber sido tratadas con un agente citotóxico como lo puede ser un fármaco, los tratamientos por radiación y los tratamientos térmicos. [10, 41].

Sin embargo, la cuantificación de los efectos biológicos mencionados anteriormente, no tienen en cuenta la dinámica del retraso o la contracción del crecimiento tumoral generada por los diferentes mecanismos de muerte celular inducidos por los tratamientos de HT y RT [10].

Esferoides celulares 3D: Una alternativa al problema de la geometría mencionada anteriormente es el uso de esferoides tumorales los cuales poseen una estructura 3D. La principal diferencia con los cultivos clonogénicos 2D radica en que permiten proporcionar gradientes de oxígeno, nutrientes y productos de desecho, además de que permiten la interacción entre las células y su matriz extracelular. Todo lo anterior permite una mejor estimación de la dinámica del crecimiento del tumor tras un proceso de HT [10].

Por lo descrito anteriormente en este proyecto se llevaron a cabo pruebas de radiación microondas en esferoides tumorales de la línea celular MCF-7.

2.5. Sensores embebidos en estructuras impresas en 3D

La aparición de la impresión 3D y de las facilidades de prototipado que esta brinda hacen posible el desarrollo rápido de alternativas a las infraestructuras de monitoreo de cultivos celulares convencionales. Estas alternativas son de bajo costo, personalizables y fáciles de usar en laboratorios biológicos, lo que brinda nuevas posibilidades para la investigación médica y biológica además del diagnóstico clínico [20].

Los sistemas de cultivo celular tridimensionales son capaces de reproducir mejor los complejos micro-ambientes celulares, además de las complejas relaciones que se producen en tejidos u órganos por lo que constituyen un sistema más preciso para el estudio de organismos vivos in vitro. Paralelamente, la impresión 3D puede usarse para el diseño y fabricación de andamios de cultivo celular tridimensionales con la finalidad de integrar en ellos sensores que permitan monitorear fenómenos de interés que se presenten en los cultivos. [20]. Las estructuras impresas en 3D para el uso en cultivos celulares deben cumplir con los siguientes requisitos:

Biocompatibilidad y resistencia a la biodegradación: El sustrato del cultivo celular debe tener propiedades biocompatibles que no interfieran con la evolución del cultivo, dentro de los polímeros biocompatibles destacan el ácido poliláctico PLA o el polietilentereftalato glicol PETG. Otro aspecto a tener en cuenta es la resistencia a la biodegradación la cual depende de la duración y del objetivo específico que tenga el proyecto [20].

La biodegradación se conoce como la mineralización del material orgánico por medio de la intervención de microorganismos, por ejemplo, hongos, arqueas o bacterias, dando como resultado dióxido de carbono CO_2 y agua H_2O en condiciones aeróbicas. Por otra parte, si la mineralización no se da de manera completa o es imperfecta ocurre una biotransformación dando resultado metabolitos orgánicos e inorgánicos y otros productos de transformación. Por lo que es un aspecto importante a considerar en el caso de que se usen bio-plásticos en la construcción de la infraestructura del sensor [42].

Adherencia celular: Las placas impresas en 3D deben tratarse para proporcionar adherencia celular de manera similar a las placas de Petri tradicionales. Uno de los inconvenientes de las impresiones 3D especialmente las llevadas a cabo por medio de Modelado por Deposición Fundida es presencia de rugosidades en su superficie lo que se debe al ancho del filamento al momento de llevar a cabo la impresión, estas rugosidades pueden traer consigo dificultades para el crecimiento celular en su superficie [20].

Esterilizable: Los sensores impresos deben resistir las temperaturas y las presiones presentes en las autoclaves al momento de llevar a cabo su esterilización, por ejemplo el acrilonitrilo-butadieno-estireno ABS es un material adecuado para el cultivo celular, sin embargo al exponerse a temperaturas superiores a los 80 °C puede deformarse o romperse. Existe una alternativa la cual consiste en el uso de polidimetilsiloxano (PDMS) este es un biomaterial viscoelástico bien conocido y ampliamente utilizado en los campos de biomedicina y de la ingeniería de tejidos. Hasta el momento su uso se ha visto limitado a aplicaciones en las que sea posible moldearlo o fundirlo, no obstante, recientemente se ha demostrado la posibilidad de realizar bioimpresiones en PDMS lo que permite crear formas más complejas y potencialmente útiles ampliando el número de aplicaciones [20].

3. Implementación de las placas de cultivo con sensores FBG embebidos

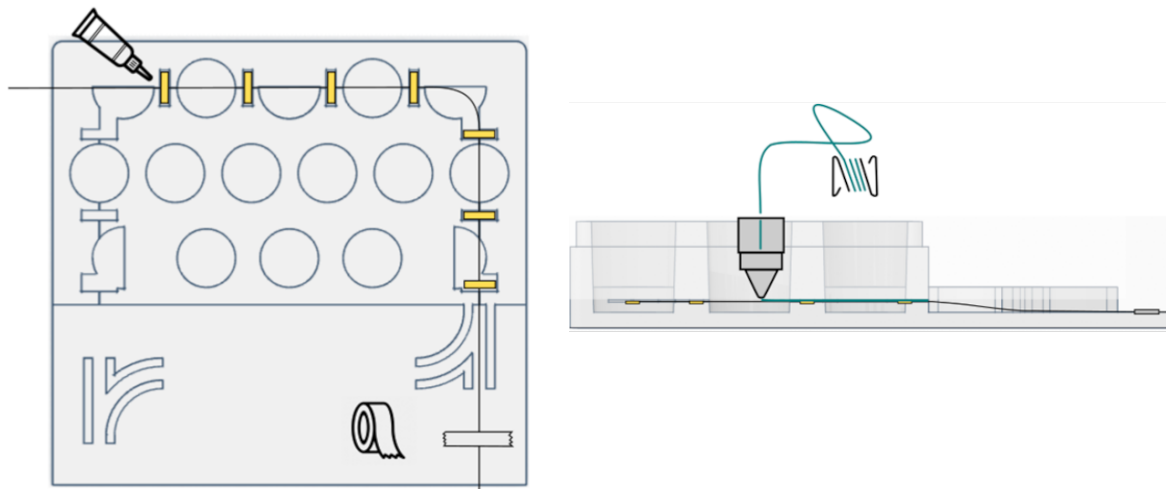
El crecimiento de cultivos celulares se lleva a cabo normalmente en placas multipozo comerciales, por lo general estas llegan a constar de 6, 12, 24, 72, 96 o incluso más pozos por plato, a su vez la dimensión geométrica de cada uno de los mismos varía de acuerdo con su cantidad. Los esferoides celulares empleados en este proyecto fueron inicialmente cultivados en placas comerciales MatTek de 96 pozos donde luego eran trasplantados a placas MatTek de 24 pozos. Los pozos de esta última tienen un diámetro interno superior de 16.30 mm, un diámetro interno inferior de 15.49 mm y una profundidad de 17.98 mm. Estas dimensiones generaron problemas al momento de insertar la fibra que contiene los sensores FBG en los pozos. Principalmente debido a que se excedía el radio de curvatura de la fibra, lo que en el mejor de los casos provoca microfisuras, conllevando a la fuga de la señal óptica además de la degradación de la relación señal a ruido de la señal, mientras que en el peor de los casos conlleva a la ruptura de esta, ver figura 3-1.



Figura 3-1.: Placa de cultivo MatTek de 24 pozos con sensores FBG, en esta se puede apreciar la ruptura de la fibra óptica debido a dobleces que excedían su radio de curvatura.

Como medida para contrarrestar esta situación se diseñó una placa de cultivo. El prototipo final consta de 16 pozos con un diámetro interno superior de 17 mm un diámetro interno inferior de 16 mm y una profundidad de 18 mm. Lo que lo diferencia de la placa comercial es la disposición de un canal rectangular con un ancho de $200\ \mu\text{m}$ y una profundidad de $600\ \mu\text{m}$, este canal se encuentra a 2 mm de altura desde el fondo del pozo, adicionalmente posee espacios rectangulares para fijar la fibra al momento de su inserción, ver figura 3-2a.

Para la fabricación de esta placa se optó por la tecnología de impresión 3D, más específicamente la de modelado por deposición fundida FDM, esta hace uso de polímeros termoplásticos que vienen en forma de filamento. Para fijar la fibra en la placa, la impresión era pausada cuando esta alcanzaba una altura de 5.6 mm, luego la fibra era insertada poco a poco en los canales, después se sostenía la fibra en cada una de las esquinas de los pozos con cinta adhesiva para finalmente cementarla en la placa haciendo uso de los agujeros rectangulares. En los agujeros rectangulares se fijó la fibra con un trozo de papel a la superficie haciendo uso de cianoacrilato. Al finalizar el proceso de inserción se reanudaba la impresión dando así la pieza por terminada, ver figura 3-2b.



(a) Vista superior de los canales dispuestos para insertar la fibra en la placa de cultivo.

(b) Continuación de la impresión luego de fijar la fibra en la placa prototipo.

Figura 3-2.: Proceso de fabricación de la placa de cultivo prototipo

Un arreglo de FBGs de la empresa Technica fue usado en la construcción de la placa prototipo, este consta de cuatro sensores, lo que permite medir la temperatura puntual en 4 de los pozos que contiene la placa. Los sensores poseen una longitud de 5 mm y una distancia de separación entre ellos de 4 cm, condición que se debe tener en cuenta al momento de definir

la distancia de separación de los pozos. La fibra es de poliamida de baja flexión y no posee recubrimiento, resultando con un diámetro final de $80 \mu\text{m}$.

Al ser la fibra tan delgada se optó por exponerla lo menos posible durante el proceso de impresión de manera que la placa de cultivo fue dividida en dos secciones, una reservada para los componentes ópticos y otra encargada de contener los pozos que alojaban los sensores FBG. El dividir la impresión en dos sesiones permitió que la fibra solo debiera estar en contacto con los movimientos de la impresora durante 8 horas en vez de las 16 horas que implicaba imprimir la pieza completa. Ver figura **3-3**.

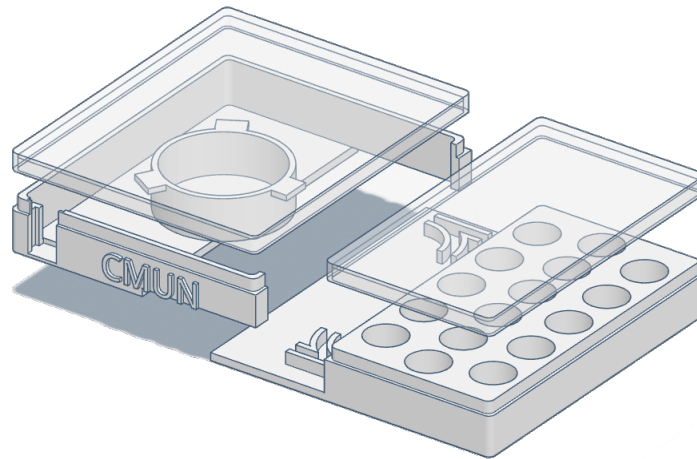


Figura 3-3.: La placa de cultivo se encuentra dividida en dos secciones, a la izquierda está un panel reservado para los componentes ópticos y a la derecha está la placa de cultivo con los sensores FBGs embebidos. Además posee dos tapas que cubren cada una de las secciones.

Para la construcción de la placa se optó por Ácido Poliláctico (PLA) debido a la simplicidad y facilidad de acceso que se tiene de este. Otras alternativas comerciales como el acrilonitrilo butadieno estireno (ABS) requieren condiciones especiales durante su manipulación. Por ejemplo, un control preciso de la temperatura, esto debido a que el enfriamiento del material durante su deposición puede provocar que este se encoja y contraiga lo que conlleva a deformaciones en la pieza final. También este pandeo en la pieza puede generar inconsistencias en las dimensiones lo que ocasiona problemas al momento de alinear la fibra con el canal dispuesto en la placa.

El PLA es un poliéster termoplástico hecho a base de ácido láctico producto de la fermentación microbiana de azúcares que es altamente reciclable debido a la ausencia de toxinas. [42, 43]. En la figura **3-4** se presenta la placa de cultivo construida.

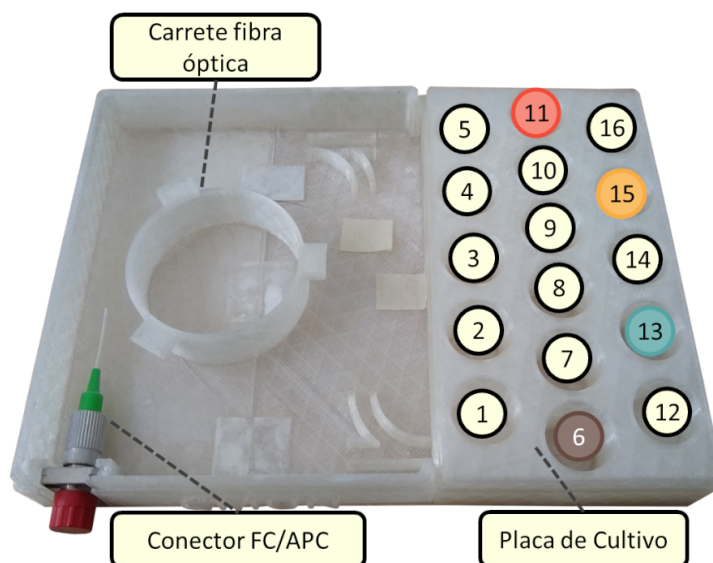


Figura 3-4.: Placa prototipo multipozo con 4 sensores FBG embebidos a ● 1539 nm, ● 1544 nm, ● 1549 nm y ● 1554 nm. Se puede apreciar que el panel reservado para los componentes ópticos cuenta con un carrete para enrollar la fibra y una terminal FC/APC para la conexión de los instrumentos ópticos, por otra parte, en la sección de la placa multipozo se aprecia la distribución de los 16 pozos en conjunto con la posición de los sensores.

Como se mencionó anteriormente los sensores impresos en 3D que entran en interacción con cultivos celulares deben cumplir una serie de requisitos de los cuales el PLA satisface los siguientes:

Biocompatibilidad y resistencia a la biodegradación: El PLA es un poliéster biobasado, biocompatible y biodegradable, sin embargo, su biodegradación solo se da bajo condiciones específicas que existen en el compostaje industrial. Un ambiente rico en oxígeno con altas temperaturas (58-80 °C), alta humedad ($\geq 60\%$ de humedad) y en presencia de microorganismos (bacterias termófilas). Bajo estas condiciones el PLA podría degradarse en más del 90% en poco tiempo, tomando entre 30 y 150 días, donde los microorganismos lo convierten en CO_2 , H_2O e ingredientes de compost, de otro modo, la descomposición del PLA en la intemperie toma alrededor de 80 años [43].

El PLA al tener propiedades biocompatibles no interfiere con la evolución de los cultivos celulares, además no se biodegradará al estar expuesto al ambiente ni debido a las pruebas que se llevarán a cabo con él, en especial durante las pruebas de calentamiento debido a que no se cumplen los requisitos necesarios para su compostaje. Por último, al no presentar alteraciones estructurales, no afectará al sensor al imponer deformaciones adicionales que alteren su sensibilidad, sin embargo, de ello se hablará más adelante.

Adherencia celular:

Muchos tipos de células tumorales pueden formar agregados multicelulares de forma esferoidal cuando crecen en condiciones que impiden una adhesión significativa de las células a las paredes del recipiente de cultivo. De lo contrario la naturaleza de las células tumorales hace que se extiendan, para cubrir la mayor cantidad de superficie posible, lo que es perjudicial para la formación de esferoides [44].

Las placas de cultivo de baja adherencia, impiden la fijación de las células al material de cultivo permitiendo la formación de organoides y esferoides 3D, por medio de la agregación de células a través de su matriz extracelular MEC. La MEC es una red de moléculas extracelulares secretadas de manera local para garantizar la cohesión celular y tisular, otra función importante de la MEC es actuar como un canal para las moléculas de señalización extracelular encargadas de controlar el crecimiento, la migración y la diferenciación celular [45].

La baja adherencia en este tipo de placas se logra gracias a la presencia de una capa de hidrogel que inhibe de manera eficaz la fijación celular. Esta capa se encuentra unida covalentemente con la superficie de los pozos, lo que implica un entrecruzamiento químico [45]. Lograr este enlace entre materiales es un proceso complejo por lo que no es posible implementar este tipo de tecnologías en la placa prototipo propuesta, de manera que se optó por otra alternativa que permitiese acceder a los esferoides celulares, esta consiste en cultivarlos primero en una placa que satisfaga los requisitos para su formación y cuando ya se encuentren listos, ser trasplantados a la placa de cultivo prototipo.

Esterilizable: Es de vital importancia que la placa prototipo sea esterilizable, inicialmente se buscaba un material que resistiera las temperaturas y presiones existentes en las autoclaves al momento de llevar a cabo su esterilización. Sin embargo, la temperatura de transición vítrea T_g del PLA se encuentra entre los 55 y los 60 °C [46]. Afortunadamente, existen otras técnicas de esterilización que no involucran un incremento considerable en la temperatura, por ejemplo, haciendo uso de óxido de etileno o el método utilizado en las placas prototipo construidas que fue esterilización UV en una cabina de flujo laminar de clase 1.

3.1. Principio de funcionamiento de los sensores FBG

Los sensores FBG o redes de difracción de Bragg funcionan como un filtro selectivo de la longitud de onda en transmisión, por lo que, si una fuente de luz de amplio espectro ilumina el FBG, las longitudes de onda que no satisfacen la condición de Bragg pasan a través de la red esencialmente sin verse afectadas. Sin embargo, aquellas porciones del espectro que

coincidan con la longitud de onda resonante de Bragg λ_B se verán reflejadas a la entrada de la fibra, ver figura 3-5. La longitud de la onda reflejada λ_B depende del espaciamiento periódico entre las perturbaciones existentes en el índice de refracción del núcleo de la fibra óptica Λ , que son representadas por medio de rejillas, y del índice de refracción efectivo del modo guiado n_{eff} (ecuación 3-1), siendo esta una propiedad inherente a la fibra empleada, por lo general de silicio [47, 48, 49, 50, 51].

$$\lambda_B = 2n_{eff}\Lambda \quad (3-1)$$

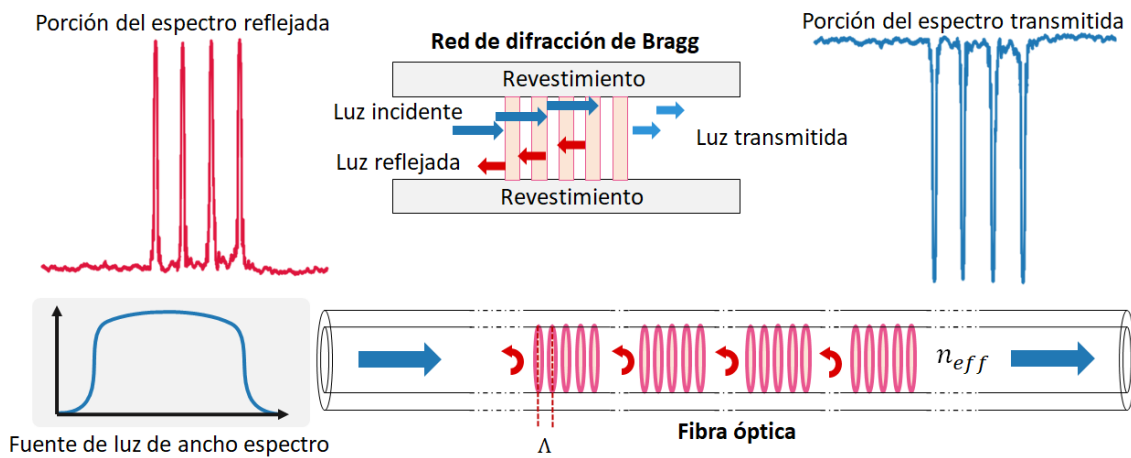


Figura 3-5.: Esquema de funcionamiento de un sensor FBG. Una fuente de luz de ancho espectro ingresa por un extremo de la fibra y sale por el otro sin verse afectada. Excepto una porción, que al coincidir con la longitud de onda resonante de Bragg λ_B se verá reflejada a la entrada de la fibra. λ_B depende del espaciamiento periódico entre las rejillas Λ y del índice de refracción efectivo del modo guiado n_{eff}

Tanto n_{eff} como Λ son sensibles a cambios mecánicos o térmicos aplicados externamente, estas variaciones inducen un cambio en la longitud de onda de Bragg λ_B y permiten el uso de estructuras FBG como sensores inherentes de temperatura y deformación (3-2).

Por ejemplo, deformaciones en la fibra $\Delta\xi$ afectan la respuesta del FBG a través del coeficiente fotoelástico de la fibra ρ_a , que relaciona el índice de refracción de la fibra con las tensiones inducidas por una deformación. De modo similar, la sensibilidad a la temperatura de una FBG está relacionada con el coeficiente de expansión térmica α y el coeficiente termo-óptico ζ , En la figura 3-6 se presenta el desplazamiento de λ_B que experimenta el sensor.

$$\Delta\lambda_B = \lambda_B [(1 - \rho_a)\Delta\xi + (\alpha + \zeta)\Delta T] \quad (3-2)$$

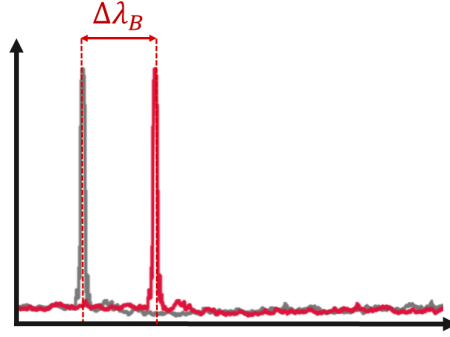


Figura 3-6.: Cambios en la longitud de onda de Bragg, debido a variaciones de temperatura o presión en la fibra.

Los parámetros mencionados anteriormente no solo dependen de las propiedades físicas de la fibra, como el material del núcleo o el recubrimiento utilizado, sino también del entorno al que estará expuesta la fibra. Por ejemplo, en la detección de temperatura, se desea que la fibra óptica esté libre de cualquier tensión que pueda provocar una sensibilidad cruzada en las lecturas. Adicionalmente, es necesario considerar la densidad del material en el que se sumergirá la fibra.

En los casos en que la fibra no está bajo tensión, solo las variaciones de temperatura producirán un cambio en la longitud de onda reflejada λ_B , entonces, la ecuación 3-2 se simplifica aún más (3-3), permitiendo obtener la sensibilidad a la temperatura S_t del sensor, ecuación 3-4.

$$\Delta\lambda_B = \lambda_B(\alpha + \zeta)\Delta T \quad (3-3)$$

$$\frac{\Delta T}{\Delta\lambda_B} = \frac{1}{\lambda_B(\alpha + \zeta)} = S_t \quad (3-4)$$

3.2. Caracterización en temperatura de la placa de cultivo con los sensores embebidos

Debido a que el objetivo es conocer la temperatura que alcanzan los cultivos celulares alojados en la placa prototipo, se hace necesario llevar a cabo una caracterización de los sensores que se encuentran alojados dentro de la misma.

3.2.1. Importancia de la caracterización

El proveedor del arreglo de sensores FBG, la empresa Technica, entrega en la figura 3-7 el espectro de reflexión de los sensores, además de una tabla, tabla 3-1, en la que condensa la información presentada en la figura, resaltando una serie de especificaciones importantes, que son:

- **Longitud de onda central (CW):** Del inglés Center Wavelength, es el punto medio del ancho espectral que posee el sensor, también se encuentra asociado con la longitud de onda de Bragg λ_B .
- **Ancho de banda (BW):** Del inglés Bandwidth, hace referencia al rango de frecuencias que se encuentran dentro del espectro del sensor y se mide considerando las porciones del espectro en que la potencia de la señal decrece 3 dB de su valor máximo.
- **Reflectividad (Ref):** Esta es la relación existente entre la potencia óptica reflejada y la potencia óptica incidente

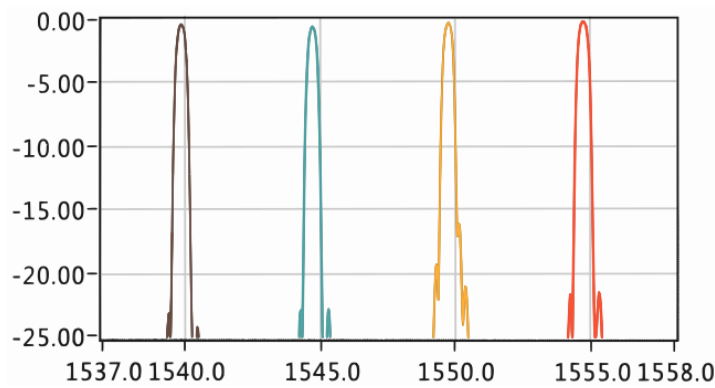














Figura 3-7.: — 1539 nm, — 1544 nm, — 1549 nm, — 1554 nm. Espectro de reflexión del arreglo de sensores FBG empleados en la construcción de la placa de cultivo prototipo, adaptado de [52].

Center Wavelength	1539.89 nm	1544.70 nm	1549.73 nm	1554.65 nm
Bandwidth	0.43 nm	0.39 nm	0.42 nm	0.43 nm
Reflectivity	73.75 %	70.34 %	75.34 %	77.40 %

Tabla 3-1.: — 1539 nm, — 1544 nm, — 1549 nm, — 1554 nm. Algunas especificaciones importantes a tener en cuenta del arreglo de sensores FBG. **Center Wavelength (CW)**, Longitud de onda central; **Bandwidth (BW)**, Ancho de banda; **Reflectivity (Ref)**, Reflectividad. Adaptado de [52].

Por practicidad en este documento para referirse a cada uno de los sensores se hará uso de su CW o de su color asociado. El arreglo cuenta con cuatro sensores FBG, cada uno de ellos con una longitud de 5 mm que se encuentran distribuidos de la siguiente manera: Conector FC/APC – 50 cm de fibra – FBG – 4 cm de fibra – FBG – 4 cm de fibra – FBG – 4 cm de fibra – FBG – 20 cm de fibra. Los sensores FBG se encuentran apodizados lo que se ve reflejado en su respuesta espectral en la que el tamaño de los lóbulos laterales del espectro de reflexión de cada uno de los sensores no es comparable al de la magnitud del lóbulo central. La fibra empleada es de poliamida con un diámetro de 80 μm y sin recubrimiento, además la fibra se encuentra ajustada para presentar una buena transmisión de la señal bajo pequeños diámetros de flexión.

Después de construida la placa prototipo se llenan los pozos en los que se encuentran los sensores con 35 ml de medio de cultivo DMEM (Dulbecco modificado por Eagle). Al registrar los valores de λ_B del arreglo se obtienen los siguientes resultados:  1539.97 nm,  1544.73 nm,  1549.75 nm,  1554.71 nm; resultados que varían ligeramente con los valores registrados en las especificaciones. Si se considera la variación en magnitud se tiene una diferencia en picómetros de:  80 pm,  30 pm,  20 pm,  60 pm. Luego, considerando una sensibilidad genérica de 10 pm/°C se podría incurrir en el error de suponer que los sensores se encuentran a una temperatura inferior a la del laboratorio en el cual se obtuvieron sus especificaciones con una diferencia de  8 °C,  3 °C,  2 °C,  6 °C.

En un inicio, aunque esta presunción pueda ser cierta, debido a que es difícil asegurar que la temperatura en ambos espacios coincida, es necesario recordar que el medio de cultivo ejerce presión sobre el sensor, de manera que de acuerdo con lo planteado en la ecuación 3-2 ante variaciones de ξ se espera una variación en λ_B .

No obstante, los cambios obtenidos en las magnitudes de λ_B no son consistentes, considerando que los sensores se encuentran inscritos en la misma fibra, no se espera un cambio brusco en la sensibilidad tanto para cambios en temperatura T como en deformación ξ . Si todos los sensores están en la misma placa, a la misma temperatura, además de que se encuentran inmersos en el mismo volumen de medio de cultivo, lo más probable es que el sensor haya quedado deformado al momento de implantarlo en la placa prototipo de manera que existe un valor de ξ_d adicional y de diferente magnitud para cada sensor, ver figura **3-8**.

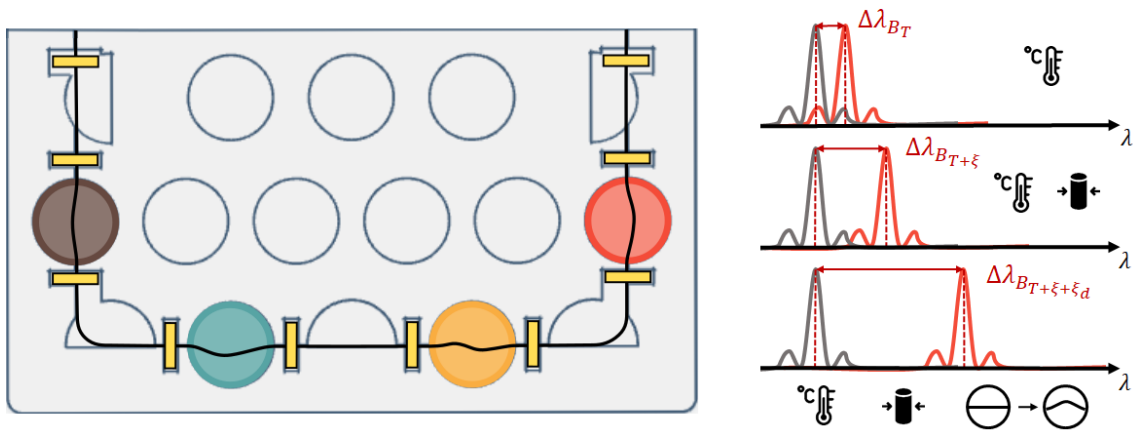


Figura 3-8.: Efecto de las deformaciones en las mediciones. Se tienen tres mediciones, la primera donde solo se aplica un cambio de temperatura T , una segunda medida donde se incluye el efecto de la densidad del medio donde se encuentra la fibra ξ y finalmente una tercera medida donde se involucran los fenómenos mencionados anteriormente y se incluye la deformación presentada por la fibra al momento de implantarse en la placa ξ_d , esta deformación al ser diferente por sensor implica que no todos tendrán el mismo cambio en λ_B .

Es de interés poder conocer el valor de temperatura real aproximado al cual se encuentran los sensores. Por lo que se utilizó el montaje experimental presentado en la figura 3-9 y mostrado en la figura 3-10. Un interrogador óptico SM125 de Micron Optics es utilizado para obtener los valores de los cambios de longitud de onda de Bragg λ_B mientras que un horno de referencia Universal Oven UM Memmert es empleado para fijar unos escalones de temperatura T por un determinado tiempo. Los valores de estos escalones servirán de referencia al momento de llevar a cabo la caracterización de la placa prototipo y por ende del cálculo de S_T en concordancia con lo presentado en la ecuación 3-4.

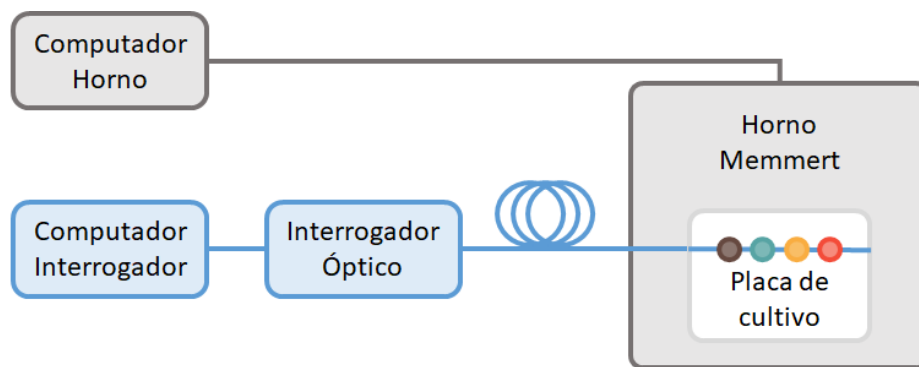


Figura 3-9.: Esquemático del montaje empleado para la caracterización de los sensores embebidos en la placa prototipo

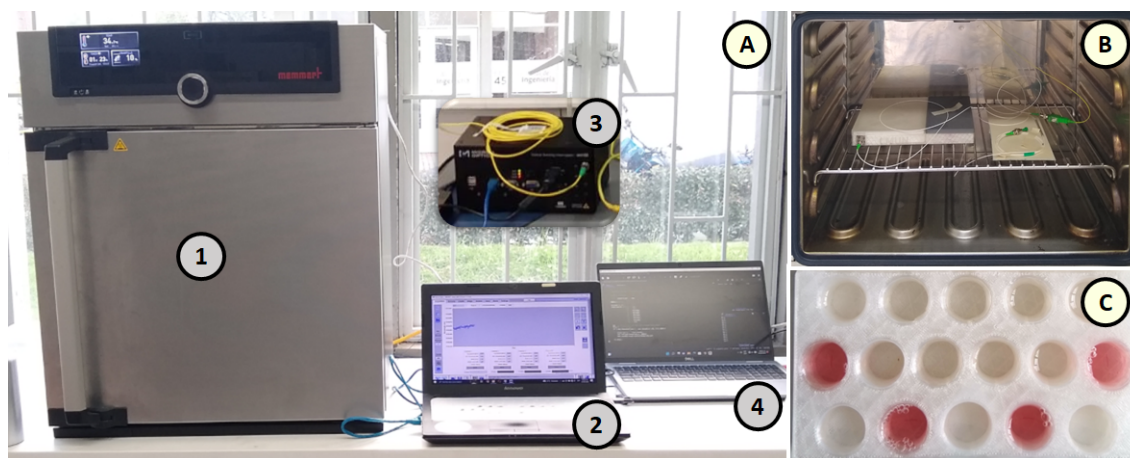


Figura 3-10.: A) 1) Horno Memmert 2) Computador conectado al interrogador óptico 3) Interrogador óptico 4) Computador conectado al horno. B) Vista al interior del horno donde puede apreciarse la placa de cultivo prototipo conectada al interrogador óptico por medio de un patchcord. C) Vista superior de la placa de cultivo, el líquido color rosa se debe al uso de medio de cultivo en los pozos al momento de llevar a cabo la caracterización.

3.2.2. Toma de datos

Obtener los valores de $\Delta\lambda_B$ es un proceso sencillo, gracias a la interfaz brindada por el interrogador óptico, sin embargo, para el horno se hace necesario construir una interfaz que le indique cuáles son los cambios de temperatura que se desea obtener y que a su vez almacene los valores de temperatura a los cuales se encuentra el horno durante los intervalos de calentamiento.

Para poder controlar el horno se desarrolló un script en Python, para más información revisar el anexo B. Este código de interrogación cumple con tres funciones: la primera es la de ser capaz de comunicarse con el horno, la segunda es la de almacenar la información entregada por el horno de manera ordenada, es decir haciendo uso de etiquetas de tiempo, y por último la de tomar la información en un intervalo de tiempo que coincida con la frecuencia de muestreo del interrogador óptico que es de 1 Hz. Tener un tiempo de referencia entre las mediciones hace posible llevar a cabo la comparación de los valores entregados por el interrogador óptico y el horno, ver figura 3-11.

Por otra parte, se debe tener en cuenta al momento de definir la duración de los pasos, que estos deben durar un intervalo de tiempo suficientemente grande entre cambios de temperatura, de manera que el horno logre dicho cambio y a su vez este sea capaz de alcanzar una condición de estabilidad, las especificaciones de los escalones empleados pueden verse en la tabla 3-2.

Escalón	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Temperatura (°C)	25	28	30	35	40	45	50	44	29	20
Tiempo (Min)	180	180	120	120	120	120	120	120	120	300

Tabla 3-2.: Escalones de temperatura y duración en minutos empleados en la caracterización de los sensores.

Se configuró una duración de tres horas para los escalones de 25 y 28 °C, esto se debe a que cuando se hace uso del horno, por lo general este se encuentra a una temperatura elevada, producto de que se llevan a cabo otro tipo de pruebas en él y este al presentar un proceso de enfriado lento, necesita un tiempo mayor para alcanzar las temperaturas iniciales requeridas. También para verificar si el sensor presenta histéresis se consideraron dos escalones de temperatura descendentes uno de ellos de 20 °C el cual tiene un intervalo de 5 horas. El resto de los escalones considerados en la caracterización poseen una duración de dos horas. Finalmente, el proceso de caracterización toma en total 25 horas.

En la figura 3-11 pueden verse los cambios de temperatura que tuvo el horno, la toma de medidas tuvo inicio a las 16 horas con 36 minutos del día martes y finalizó las 15 horas 33 minutos del día miércoles. Entre los aspectos más remarcables se encuentra el hecho de que no fue posible alcanzar el escalón de los 20 °C, 25 °C ni el de los 29 °C en los intervalos de temperatura planteados.

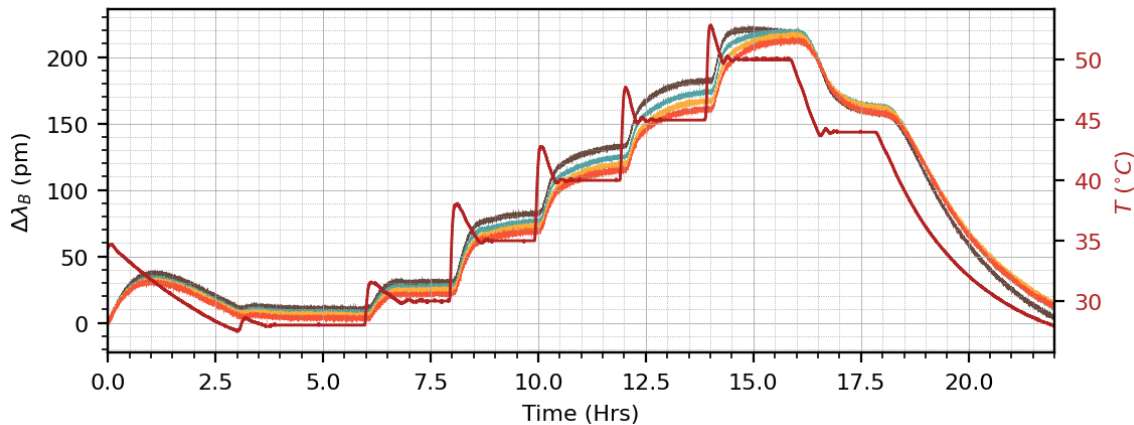


Figura 3-11.: Sensores con CW λ_B en: — 1539 nm, — 1544 nm, — 1549 nm, — 1554 nm; — Temperatura registrada por el horno. Curvas de Temperatura T y cambios en la Longitud de Onda de Bragg $\Delta\lambda_B$ para la caracterización del arreglo de sensores FBG embebidos en la placa de cultivo y sumergidos en medio de cultivo DMEM. Los gráficos de λ_B muestran un retraso probablemente debido a las dimensiones del horno. Además, hay una amortiguación en la respuesta del sensor debido a la masa añadida por el medio de cultivo

Las curvas de λ_B de cada uno de los sensores (Figura 3-11) presentan un retraso con respecto a las mediciones de temperatura, esto se debe a las dimensiones del horno, en donde el retraso en la medida indica que la distribución de calor no se da de manera instantánea dentro de este. Además ocurre una amortiguación en la respuesta del sensor, la causa de esto es la masa añadida por el medio de cultivo, esto se puede demostrar si se compara con una caracterización en la cual el sensor se encontraba a la intemperie, ver figura 3-12. En dicha figura se observa que se sigue presentando un retraso en la respuesta, no obstante, el sensor imita un poco más la respuesta de control del horno al lograr sensor el sobrepico.

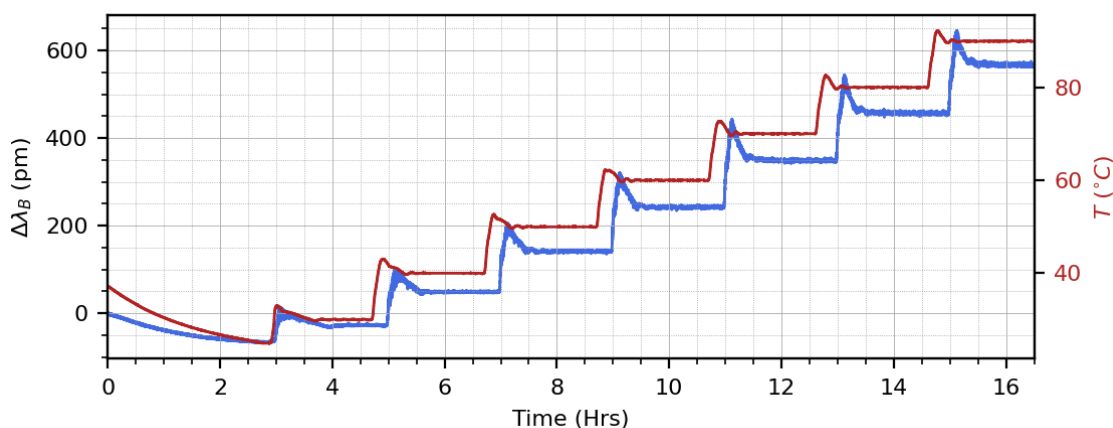


Figura 3-12.: — 1540 nm, — Temperatura. Curvas Temperatura T y cambios en la Longitud de Onda de Bragg $\Delta\lambda_B$ para la caracterización de un sensor FBG a la intemperie, es decir sin una estructura de soporte o dentro de algún medio de diferente densidad a la del ambiente dentro del horno.

3.2.3. Procesamiento de datos

La exactitud es la cualidad que caracteriza a un instrumento de ser capaz de entregar resultados cercanos al valor real de la magnitud medida, dicho de otro modo, se define como el grado de concordancia entre las medidas obtenidas y el valor verdadero de la magnitud que se desea medir [53].

La exactitud no puede determinarse ante el desconocimiento del valor exacto de la magnitud, no obstante, esta medición tiene sentido cuando se comparan las medidas obtenidas con las medidas proporcionadas por medio de un método, del que se conoce, posee un alto grado de exactitud y que será empleado como referencia para la calibración [53], para la calibración de los sensores FBG se tomarán las mediciones registradas por el horno.

Por otra parte, la precisión describe la capacidad que el instrumento posee para entregar la misma medición, ante repetidas pruebas llevadas a cabo en las mismas condiciones (ambientales, operador, etc.) sin importar la coincidencia o discrepancia entre el resultado y el valor exacto [53].

El procesamiento de datos de λ_B y T se llevó a cabo tomando los valores cuando estos alcanzaban una condición de estabilidad en cada uno de los escalones, En este caso se procesaron 3500 muestras. Además, la exactitud del sensor se determinó a través de una calibración estática. Esta consiste en mantener constantes todas las entradas de los sensores, para este caso en particular la deformación, excepto la que se desea estudiar, que es la temperatura. Luego se registran las sucesivas respuestas de los cambios en la magnitud de referencia T , y la magnitud a calibrar λ_B en condiciones de estabilidad a lo largo del rango de medición, para este caso de los 28 °C a los 50 °C. Los valores de media, desviación estándar y tamaño del escalón se encuentran registrados en la tabla **3-3**.

En la tabla **3-3** se puede apreciar que el método de medición presenta una desviación estándar de 0.0 °C para las mediciones de T y de 0.001 nm para las mediciones de λ_B . Esto indica que no se obtienen medidas de diferente magnitud considerables bajo las mismas condiciones de medición, descartando de esta manera fuentes de incertidumbre aleatorias y asegurando una buena precisión del método de medición.

Escalón E_n	Temperatura			$\lambda_B = 1539 \text{ nm}$		
	$\overline{T(E_n)}$	$\sigma T(E_n)$	$\overline{T(E_n)} - \overline{T(E_{n-1})}$	$\overline{\lambda_B(E_n)}$	$\sigma \lambda_B(E_n)$	$\overline{\lambda_B(E_n)} - \overline{\lambda_B(E_{n-1})}$
	$^{\circ}\text{C}$	$^{\circ}\text{C}$	$^{\circ}\text{C}$	nm	nm	nm
1	28.0	0.0	0.0	1539.977	0.001	0.000
2	30.0	0.0	2.0	1539.998	0.001	0.020
3	35.0	0.0	5.0	1540.049	0.001	0.051
4	40.0	0.0	5.0	1540.099	0.001	0.050
5	45.0	0.0	5.0	1540.149	0.001	0.049
6	50.1	0.0	5.1	1540.185	0.001	0.037
7	44.0	0.0	-6.1	1540.125	0.001	-0.060
Escalón E_n	Temperatura			$\lambda_B = 1544 \text{ nm}$		
	$\overline{T(E_n)}$	$\sigma T(E_n)$	$\overline{T(E_n)} - \overline{T(E_{n-1})}$	$\overline{\lambda_B(E_n)}$	$\sigma \lambda_B(E_n)$	$\overline{\lambda_B(E_n)} - \overline{\lambda_B(E_{n-1})}$
	$^{\circ}\text{C}$	$^{\circ}\text{C}$	$^{\circ}\text{C}$	nm	nm	nm
1	28.0	0.0	0.0	1544.737	0.001	0.000
2	30.0	0.0	2.0	1544.757	0.001	0.020
3	35.0	0.0	5.0	1544.806	0.001	0.049
4	40.0	0.0	5.0	1544.854	0.001	0.048
5	45.0	0.0	5.0	1544.903	0.001	0.049
6	50.1	0.0	5.1	1544.949	0.001	0.046
7	44.0	0.0	-6.1	1544.893	0.001	-0.056
Escalón E_n	Temperatura			$\lambda_B = 1549 \text{ nm}$		
	$\overline{T(E_n)}$	$\sigma T(E_n)$	$\overline{T(E_n)} - \overline{T(E_{n-1})}$	$\overline{\lambda_B(E_n)}$	$\sigma \lambda_B(E_n)$	$\overline{\lambda_B(E_n)} - \overline{\lambda_B(E_{n-1})}$
	$^{\circ}\text{C}$	$^{\circ}\text{C}$	$^{\circ}\text{C}$	nm	nm	nm
1	28.0	0.0	0.0	1549.757	0.001	0.000
2	30.0	0.0	2.0	1549.777	0.001	0.019
3	35.0	0.0	5.0	1549.824	0.001	0.048
4	40.0	0.0	5.0	1549.871	0.001	0.046
5	45.0	0.0	5.0	1549.918	0.001	0.047
6	50.1	0.0	5.1	1549.968	0.001	0.050
7	44.0	0.0	-6.1	1549.914	0.001	-0.054
Escalón E_n	Temperatura			$\lambda_B = 1554 \text{ nm}$		
	$\overline{T(E_n)}$	$\sigma T(E_n)$	$\overline{T(E_n)} - \overline{T(E_{n-1})}$	$\overline{\lambda_B(E_n)}$	$\sigma \lambda_B(E_n)$	$\overline{\lambda_B(E_n)} - \overline{\lambda_B(E_{n-1})}$
	$^{\circ}\text{C}$	$^{\circ}\text{C}$	$^{\circ}\text{C}$	nm	nm	nm
1	28.0	0.0	0.0	1554.718	0.001	0.000
2	30.0	0.0	2.0	1554.736	0.001	0.018
3	35.0	0.0	5.0	1554.783	0.001	0.047
4	40.0	0.0	5.0	1554.829	0.001	0.046
5	45.0	0.0	5.0	1554.874	0.001	0.046
6	50.1	0.0	5.1	1554.926	0.001	0.051
7	44.0	0.0	-6.1	1554.873	0.001	-0.053

Tabla 3-3.: Media, desviación estándar y tamaño de cada uno de los escalones obtenidos en la prueba de caracterización para cada uno de los sensores.

Si se consideran solo las variaciones de λ_B , en picómetros, y T, se advierte una relación lineal entre ambas variables, comportamiento que se asemeja mucho al presentado en la ecuación 3-4. No obstante, como se mencionó anteriormente, la fibra se encuentra expuesta

a deformaciones producto de la densidad del medio que la rodea y de la presión generada por la inserción en la placa de cultivo prototipo, por lo que la ecuación 3-2 se ve modificada para incluir estos cambios.

Afortunadamente estas deformaciones son constantes debido a que se maneja el mismo volumen en el medio de cultivo, además que, al no alterarse la integridad física de la placa prototipo, esta no deformará aún más la fibra. Por lo anterior, la única alteración en la ecuación que relaciona $\Delta\lambda_B$ con ΔT se debe a la presencia de un intercepto que desplazará la gráfica hacia arriba o hacia abajo en el eje y.

$$\Delta\lambda_B = \lambda_B [(1 - \rho_a)\Delta\xi + (\alpha + \zeta)\Delta T] \quad (3-5)$$

$$K_\xi + (\alpha + \zeta)\Delta T = \frac{\Delta\lambda_B}{\lambda_B} \quad (3-6)$$

$$\Delta T = \frac{1}{\lambda_B(\alpha + \zeta)}\Delta\lambda_B - \frac{K_\xi}{\alpha + \zeta} \quad (3-7)$$

$$\Delta T = S_t\Delta \cdot \lambda_B - \hat{K}_\xi \quad (3-8)$$

Al incluir los valores obtenidos en la caracterización para posicionar de manera apropiada la recta en el plano, se modifica la ecuación para incluir un término asociado a la temperatura ambiente T_0 y un término que implica una variación en la longitud de onda, un término unificado λ_{B_0} que incluye la longitud de onda central de Bragg $\lambda_{B_{CW}}$ y las deformaciones impuestas en la fibra.

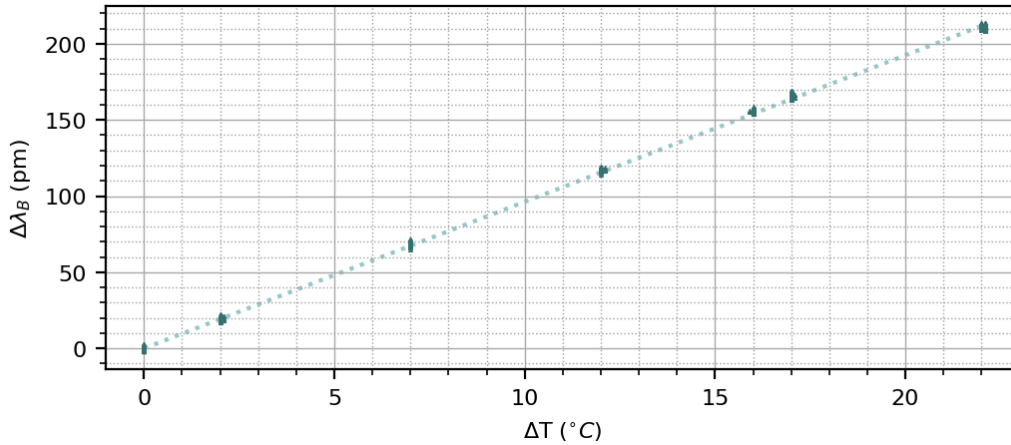


Figura 3-13.: — 1544 nm. Gráfica de $\Delta\lambda_B$ vs ΔT para el sensor de 1544 nm, en esta es posible apreciar una relación lineal entre ambas variables.

$$T_{1544} + T_0 = 103901,15 \cdot 10^{-6} \cdot \lambda_{B_{1544}} + \lambda_{B_0} \quad (3-9)$$

$$T_{1544} + 28 = 103901,15 \cdot 10^{-6} \cdot \lambda_{B_{1544}} - 1544737 \quad (3-10)$$

$$T_{1544} = 103901,15 \cdot 10^{-6} \cdot \lambda_{B_{1544}} - 160472,06 \quad (3-11)$$

Repitiendo el proceso mencionado anteriormente con los demás sensores, se obtiene el siguiente conjunto de ecuaciones:

$$T_{1539} = 104927,10 \cdot 10^{-6} \cdot \lambda_{B_{1539}} - 161557,60 \quad (3-12)$$

$$T_{1544} = 103901,15 \cdot 10^{-6} \cdot \lambda_{B_{1544}} - 160472,06 \quad (3-13)$$

$$T_{1549} = 104620,26 \cdot 10^{-6} \cdot \lambda_{B_{1549}} - 162108,03 \quad (3-14)$$

$$T_{1554} = 105744,31 \cdot 10^{-6} \cdot \lambda_{B_{1554}} - 164374,45 \quad (3-15)$$

Si se considera la operación inversa, para obtener la longitud de onda asociada a una determinada temperatura se tiene este otro conjunto de ecuaciones:

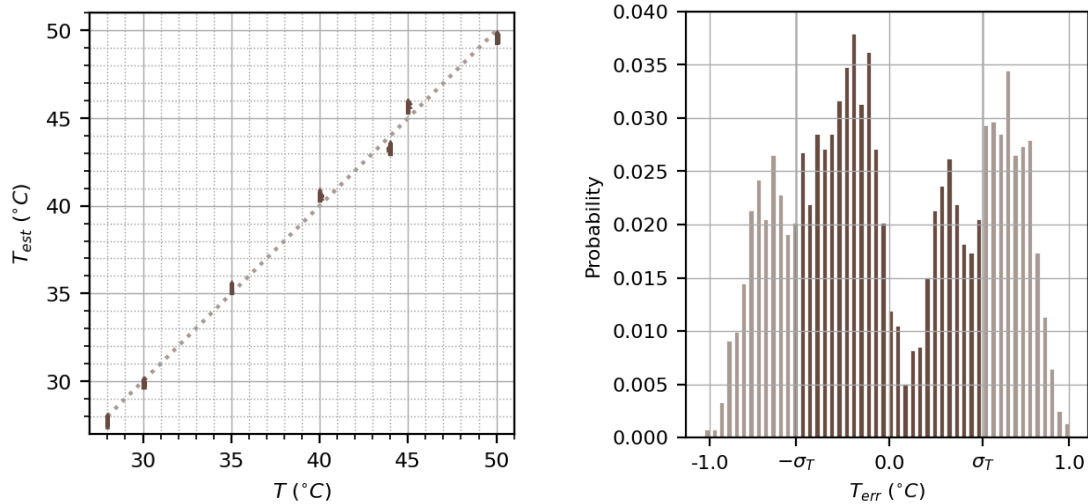
$$\lambda_{B_{1539}} = 9,50 \cdot T + 1539714,55 \quad (3-16)$$

$$\lambda_{B_{1544}} = 9,62 \cdot T + 1544468,61 \quad (3-17)$$

$$\lambda_{B_{1549}} = 9,55 \cdot T + 1549490,06 \quad (3-18)$$

$$\lambda_{B_{1554}} = 9,45 \cdot T + 1554452,39 \quad (3-19)$$

Los gráficos de dispersión de las figuras **3-14a-3-17a** comparan la temperatura medida con la temperatura estimada haciendo uso de las ecuaciones 3-12-3-15, además de presentar una línea punteada que indica la concordancia ideal de los valores calculados (eje y) y medidos (eje x).



(a) Gráfico de dispersión

(b) Histograma del error

Figura 3-14.: Resultados de la función de calibración para el sensor de ■ 1539 nm. **Gráfico de dispersión:** Los puntos representan la temperatura estimada T_{est} vs la temperatura medida T , la línea punteada corresponde a la concordancia ideal entre dichos valores. **Histograma del error:** Error de T_{est} con relación a T , la desviación estándar del error $\sigma_{T_{err}}$ es de $0.52 \text{ } ^\circ\text{C}$. los valores que se encuentran entre $\pm\sigma_{T_{err}}$ se representan por medio de las barras oscuras y corresponden al 57% del total de valores.

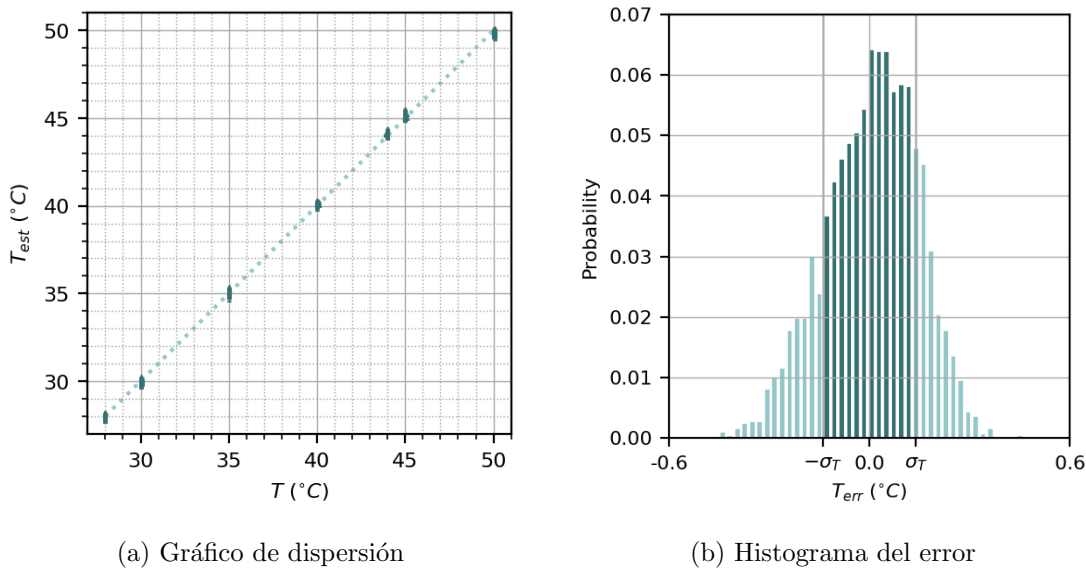


Figura 3-15.: Resultados de la función de calibración para el sensor de ■ 1544 nm. **Gráfico de dispersión:** Los puntos representan la temperatura estimada T_{est} vs la temperatura medida T , la línea punteada corresponde a la concordancia ideal entre dichos valores. **Histograma del error:** Error de T_{est} con relación a T , la desviación estándar del error $\sigma_{T_{err}}$ es de 0.14 °C. los valores que se encuentran entre $\pm\sigma_{T_{err}}$ se representan por medio de las barras oscuras y corresponden al 68 % del total de valores.

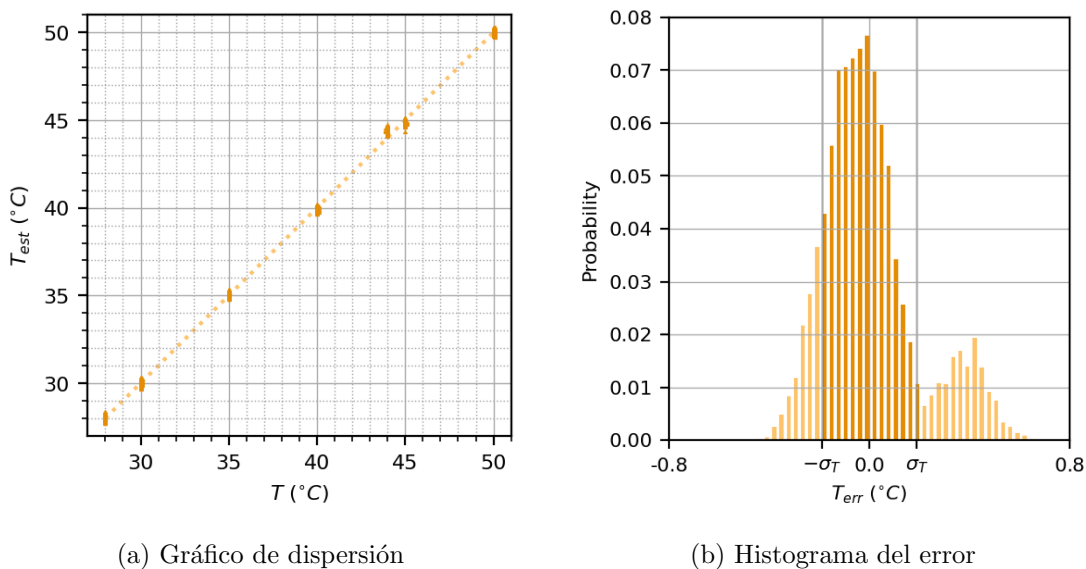


Figura 3-16.: Resultados de la función de calibración para el sensor de ■ 1549 nm. **Gráfico de dispersión:** Los puntos representan la temperatura estimada T_{est} vs la temperatura medida T , la línea punteada corresponde a la concordancia ideal entre dichos valores. **Histograma del error:** Error de T_{est} con relación a T , la desviación estándar del error $\sigma_{T_{err}}$ es de 0.19 °C. los valores que se encuentran entre $\pm\sigma_{T_{err}}$ se representan por medio de las barras oscuras y corresponden al 73 % del total de valores.

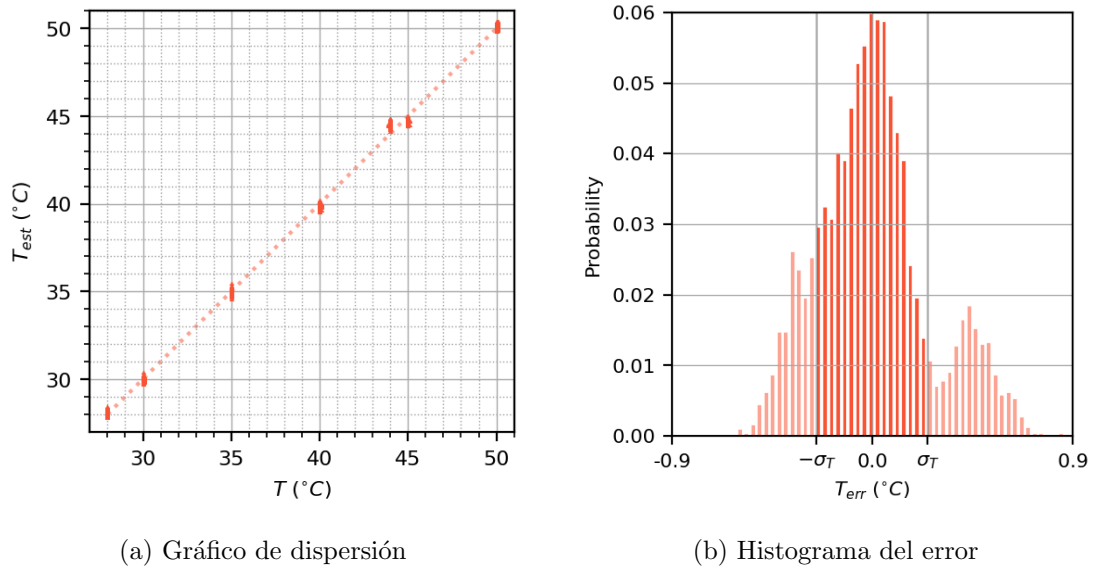


Figura 3-17.: Resultados de la función de calibración para el sensor de ■ 1554 nm. **Gráfico de dispersión:** Los puntos representan la temperatura estimada T_{est} vs la temperatura medida T , la línea punteada corresponde a la concordancia ideal entre dichos valores. **Histograma del error:** Error de T_{est} con relación a T , la desviación estándar del error $\sigma_{T_{err}}$ es de 0.26 °C. los valores que se encuentran entre $\pm\sigma_{T_{err}}$ se representan por medio de las barras oscuras y corresponden al 70% del total de valores.

Los histogramas presentados en las figuras **3-14b-3-17b** contienen la función de densidad de probabilidad del error de T_{est} con relación a T y como su nombre lo indica describen la probabilidad que tiene dicha variable de tomar un determinado valor. El sensor que presenta el máximo valor del error ($T_{est} = 1.0$ °C) posee una desviación estándar $\sigma_{T_{err}}$ de 0.52 °C, con un 57% de los valores medidos dentro del rango $\pm\sigma_{T_{err}}$, lo que indica una concordancia aceptable entre T_{est} y T para este sensor. Una descripción de los resultados obtenidos por sensor se presenta en la tabla **3-4**

Sensor	$\max(T_{err})$ (°C)	$\sigma_{T_{err}}$ (°C)	$\{e_t \in T_{err} : e_t < \sigma_{T_{err}}\}$ (%)
1539 nm	1.01	0.52	57
1544 nm	0.59	0.14	68
1549 nm	0.75	0.19	73
1554 nm	0.86	0.26	70

Tabla 3-4.: Compilado de datos del error máximo T_{err} , desviación estándar y porcentaje de los valores del error que se encuentran dentro de dicho rango, para el error de la temperatura estimada T_{est} con respecto a la temperatura medida T de cada uno de los sensores .

Por otra parte, como puede notarse en la figura **3-14b**. El histograma del error de la temperatura estimada con relación a la temperatura medida para el sensor de 1539 nm, presenta un comportamiento bimodal. Esto sugiere una ligera histéresis del sensor FBG con respecto a la

temperatura. Sin embargo, los picos de este comportamiento bimodal se encuentran dentro de la desviación estándar y debido a su magnitud tan pequeña, de 0.52 °C no se considera un aspecto que afecte de manera significativa el rendimiento del sensor.

4. Caracterización del proceso de hipertermia en esferoides de cáncer de mama.

En el presente capítulo se evalúan los cambios de temperatura que presentaron un conjunto de esferoides tumorales de la línea celular MCF-7 al ser expuestos ante dos sistemas de radiación por microondas. A continuación, se muestra una descripción detallada de ambos montajes experimentales, el proceso de preparación de los esferoides para cada una de las pruebas, los cambios de temperatura obtenidos y los resultados de la muerte celular producto de los tratamientos de hipertermia.

4.1. Descripción de los montajes experimentales

Todas las pruebas se realizaron dentro de una recámara apantallada para evitar la radiación de energía al exterior. La radiación por la fuente microondas impacta los 16 pozos de la placa de cultivo, cada pozo cuenta con tres esferoides celulares, con diámetros que oscilan entre los 200 y los 500 μm . Los esferoides se sumergieron en medio de cultivo DMEM (Dulbecco modificado por Eagle) suplementado con suero fetal bovino al 10 % (Gibco). Este prototipo de placa de cultivo no afecta el rendimiento del sensor, a su vez que facilita la manipulación del montaje al momento de implantar los esferoides en los pozos. Los sistemas de hipertermia por microondas empleados fueron los siguientes:

4.1.1. Sistema de radiación con magnetrón

El primer montaje cuenta con un magnetrón el cual consiste en un tubo de vacío de alta potencia. Para su alimentación y operación requiere un esquema circuital sencillo, como consecuencia se trata de un montaje robusto ya que hay menos componentes en su construcción propensos a fallar y fáciles de reemplazar en caso de necesidad. La desventaja que presenta el magnetrón reside en que requiere una fuente de alto voltaje para su alimentación, además de que es un montaje que ocupa un tamaño considerable [54, 55]. En el anexo A.1 se presenta una descripción mas detallada del funcionamiento del magnetrón.

Para construir el sistema de radiación por microondas con un magnetrón se empleó como aplicador una antena bocina piramidal, ver figuras 4-1 y 4-2. El uso del magnetrón permite alimentar al aplicador con una señal de 1000W a 2.45 GHz, finalmente el sistema tiene dos parámetros bajo control: la distancia y el tiempo de exposición.

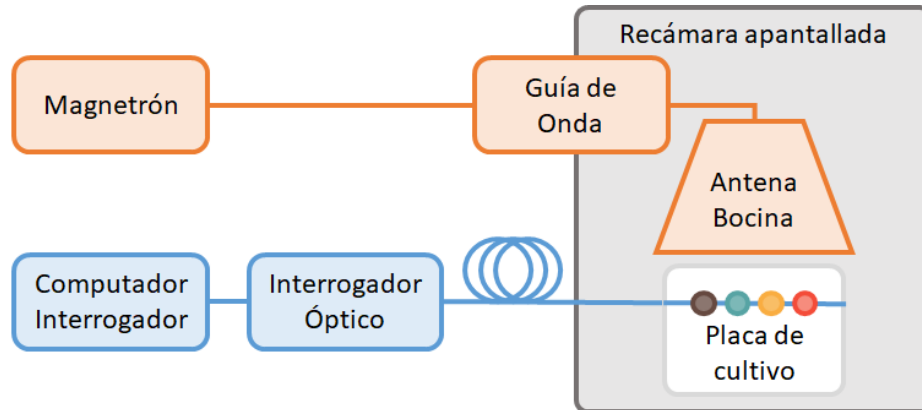
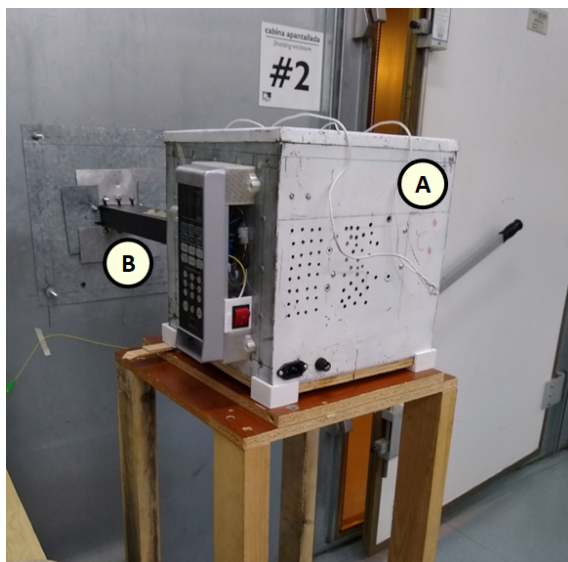
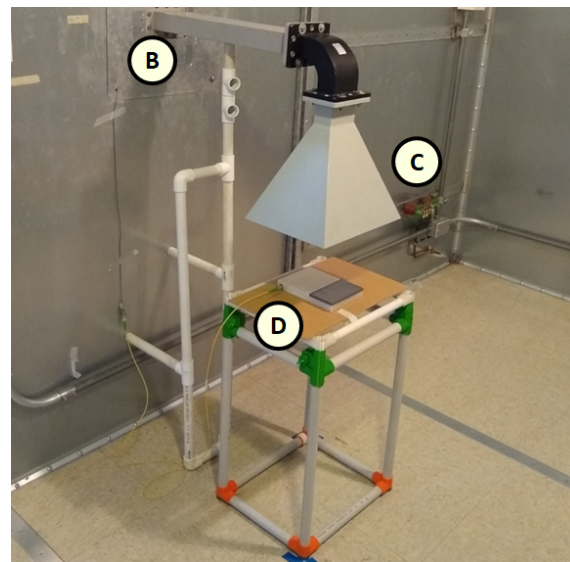


Figura 4-1.: Esquemático del montaje del sistema de radiación por microondas basado en el uso de un magnetrón. — **Sistema de radiación:** En este se conecta el magnetrón al aplicador, que para este caso es una antena bocina, por medio de una guía de onda. — **Sistema de medición:** El montaje utilizado para interrogar la fibra coincide con el usado para la caracterización de los sensores FBGs



(a) Vista exterior de la recámara apantallada



(b) Vista interior de la recámara apantallada

Figura 4-2.: Montaje para el sistema de radiación por microondas basado en el uso de un magnetrón. A) Magnetron, B) Guía de onda, C) Antena bocina, D) Placa de cultivo.

4.1.2. Sistema de radiación con amplificador de estado sólido (AES)

El segundo montaje hace uso de un Amplificador de Estado Solido (AES), el AES funciona haciendo uso de transistores, por lo que su ganancia presenta limitaciones, en el sentido de que a mayor frecuencia de operación menor será su ganancia [56]. Por ende, no es posible obtener una señal de 1000 W a 2.45 GHz a diferencia de lo que sucede con el magnetrón.

Por lo mencionado anteriormente, se suele distribuir la tarea de amplificación de manera que algunos AES consisten en un arreglo de amplificadores de RF, a su vez AES, cuya salida es recombinaada para satisfacer los requerimientos de ganancia de la aplicación particular [56].

Entre las ventajas de los amplificadores de estado sólido se encuentra que no requieren una fuente de alimentación de alto voltaje, pero sí tienen un consumo de corriente considerable. Además, la modularidad que implica el uso de múltiples amplificadores permite que el dispositivo continúe siendo funcional en el caso de que alguno de los módulos falle. Cabe recalcar que esto último depende del fabricante y de qué tan posible es obtener el esquemático del circuito [56].

Para construir el sistema de radiación por microondas con un AES, se hizo uso de un amplificador de alta potencia (Mini-Circuits ZHL-30W-262-S+) alimentado con una fuente de poder de laboratorio. La señal a amplificar se obtuvo por medio de un generador de señales RF (Rigol DSG830), como aplicador se empleó la misma bocina piramidal del montaje anterior, la señal de alimentación del aplicador es de máximo 30 W a 2.45 GHz, ver figuras 4-3 y 4-4. El esquema de radiación con AES permite tener tres parámetros bajo control: la distancia, la potencia de radiación y el tiempo de exposición.

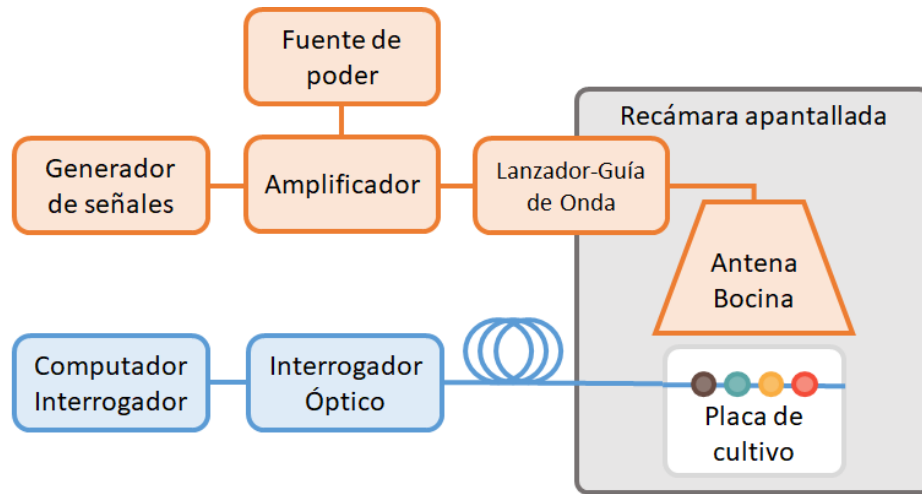


Figura 4-3.: Esquemático del montaje del sistema de radiación por microondas basado en el uso de un AES. **— Sistema de radiación:** En este el amplificador es alimentado por medio de una fuente de poder de laboratorio, la señal a amplificar se obtiene de un generador de señales. La salida resultante del amplificador es acoplada a la guía de onda por medio de un lanzador, el aplicador es una antena bocina. **— Sistema de medición:** El montaje utilizado para interrogar la fibra coincide con el usado para la caracterización de los sensores FBGs.

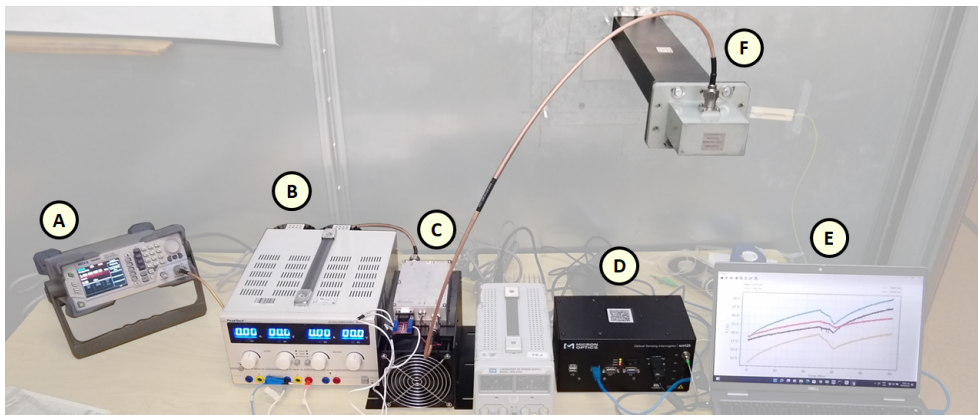


Figura 4-4.: Montaje para el sistema de radiación por microondas basado en el uso de un amplificador de estado sólido. **A)** Generador de señales, **B)** Fuente de poder, **C)** Amplificador, **D)** Interrogador óptico, **E)** Computador, **F)** Lanzador - Guía de onda.

4.2. Proceso de preparación de los esferoides para las pruebas de hipertermia

Se cultivó la línea celular epitelial MCF-7 de adenocarcinoma de cáncer de mama en placas de baja adherencia de Corning Costar de 96 pozos. Las células MCF-7 se sembraron en una densidad de 2500 células por pozo, después de 96 horas a partir de su siembra se evaluó el número total de esferoides formados haciendo uso de un microscopio óptico invertido. Después de un tiempo de desarrollo que va de 7-12 días los esferoides están listos para llevar a cabo las pruebas de hipertermia, ver figura 4-5.

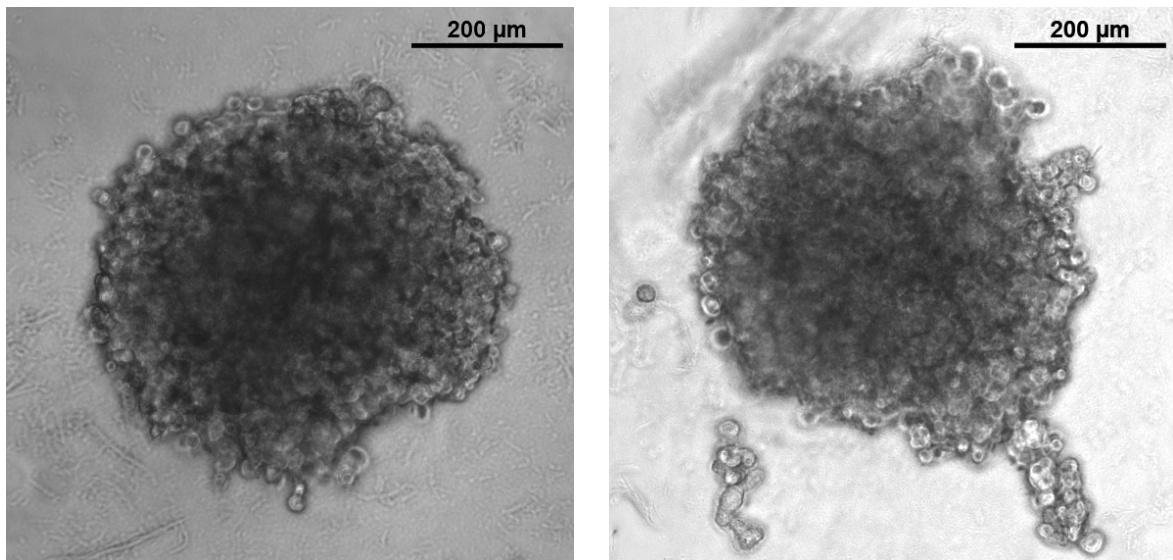
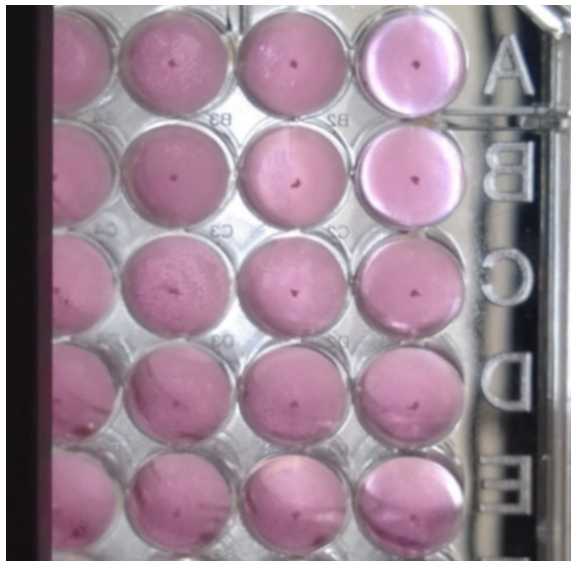


Figura 4-5.: Imágenes obtenidas con el microscopio óptico invertido de algunos esferoides preparados para las pruebas de hipertermia.

Los esferoides fueron cultivados en los laboratorios de la Universidad El Bosque y luego se trasladaron a los laboratorios de la Universidad Nacional en donde se llevaron a cabo las pruebas de hipertermia. Para su transporte, los esferoides fueron colocados en una nevera de espuma de poliestireno donde se mantuvieron a una temperatura entre 4 y 8 °C por medio de almohadillas de termogel para no comprometer la recuperación celular [57]. Por otra parte, para el control del CO_2 se dispuso dentro de la nevera un recipiente con una vela, práctica recomendada para casos en los que no se dispone con una incubadora que permita regular el ambiente al que se encuentran expuestos los cultivos [58], la importancia del control de este parámetro se detalla en la sección 4.4.

En la figura 4-6a se muestran los esferoides dentro de la placa de cultivo de 96 pozos. Como referencia, para dimensionar la magnitud de los esferoides, cada pozo posee un diámetro superior de 6.8 mm, un diámetro inferior de 6.21 mm y una profundidad de 11.7 mm. Previo a las pruebas de hipertermia los esferoides eran trasladados de la placa de cultivo a tubos de micro-centrífuga, para luego ser llevados a una incubadora donde se calentaban hasta llegar a una temperatura de 37 °C, ver figuras 4-6b y 4-7a.



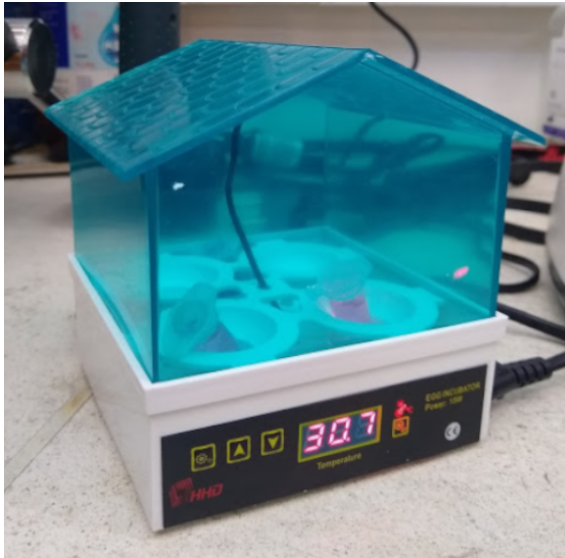
(a) Vista inferior de la placa de cultivo MatTek de 96 pozos con los esferoides celulares



(b) Traslado de los esferoides a tubos de micro-centrífuga

Figura 4-6.: Proceso de traslado de los esferoides desde las placas de cultivo Corning Costar de baja adherencia de 96 pozos a tubos de micro-centrífuga, para lo cual se hace uso de una micro-pipeta. Esto se lleva a cabo para que los esferoides puedan ser ingresados más fácilmente a la incubadora.

Cuando los esferoides alcanzan la temperatura deseada son trasladados a la placa de cultivo prototipo para así llevar a cabo las pruebas de hipertermia, figura 4-7b. Al terminar las pruebas los esferoides son extraídos de la placa de cultivo y cargados de nuevo a tubos de micro-centrífuga. Estos son centrifugados a 1200 rpm durante 5 minutos con la finalidad de peletizar los esferoides, esto es separar los esferoides del medio, la solución remanente es extraída y el medio cambiado.



(a) Esferoides dentro de la incubadora



(b) Traslado de los esferoides a la placa multipozo prototipo

Figura 4-7.: En la incubadora los esferoides alcanzan una temperatura de 37 °C, después de esto son trasladados a la placa multipozo prototipo.

4.3. Medición de los cambios de temperatura obtenidos en las pruebas de hipertermia

El proceso de calentamiento se puede dividir en dos partes: Un periodo de calentamiento inicial en el que se busca alcanzar una temperatura que se encuentre dentro de los intervalos de tratamiento por hipertermia y un periodo de mantenimiento, en el que se alterna el funcionamiento de la fuente microondas entre estados de encendido y apagado con la finalidad de mantener la temperatura de tratamiento constante.

Para analizar los cambios de temperatura presentados en los esferoides, se consideraron los siguientes parámetros de las curvas obtenidas: T_o , Temperatura inicial en °C de la prueba; T_f Temperatura final alcanzada durante el primer intervalo de calentamiento; ΔT , Cambio de temperatura alcanzado en el primer intervalo de calentamiento; E_T , Lapso de tiempo en minutos que toma llegar de T_o a T_f ; \bar{T} , Temperatura promedio alcanzada en el intervalo de mantenimiento; H_T , Duración en minutos del intervalo de mantenimiento. Todos los parámetros mencionados anteriormente se presentan en la figura 4-8.

4.3.1. Pruebas llevadas a cabo en el sistema de radiación utilizando un magnetrón

La primera distancia de exposición considerada fue de 26 cm. Bajo estas condiciones se realizaron tres pruebas de radiación, obteniendo un ΔT máximo de 35.5 °C en un intervalo de 3 minutos. Las mediciones de temperatura durante el proceso de radiación para la prueba número 3 se presentan en la figura 4-8. Los parámetros de estudio T_o , T_f , ΔT , E_T , \bar{T} y H_T para cada una de las tres pruebas se encuentran condensados en la tabla 4-1.

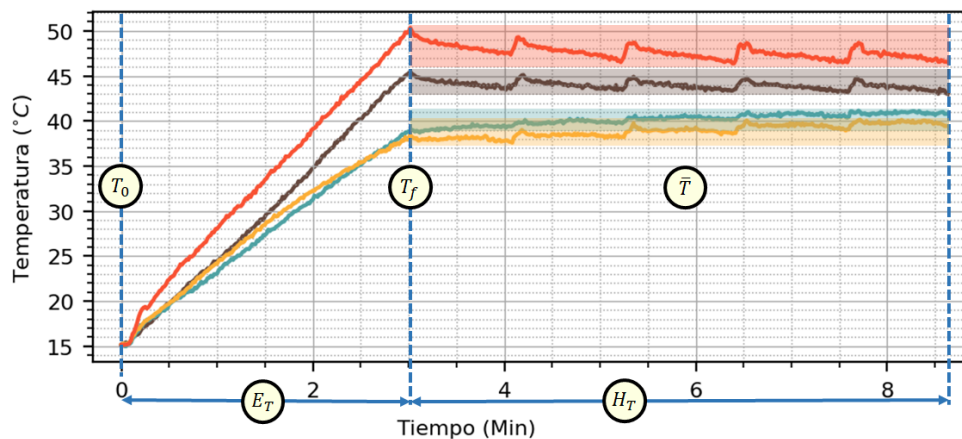


Figura 4-8.: Sensores: — 1539 nm, — 1544 nm, — 1549 nm, — 1554 nm. Parámetros de interés: T_o , Temperatura inicial de la prueba; T_f Temperatura final del intervalo de calentamiento; E_T , Lapso de tiempo entre de T_o y T_f ; \bar{T} , Temperatura promedio del intervalo de mantenimiento; H_T , Duración del intervalo de mantenimiento. Prueba de calentamiento con magnetrón a una distancia de exposición de 26 cm, intervalo de calentamiento inicial de 3 minutos, intervalo de mantenimiento de 5.6 minutos con periodos de encendido y apagado de la fuente microondas de 10 segundos y un minuto respectivamente.

De acuerdo con lo presentado en la tabla 4-1 del total de las pruebas dos pozos alcanzaron el rango de temperaturas de un tratamiento diatérmico, es decir temperaturas inferiores a 41 °C. Por otra parte, seis de los pozos llegaron a rangos de hipertermia, entre los 41 y los 48 °C. Finalmente se tiene que dos pozos alcanzaron temperaturas de tratamiento térmico irreversible llegando a temperaturas superiores a los 48 °C con un máximo de 57.5 °C.

Sensor	Prueba 1					
	T_o (°C)	T_f (°C)	ΔT (°C)	E_T (min)	\bar{T} (°C)	H_T (min)
1539 nm	17.0	47.8	30.8	3.0	51.5	7.0
1544 nm	17.0	44.0	27.0	3.0	50.7	7.0
1549 nm	17.0	52.6	35.6	3.0	55.3	7.0
1554 nm	17.0	47.1	30.1	3.0	51.3	7.0
Sensor	Prueba 2					
	T_o (°C)	T_f (°C)	ΔT (°C)	E_T (min)	\bar{T} (°C)	H_T (min)
1539 nm	22.0	57.5	35.5	3.0	56.1	5.5
1544 nm	22.0	45.7	23.7	3.0	48.7	5.5
1549 nm	22.0	44.3	22.3	3.0	47.9	5.5
1554 nm	22.0	52.2	30.2	3.0	51.0	5.5
Sensor	Prueba 3					
	T_o (°C)	T_f (°C)	ΔT (°C)	E_T (min)	\bar{T} (°C)	H_T (min)
1539 nm	15.0	44.7	29.7	3.0	44.0	5.6
1544 nm	15.0	39	24.0	3.0	40.2	5.6
1549 nm	15.0	38	23.0	3.0	38.9	5.6
1554 nm	15.0	50	35.0	3.0	47.6	5.6

Tabla 4-1.: Parámetros: T_o , Temperatura inicial de la prueba; T_f Temperatura final del intervalo de calentamiento; ΔT , Diferencia de temperatura entre T_f y T_o ; E_T , Lapso de tiempo entre T_o y T_f ; \bar{T} , Temperatura promedio del intervalo de mantenimiento; H_T , Duración del intervalo de mantenimiento. Parámetros de estudio de las tres pruebas del sistema de hipertermia con magnetron a una distancia de 26 cm.

La segunda distancia de exposición fue de 20 cm, distancia a la que se llevaron a cabo dos pruebas de radiación, obteniendo un ΔT máximo de 28.9 °C en un intervalo de 4.3 minutos, las mediciones de temperatura durante el proceso de radiación para la prueba número 2 se presentan en la figura 4-9. Los parámetros de estudio de las curvas de temperatura se encuentran condensados en la tabla 4-2.

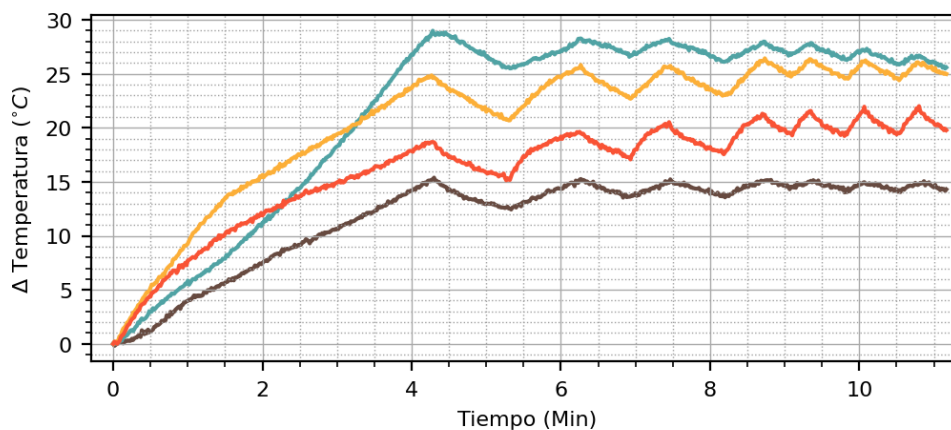


Figura 4-9.: Sensores: — 1539 nm, — 1544 nm, — 1549 nm, — 1554 nm. Prueba de calentamiento con magnetron a una distancia de exposición de 20 cm, intervalo de calentamiento inicial de 4.3 minutos, intervalo de mantenimiento de 6.9 minutos con periodos de encendido y apagado variables de la fuente microondas.

Sensor	Prueba 1					
	T_o (°C)	T_f (°C)	ΔT (°C)	E_T (min)	\bar{T} (°C)	H_T (min)
1539 nm	20.0	29.5	9.5	3.0	30.9	7.5
1544 nm	21.1	39.1	18.1	3.0	42.5	7.5
1549 nm	21.1	40.9	19.8	3.0	42.0	7.5
1554 nm	21.1	36.9	15.8	3.0	38.6	7.5
Sensor	Prueba 2					
	T_o (°C)	T_f (°C)	ΔT (°C)	E_T (min)	\bar{T} (°C)	H_T (min)
1539 nm	22.4	37.8	15.4	4.3	36.7	6.9
1544 nm	23.3	52.2	28.9	4.3	50.3	6.9
1549 nm	24.7	49.4	24.7	4.3	49.0	6.9
1554 nm	24.4	43.2	18.8	4.3	43.4	6.9

Tabla 4-2.: Parámetros: T_o , Temperatura inicial de la prueba; T_f Temperatura final del intervalo de calentamiento; ΔT , Diferencia de temperatura entre T_f y T_o ; E_T , Lapso de tiempo entre T_o y T_f ; \bar{T} , Temperatura promedio del intervalo de mantenimiento; H_T , Duración del intervalo de mantenimiento. Parámetros de estudio de las tres pruebas del sistema de hipertermia con magnetrón a una distancia de 20 cm.

De acuerdo con lo presentado en la tabla 4-2 un pozo alcanzó el rango de temperaturas de un tratamiento diatérmico, tres de los pozos llegaron a rangos de hipertermia, dos pozos alcanzaron temperaturas de tratamiento térmico irreversible, finalmente dos pozos no alcanzaron una temperatura de tratamiento térmico.

4.3.2. Pruebas llevadas a cabo en el sistema de radiación utilizando un AES

Se realizó una prueba de radiación a una distancia de 20 cm, obteniendo un ΔT máximo de 8.7 °C en un intervalo de 25 minutos. Las mediciones de temperatura durante el proceso de radiación para esta prueba se presentan en la figura 4-10. Los parámetros de estudio de las curvas de temperatura se encuentran condensados en la tabla 4-3.

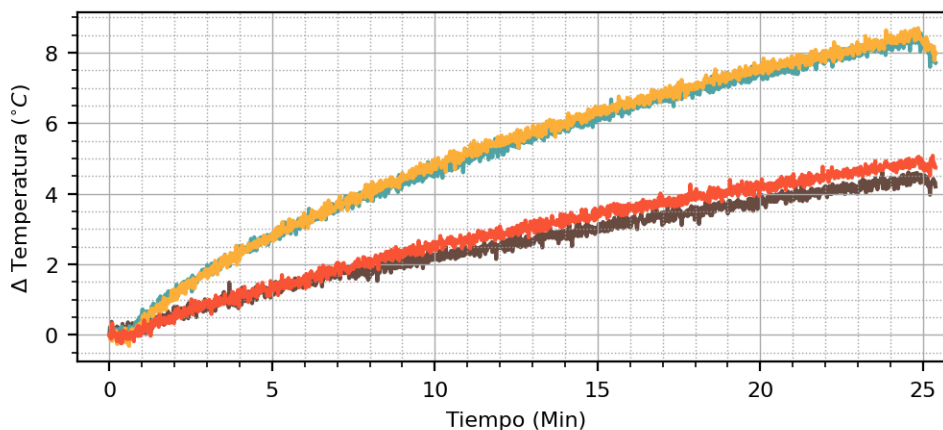


Figura 4-10.: Sensores: — 1539 nm, — 1544 nm, — 1549 nm, — 1554 nm. Prueba de calentamiento con AES a una distancia de exposición de 20 cm, intervalo de calentamiento inicial de 25 minutos.

Sensor	Prueba 1					
	T_o (°C)	T_f (°C)	ΔT (°C)	E_T (min)	\bar{T} (°C)	H_T (min)
1539 nm	17.8	22.4	4.6	25.0	-	-
1544 nm	18.8	27.4	8.5	25.0	-	-
1549 nm	18.9	27.6	8.7	25.0	-	-
1554 nm	19.1	24.1	5.1	25.0	-	-

Tabla 4-3.: Parámetros: T_o , Temperatura inicial de la prueba; T_f Temperatura final del intervalo de calentamiento; ΔT , Diferencia de temperatura entre T_f y T_o ; E_T , Lapso de tiempo entre T_o y T_f ; \bar{T} , Temperatura promedio del intervalo de mantenimiento; H_T , Duración del intervalo de mantenimiento. Parámetros de estudio de la prueba del sistema de hipertermia con AES a una distancia de 20 cm.

De acuerdo con lo presentado en la tabla 4-3 ninguno de los pozos alcanzó una temperatura de tratamiento térmico.

La segunda distancia de exposición fue de 15 cm, donde se realizó una prueba de radiación obteniendo un ΔT máximo de 7.7 °C en un intervalo de 20 minutos. Las mediciones de temperatura durante el proceso de radiación para esta prueba se presentan en la figura 4-11. Los parámetros de estudio de las curvas de temperatura se encuentran condensados en la tabla 4-4.

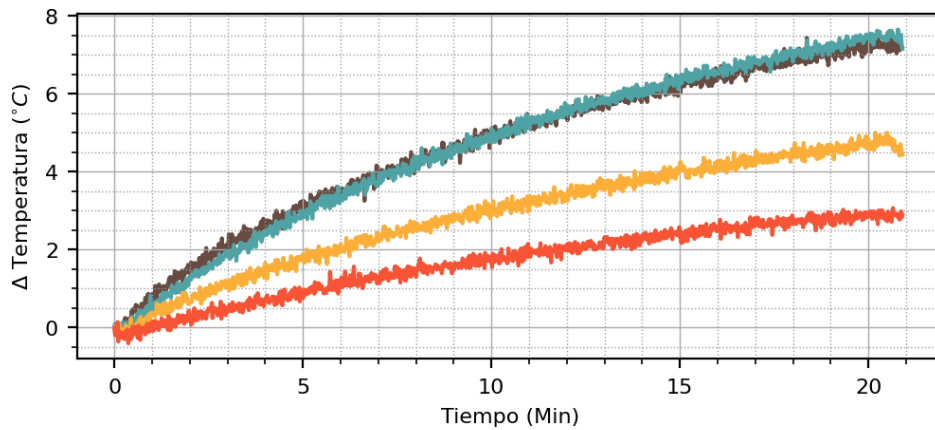


Figura 4-11.: Sensores: ■ 1539 nm, ■ 1544 nm, ■ 1549 nm, ■ 1554 nm. Prueba de calentamiento con AES a una distancia de exposición de 15 cm, intervalo de calentamiento inicial de 20 minutos.

Sensor	Prueba 1					
	T_o (°C)	T_f (°C)	ΔT (°C)	E_T (min)	\bar{T} (°C)	H_T (min)
1539 nm	20.9	28.3	7.5	20.0	-	-
1544 nm	23.3	31.0	7.7	20.0	-	-
1549 nm	22.8	27.8	5.0	20.0	-	-
1554 nm	22.4	25.4	3.1	20.0	-	-

Tabla 4-4.: Parámetros: T_o , Temperatura inicial de la prueba; T_f Temperatura final del intervalo de calentamiento; ΔT , Diferencia de temperatura entre T_f y T_o ; E_T , Lapso de tiempo entre T_o y T_f ; \bar{T} , Temperatura promedio del intervalo de mantenimiento; H_T , Duración del intervalo de mantenimiento. Parámetros de estudio de la prueba del sistema de hipertermia con AES a una distancia de 15 cm.

De acuerdo con lo presentado en la tabla 4-4 ninguno de los pozos alcanzó una temperatura de tratamiento térmico.

La tercera distancia de exposición fue de 8 cm, en este caso se realizaron dos pruebas de radiación obteniendo un ΔT máximo de 25 °C en un intervalo de 16 minutos con un intervalo de mantenimiento de 5 minutos. Las mediciones de temperatura durante el proceso de radiación para la prueba número 2 se presentan en la figura 4-12. Los parámetros de estudio de las curvas de temperatura se encuentran condensados en la tabla 4-5.

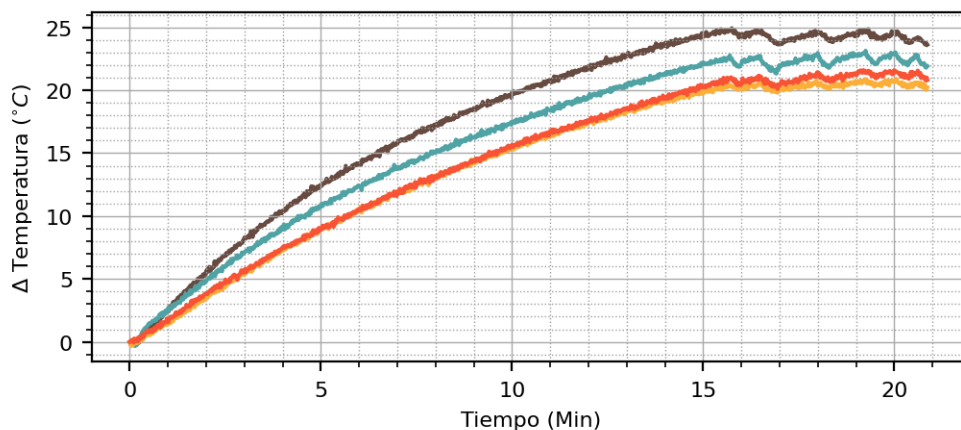


Figura 4-12.: — 1539 nm, — 1544 nm, — 1549 nm, — 1554 nm. Prueba de calentamiento con AES a una distancia de exposición de 8 cm, intervalo de calentamiento inicial de 16 minutos, intervalo de mantenimiento de 5 minutos con periodos de encendido y apagado variables de la fuente microondas.

Sensor	Prueba 1					
	T_o (°C)	T_f (°C)	ΔT (°C)	E_T (min)	\bar{T} (°C)	H_T (min)
1539 nm	20.3	46.1	25.8	21.5	45.2	3.5
1544 nm	21.4	36.7	15.3	21.5	36.5	3.5
1549 nm	21.2	42.2	21.0	21.5	41.9	3.5
1554 nm	21.9	39.9	18.0	21.5	39.7	3.5
Sensor	Prueba 2					
	T_o (°C)	T_f (°C)	ΔT (°C)	E_T (min)	\bar{T} (°C)	H_T (min)
1539 nm	21.4	46.3	24.9	15.8	45.7	5.0
1544 nm	22.6	45.7	23.1	15.8	44.9	5.0
1549 nm	22.5	43.4	20.9	15.8	42.9	5.0
1554 nm	22.5	44.1	21.6	15.8	43.5	5.0

Tabla 4-5.: Parámetros: T_o , Temperatura inicial de la prueba; T_f Temperatura final del intervalo de calentamiento; ΔT , Diferencia de temperatura entre T_f y T_o ; E_T , Lapso de tiempo entre T_o y T_f ; \bar{T} , Temperatura promedio del intervalo de mantenimiento; H_T , Duración del intervalo de mantenimiento. Parámetros de estudio de las dos pruebas del sistema de hipertermia con AES a una distancia de 8 cm.

De acuerdo con lo presentado en la tabla 4-5 dos pozos alcanzaron el rango de temperaturas de un tratamiento diatérmico, por otra parte ocho pozos alcanzaron el rango de temperaturas de un tratamiento por hipertermia.

4.4. Resultados de la muerte celular producto de los tratamientos de hipertermia

En esta sección se muestran algunos resultados preliminares de la respuesta biológica presentada por los esferoides durante las pruebas de radiación. Es importante mencionar que al momento de presentar este documento aún no se tienen suficientes esferoides radiados para adelantar estudios más completos sobre el tema.

En función de los resultados obtenidos en la sección 4.3 los esferoides celulares son divididos en tres grupos:

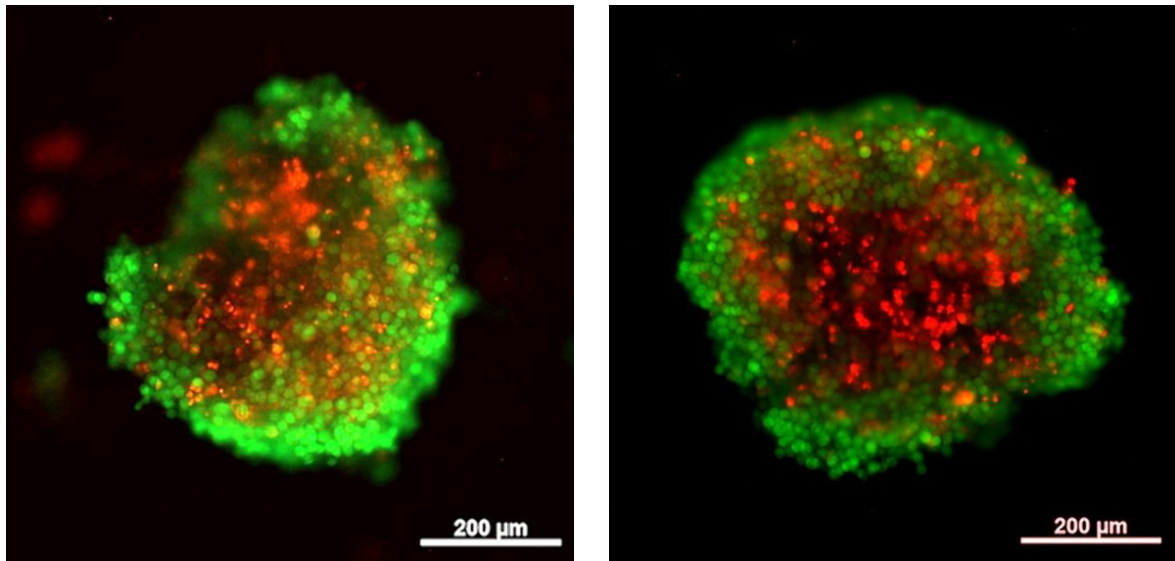
- Grupo I ($36\text{ °C} < T \leq 41\text{ °C}$): Este grupo se encuentra un grado por debajo de la temperatura del cuerpo humano y llega hasta temperaturas de tratamiento diatérmico.
- Grupo II ($41\text{ °C} < T \leq 43\text{ °C}$): Temperaturas dentro del rango de hipertermia.
- Grupo III ($43\text{ °C} < T \leq 48\text{ °C}$): Temperaturas dentro del rango de hipertermia donde se presentan daños en la vasculatura del tumor.

Para la evaluación de muerte celular en los esferoides se hizo uso de un citómetro de flujo. En este equipo, los esferoides son expuestos a distintos fluorocromos. Los fluorocromos son una serie de componentes que presentan fluorescencia ante la exposición a una longitud de onda específica; finalmente, la longitud de onda de fluorescencia obtenida en el citómetro se relaciona con la muerte celular. Los fluorocromos empleados fueron CFSE (éster succinimidílico de diacetato de 5,6-carboxifluoresceína) e IP (yoduro de propidio) [59].

El CFSE puede atravesar la membrana plasmática de células intactas lo que permite evaluar la integridad de la misma, además, si son metabolizados por las células dan como resultado un compuesto fluorescente color verde lo que indica que la célula se encuentra activa metabólicamente indicando a su vez actividad enzimática en la misma [59].

Por otra parte, el IP presenta unión a ácidos nucleicos, tanto ADN como ARN emitiendo una fluorescencia roja al unirse estas moléculas, sin embargo, no es capaz de atravesar la membrana celular. Esto permite poner de manifiesto a células muertas con membrana celular comprometida [59].

Las figuras 4-13a y 4-13b muestran fotos, tomadas con un citómetro de flujo, de esferoides de los grupos II y III expuestos a fluorocromos. Adicionalmente se muestra la foto de un esferoide del grupo de control el cual no fue expuesto a un tratamiento de hipertermia, ver figura 4-14. En estas figuras se puede observar predominancia del color verde del grupo de control y alta coloración roja en los grupos sometidos a radiación, lo que indica alta muerte celular.



(a) Esferoides celulares del grupo II expuestos a una temperatura de 42.2 °C

(b) Esferoides celulares del grupo II expuestos a una temperatura de 45.7 °C

Figura 4-13.: — Células vivas, — Células muertas. Imágenes obtenidas con el citómetro de flujo de dos esferoides sometidos a radiación

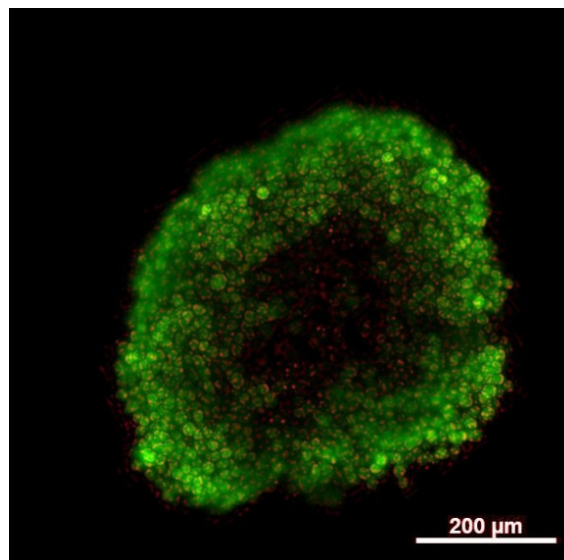


Figura 4-14.: — Células vivas, — Células muertas. Imagen obtenida con el citómetro de flujo de un esferoide del grupo de control en el que no se realizaron pruebas de hipertermia.

Para la supervivencia de los cultivos celulares, es necesario que el medio de cultivo se asemeje lo mejor posible al entorno fisiológico de las células. Lo que implica que requieren un entorno estrictamente controlado, por lo cual estas son mantenidas en incubadoras las cuales brindan condiciones apropiadas para su crecimiento, permitiendo controlar parámetros como la temperatura, la humedad relativa y los niveles de CO_2 [60].

Por otra parte, existen otros parámetros asociados al medio de cultivo como lo son la composición de nutrientes, el pH, la osmolalidad, el volumen y la frecuencia de reposición del medio, entre otros. Todas estas variables pueden fluctuar con el tiempo por lo que deben ser continuamente monitoreadas. De allí cabe recalcar que es de vital importancia mantener el entorno de trabajo en el que se manipularán las células ultra-limpio, sin ningún tipo de contaminación ya sea biológica o por partículas [60].

Es de esperarse que se presente muerte celular durante el tránsito al laboratorio donde se realizaron las pruebas de hipertermia, en la manipulación de carga en las placas prototipo, durante las pruebas de hipertermia, en la manipulación de descarga de las placas y durante el retorno al laboratorio donde se evaluó el comportamiento presentado por los esferoides. En la figura 4-15a se muestran el porcentaje de células vivas en verde y el porcentaje de células muertas en rojo para cada uno de los grupos de esferoides. Es necesario aclarar que los resultados vistos en la figura 4-15a no necesariamente se encuentran ligados a una muerte por hipertermia, sino que presentan resultados de muerte celular asociados a múltiples factores, entre los que se encuentran la manipulación y el transporte de los esferoides. De allí la importancia de la gráfica 4-15b la cual muestra el porcentaje de citotoxicidad para cada uno de los grupos de esferoides.

La citotoxicidad es una característica derivada de una respuesta de muerte celular inmunogénica (ICD). Esta se caracteriza por la liberación de moléculas inmunogénicas consecuencia de la muerte de células tumorales, en este caso debido al aumento de la temperatura. En la figura 4-15b (realizada por el grupo de investigación INMUBO de la universidad El Bosque) se puede observar que la citotoxicidad es mayor en los grupos que fueron sometidos a radiación que en el grupo de control. Lo que sugiere una relación entre el aumento de la temperatura y la ICD [61].

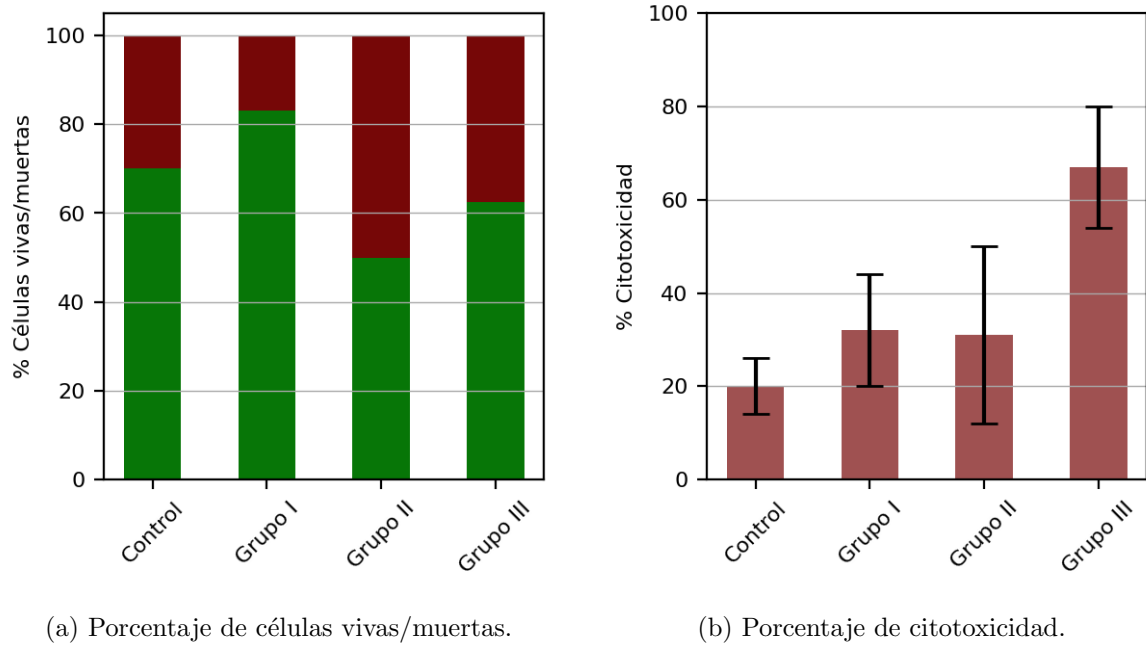


Figura 4-15.: Resultados de muerte celular y porcentaje de Citotoxicidad de cada grupo de esferoides expuestos a los tratamientos de radiación.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1. Conclusiones

En este trabajo se presentan los resultados de la caracterización de la temperatura inducida en esferoides de cáncer de mama expuestos a un sistema de hipertermia por microondas mediante el uso de sensores ópticos tipo FBG.

Los experimentos realizados permiten evidenciar la practicidad de las impresoras 3D para diseñar e implementar alternativas a las placas de cultivo convencionales empleadas en el estudio de cultivos celulares. Las placas resultantes son personalizables, de bajo costo y fáciles de construir. A su vez, satisfacen los requerimientos de biocompatibilidad, resistencia a la biodegradación y condiciones de esterilidad requeridos en instrumentos que entran en contacto con muestras biológicas. Como una ventaja adicional posibilitan la inserción de sensores, de manera que la placa es adaptable a una tarea de medición específica, para este caso en particular, la medición de temperatura en pruebas de radiación por microondas.

Por otra parte, la apropiada caracterización y calibración de los sensores FBGs embebidos en las placas de cultivo, hace posible monitorear la temperatura en tiempo real durante las pruebas de radiación por microondas. La medición de temperatura en tiempo real permite controlar los periodos de funcionamiento del sistema de radiación, de tal forma que es posible evitar llegar a temperaturas que resulten perjudiciales tanto para los resultados que se esperan de los esferoides (evitar alcanzar temperaturas de ablación térmica) como para la placa de cultivo.

El uso del sistema de radiación con magnetrón permite obtener cambios de temperatura considerables en intervalos cortos de tiempo, con la desventaja de que no es posible controlar la potencia con la que se radian las muestras. Por otra parte el sistema de radiación con AES permite el control de la potencia de radiación para poder elevar la temperatura de los esferoides a rangos de temperatura de hipertermia. Sin embargo, requiere operar a máxima potencia (30 W), además tiene limitación en la distancia de exposición a la cual se encuentra el cultivo celular (8 cm para el AES, en comparación con 20 cm para el magnetrón). Respecto de los tiempos de exposición el sistema de radiación con AES requiere tiempos más prolongados (15 minutos para el AES, en comparación con los 3 minutos requeridos en el caso del magnetrón).

A pesar de que este trabajo no está centrado en la evaluación de la muerte celular por hipertermia, se pudo evidenciar la relación entre el aumento de temperatura por radiación y la muerte celular en esferoides de cáncer de mama de la línea celular MCF7.

5.2. Trabajo futuro

Como primera observación, se recomienda realizar más pruebas de radiación. para evaluar con una muestra significativa la muerte celular causada directamente por el proceso de radiación.

La potencia de radiación de 1000 W que ofrece el magnetrón, da la posibilidad de considerar el uso de un divisor de guía de onda, de manera que la potencia pueda ser distribuida en múltiples aplicadores. Esto permitiría tener diferentes puntos de exposición para el calentamiento de la placa de cultivo, otra posibilidad a tener en cuenta es la de tener múltiples AES. También se considera el uso de antenas más directivas de manera que al ser posicionadas alrededor de la placa de cultivo se logre obtener un patrón de radiación más uniforme en todos los pozos, lo que a su vez permita un mejor control en la temperatura.

Se sugiere el recubrimiento de los sensores FBG con un polímero que permita protegerlos del daño ambiental y del estrés mecánico. Adicionalmente, si este recubrimiento posee un coeficiente de expansión térmica mayor al de la sílica, sería haría posible amplificar el estrés térmico inducido en el sensor aumentando su sensibilidad a la temperatura.

Otras recomendaciones son: Automatizar los procesos de control de altura y posicionamiento del aplicador a la placa de cultivo, esto con la finalidad de asegurar repetibilidad en las muestras. Mejorar el proceso de manipulación de los esferoides de manera que no presenten cambios bruscos de temperatura durante su traslado de la incubadora a las placas de cultivo. Incluir más sensores FBGs en las placas de manera que sea posible tener un mejor conocimiento de la distribución de la temperatura.

A. Anexo: Explicación fuentes de microondas

A.1. El Magnetron

El magnetron moderno, desarrollado en el año 1940, es el primer dispositivo microondas realmente práctico y ha sido uno de los principales componentes en las operaciones de radar desde su introducción por los británicos y su subsecuente desarrollo, logrado principalmente en los Estados Unidos y en el Reino Unido durante la segunda guerra mundial [56]. Desde entonces muchos dispositivos microondas han sido desarrollados para la generación y la amplificación de la radiación microondas. Ahora bien, aunque en los últimos años, los dispositivos de estado sólido han estado ocupando muchas áreas que alguna vez estuvieron reservadas para los tubos de microondas; estos últimos tienen ciertas propiedades únicas que hacen poco probable que sean reemplazados del todo por los dispositivos de estado sólido, especialmente en el dominio de la alta potencia (1 kW a 10 MW) o el de las altas frecuencias (de 1 GHz en adelante) [62].

A.1.1. Principio de funcionamiento

En teoría el funcionamiento del magnetron se basa en el movimiento de electrones ante la influencia de campos eléctricos y magnéticos. Para que el tubo funcione, los electrones deben fluir desde el cátodo hasta el ánodo, movimiento que se encuentra gobernado bajo las siguientes dos leyes básicas [55]:

1. La fuerza ejercida por un campo eléctrico sobre un electrón es proporcional a la fuerza del campo. Los electrones tienden a moverse desde un punto con potencial negativo hacia un punto con potencial positivo [55].
2. La fuerza ejercida sobre un electrón en un campo magnético está en ángulo recto tanto con el campo mismo como con la trayectoria del electrón. La dirección de la fuerza es tal que el electrón se dirige hacia el ánodo describiendo una curva en vez de ir en línea recta [55].

El proceso comienza con un voltaje bajo siendo aplicado al filamento del magnetron el cual provoca que este se caliente, el voltaje en el filamento usualmente ronda entre los 3 a los 4

VAC dependiendo de la marca y el modelo, En el magnetron el filamento es también el cátodo, así que el incremento de temperatura provoca un incremento de la actividad molecular del cátodo hasta el punto en el que este comienza a emitir electrones. Los electrones que salen de la superficie del filamento calentado podrían compararse con las moléculas que salen de la superficie del agua hirviendo en forma de vapor. Sin embargo, los electrones a diferencia de las moléculas de agua, no se evaporan; estos simplemente flotan sobre la superficie del cátodo esperando un impulso.

Los electrones al ser cargas negativas, son fuertemente repelidos por otras cargas negativas. De manera que esta nube flotante de electrones puede ser repelida por un cátodo cargado negativamente. La distancia y la velocidad de su viaje aumentan con la intensidad de la carga negativa aplicada. Por lo tanto, el momento lo proporcionan 4000 voltios DC los cuales se obtienen por medio de un transformador de alto voltaje y la acción duplicadora del diodo y del capacitor que conforman el circuito que alimenta al magnetron, ver figura A-1. Vale la pena notar que el transformador posee un devanado adicional que brinda el voltaje necesario para calentar el filamento del magnetron.

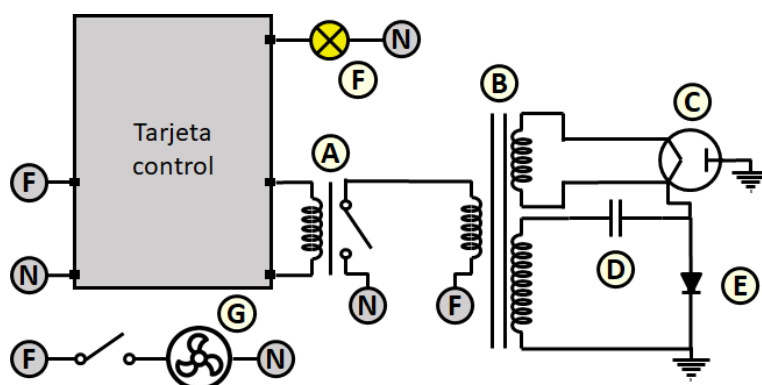


Figura A-1.: Circulos amarillos: A) Relé, B) Transformador de alto voltaje, C) Magnetron, D) Condensador de alto voltaje, E) Diodo F) Lámpara G) Ventilador. Circulos grises: F) Conexión a Fase. N) Conexión a Neutro. Esquema del circuito requerido para alimentar al magnetron.

En cada cavidad resonante del tubo del magnetron, las paredes actúan como un inductor, mientras que los lados paralelos de las aberturas conforman las placas de un condensador, dado que la magnitud de la inductancia y la capacitancia es muy pequeña, la frecuencia de la corriente alterna es muy alta. Las oscilaciones electromagnéticas producidas en las cavidades resonantes son luego interceptadas por la antena que se encargará de acoplar la energía en una guía de onda.

Guía de onda

La energía microondas no puede viajar a través de un conductor sólido, por lo que la antena irradia la potencia de RF en una guía de onda. La guía de onda, por lo general es un tubo de metal hueco que transporta la energía microondas a la cavidad del horno. La mayoría de los hornos de microondas utilizan una guía de onda rectangular, a través de la cual viajan

las ondas de energía reflejándose de lado a lado en un patrón en zigzag.

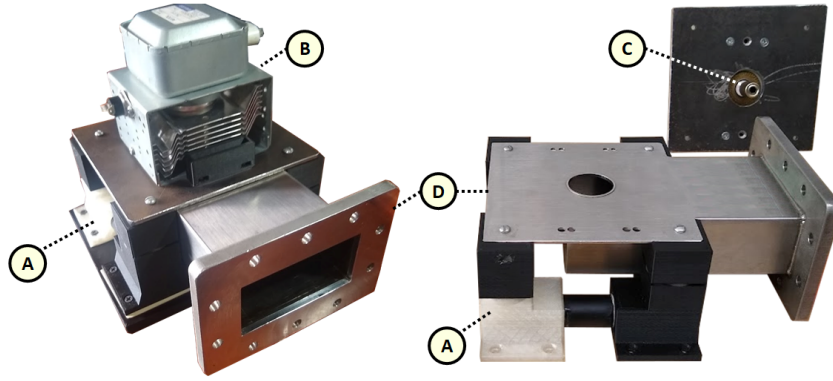


Figura A-2.: A) Soporte Launcher, B) Magnetron, C) Antena magnetron, D) Launcher. Launcher empleado para adaptar la antena del magnetron al utilizado en las pruebas de radiación

Para esta aplicación en particular se hace uso de un launcher WR 340 que para términos prácticos es una guía de onda rectangular con un ancho a de 86.36 mm y una altura b de 43.18 mm , esta opera en el rango de frecuencias de 2.2 a 3.3 GHz . Su frecuencia de corte para el modo TE_{10} es de 1.735 GHz lo que hace que actúe como un filtro pasa altas con frecuencia de corte de 1.735 GHz , ésta en vez de transportar la energía microondas a una cavidad resonante, la envía al espacio libre por medio de una antena tipo bocina piramidal.

A.2. Amplificador de estado sólido AES

En la figura A-3 se muestra un AES con sus componentes principales, primero la señal ingresa a un preamplificador, este se encarga de convertir las señales débiles de entrada en unas lo suficientemente fuertes para su posterior procesamiento, además de hacerlas menos tolerantes al ruido, sin la presencia de este la señal final resultante sería ruidosa o distorsionada. Luego la señal pasa a un amplificador driver encargado de brindar la corriente necesaria a la frecuencia de operación seleccionada, de manera que sea capaz de alimentar una carga de baja impedancia, en este caso los divisores de potencia [54].

Los divisores de potencia, como su nombre lo indica, dividen y distribuyen la potencia de la señal resultante del amplificador driver en n canales que a su vez están conectados a n módulos amplificadores de RF. Los módulos amplificadores de RF se encargan de proteger, alimentar y alojar a los transistores, además de acondicionar la señal a la entrada de los mismos. Gracias a los últimos desarrollos en transistores de alta potencia como lo son los LDMOS (Laterally-Difused Metal-Oxide Semiconductor) y en particular con la llegada de los dispositivos MOSFET de sexta generación es posible obtener potencias de salida de cientos de watts hasta 1 kW en onda continua con frecuencias de operación de hasta 1 GHz , estos transistores son fabricados por NXP y Freescale semiconductor Inc [54].

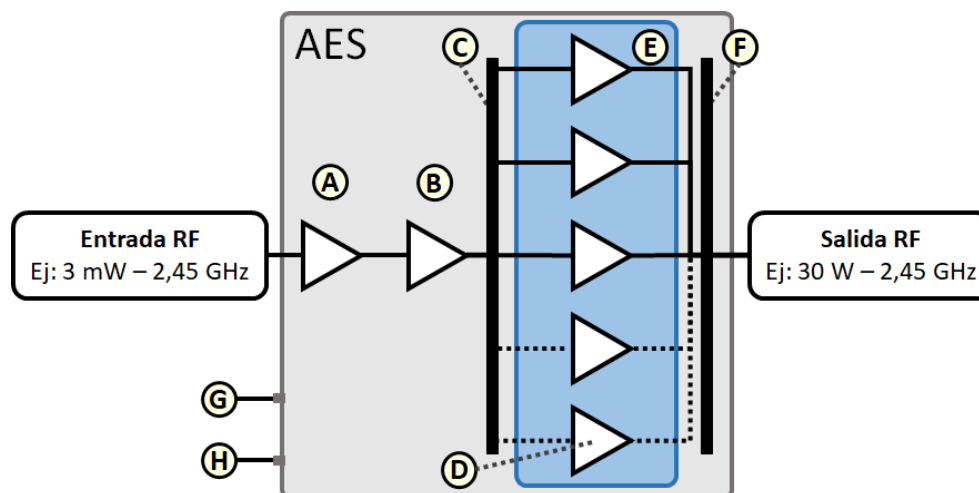


Figura A-3.: Principales componentes de un AES. A) Preamplificador, B) Amplificador driver, C) Divisor de potencia de n salidas, D) Modulo amplificador de RF, E) Sistema de refrigeración, F) Combinador de potencia de n entradas, G) Entrada del sistema convertidor de potencia, H) Entrada de control.

La salida de estos módulos amplificadores es recombinaada por medio de un combinador de potencia, luego la señal resultante es acoplada a un conector coaxial de RF o a un alimentador de guía de onda de RF. Un sistema convertidor de potencia suministra potencia DC a los módulos amplificadores, otra entrada del AES permite controlar algunos parámetros del amplificador y finalmente un sistema de refrigeración evita que los módulos amplificadores de RF se sobrecalienten [54].

La información presentada en esta sección da una perspectiva más general a lo que son los AES, sin embargo, el AES empleado, como se mencionó en la sección 4.1 es de la marca Mini-Circuits modelo ZHL-30W-262-S+, de manera que los esquemas electrónicos de este producto son parte de la propiedad intelectual de la empresa, lo que hace difícil conocer a más detalle su configuración.

Guía de onda

El AES de Mini-Circuits tiene una potencia máxima de salida de 30 W y opera en frecuencias desde los 2.3 GHz a los 2.5 GHz, se especifica que la magnitud de la señal de RF a la entrada no debe exceder los 9 dBm, el puerto de salida del AES es un conector coaxial SMA, por lo que se hace uso de un adaptador de cable coaxial a guía de onda para poder alimentar de esta manera a la Antena tipo Bocina encargada de irradiar la placa de cultivo.

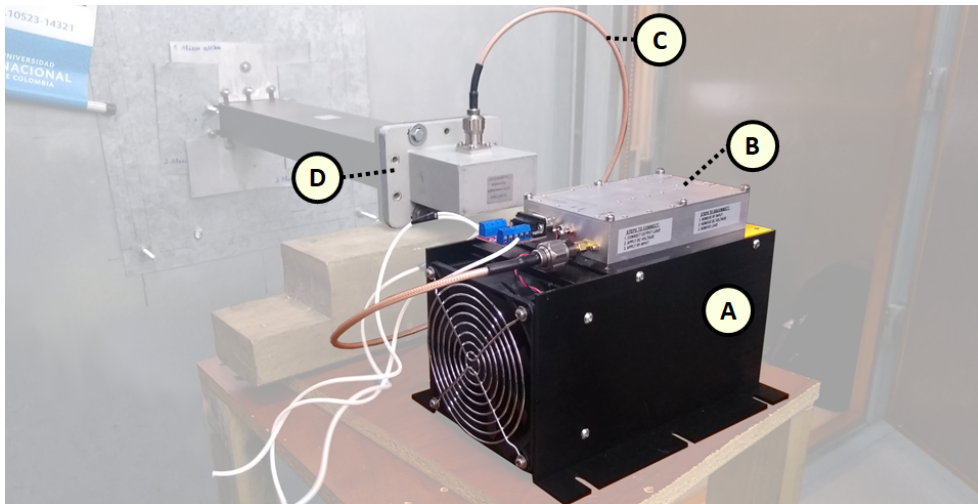


Figura A-4.: Esquema de conexión para adaptar la salida del AES la cual es SMA a una conexión de guía de onda. **A)** Sistema de refrigeración, **B)** AES, **C)** Cable coaxial, **D)** Adaptador de cable coaxial a guía de onda.

B. Anexo: Código implementado en Python

```
1 import memmertizer as mem
3 DEBUG = False
# -----
5 minutes = 120
experimento = {"25" : 180,
7             "28" : 180,
9             "30" : minutes,
11            "35" : minutes,
13            "40" : minutes,
15            "45" : minutes,
17            "50" : minutes,
19            "44" : minutes,
21            "29" : minutes,
23            "20" : 300}
# -----
17 URL = "http://192.168.100.100/atmoweb?Temp1Read="
file = "cultivo.txt"
19 rt = mem.RepeatedTimer(1, mem.dataMiner, URL, file, DEBUG)
# -----
21 for temperatura in experimento:
    mem.setTemp(temperatura, DEBUG)
23     mem.waitMin(experimento[temperatura])
# -----
25 rt.stop()
```

Código B.1: Script en python que define la rutina que llevará a cabo el horno para la caracterización de los sensores

```
1 import requests
import re
3 import datetime
from threading import Timer
5 from time import sleep

7 class RepeatedTimer(object):
    def __init__(self, interval, function, *args, **kwargs):
```

```

9         self._timer         = None
10        self.interval       = interval
11        self.function       = function
12        self.args           = args
13        self.kwargs         = kwargs
14        self.is_running     = False
15        self.start()

17    def _run(self):
18        self.is_running = False
19        self.start()
20        self.function(*self.args, **self.kwargs)

21    def start(self):
22        if not self.is_running:
23            self._timer = Timer(self.interval, self._run)
24            self._timer.start()
25            self.is_running = True

27    def stop(self):
28        self._timer.cancel()
29        self.is_running = False

31    def setTemp(temp, DEBUG):
32        if (DEBUG):
33            print ("Este es un valor de prueba para " + temp + " grados celsius")
34        else:
35            URL = "http://192.168.100.100/atmoweb"
36            temperatura = temp
37            PARAMS = {"TempSet":temperatura}
38            try:
39                r = requests.get(url = URL, params = PARAMS)
40                print (r.url)
41            except requests.exceptions.ConnectionError as e:
42                print ("No se pudo realizar la conexion")
43                print (e)

45    def dataMiner(URL, file , DEBUG):
46        if(DEBUG): URL = "https://20dicprueba.github.io/temp.html"
47        if(DEBUG==False): URL = URL
48        try:
49            r = requests.get(URL)
50            data = r.text
51            dataArray=re.split(':', '|',data)
52            dateTimeObj=datetime.datetime.now()
53            timestampStr = dateTimeObj.strftime("%d/%m/%Y %H:%M:%S.%f")
54            textDoc = open(file, 'a')
55            textDoc.write("%s %s\n"%(timestampStr, dataArray[1]))

```

```

57     textDoc.close()
        print(dataArray[1])
59     except requests.exceptions.ConnectionError as e:
        print("No se pudo realizar la conexion")
61         print(e)

63 def waitMin(minutes):
    sleep(minutes*60)

65 def waitSec(seconds):
    sleep(seconds)

67 def hello(name):
    print("Hello %s!" % name)

```

Código B.2: Módulo de python que contiene las funciones necesarias para controlar el horno ademas de otras funciones empleadas para el manejo del tiempo.

```

import pandas as pd
2 import matplotlib.pyplot as plt
import numpy as np
4 import sys
from scipy import arange

6
import matplotlib
8 import Hefesto as EFE
import time

10
# Nombre del archivo
12 file = "Peaks.20220819121723.txt"
# Ubicacion del archivo en la carpeta de ENLIGHT
14 path = "G:/Documentos/07_Maestria/Hyperthermia/Pruebas/RealTimePlotter/Update/"
    + file

16 x = np.arange(0,600,1)/60
y1 = 0*x
18 y2 = 0*x
y3 = 0*x
20 y4 = 0*x

22 # Para ejecutar el bucle de eventos en la GUI
    _____

plt.ion()

24
# Definicion de las rectas del gráfico
    _____

26 figure , ax = plt.subplots(figsize=(10, 6))
line1 , = ax.plot(x, y1, color=EFE.colorBrown)

```

```

28 line2 , = ax.plot(x, y2, color=EFE.colorBlue)
line3 , = ax.plot(x, y3, color=EFE.colorYellow)
30 line4 , = ax.plot(x, y4, color=EFE.colorOrange)

32 # Propiedades del gráfico
_____
# Título
_____
34 plt.title("Prueba hipertermia", fontsize=20)
# Rejilla
36 plt.minorticks_on()
plt.grid(which='major', linestyle='-', linewidth='0.5', color=EFE.
        colorDarkGray)
38 plt.grid(which='minor', linestyle=':', linewidth='0.5', color=EFE.colorGray)
# Etiqueta de los ejes
_____
40 plt.xlabel("Tiempo")
plt.ylabel("Temperatura")
42 plt.ylim([20, 60])

44 # Loop
46 for _ in range(50):
    # Creacion de los nuevos valores del gráfico
    _____
48     dataI = pd.read_csv(path, delim_whitespace=True, decimal=",",
                          skiprows=34)

50
52     skipBase = 0

54     dataI = dataI.reset_index()
Pwv = dataI.iloc[skipBase:len(dataI),[3,5,7,9]]
Pwv = Pwv.rename(columns={"level_3":"PwvA", "level_5":"PwvB", "Timestamp":
"PwvC", "CH":"PwvD"})
56     Pwv = Pwv.reset_index(drop=True)

58     # Para considerar solo la variación en la longitud de onda
    _____
60     for key in Pwv.keys():
        Pwv[key]=(Pwv[key] - Pwv[key][0]) *1000

62
64     Ptp = EFE.tempApprox(Pwv)
Ptp = Ptp.rename(columns={"PwvA":"PtpA", "PwvB":"PtpB", "PwvC":"PtpC", "
PwvD":"PtpD"})

66
    if len(Ptp) < 600:

```

```

68     new_y1 = 22+Ptp["PtpA"]
69     new_y1.values.resize(y1.shape)
70     new_y2 = 22+Ptp["PtpB"]
71     new_y2.values.resize(y1.shape)
72     new_y3 = 22+Ptp["PtpC"]
73     new_y3.values.resize(y1.shape)
74     new_y4 = 22+Ptp["PtpD"]
75     new_y4.values.resize(y1.shape)
76
77     else:
78         alt_y1 = 22+Ptp["PtpA"]
79         new_y1 = alt_y1[-600:]
80         alt_y2 = 22+Ptp["PtpB"]
81         new_y2 = alt_y2[-600:]
82         alt_y3 = 22+Ptp["PtpC"]
83         new_y3 = alt_y3[-600:]
84         alt_y4 = 22+Ptp["PtpD"]
85         new_y4 = alt_y4[-600:]
86
87     # Actualizar los valores del gráfico
88     line1.set_xdata(x)
89     line1.set_ydata(new_y1)
90     line2.set_xdata(x)
91     line2.set_ydata(new_y2)
92     line3.set_xdata(x)
93     line3.set_ydata(new_y3)
94     line4.set_xdata(x)
95     line4.set_ydata(new_y4)
96
97     # Dibujar los nuevos valores en el gráfico
98     figure.canvas.draw()
99     figure.canvas.flush_events()
100
101     time.sleep(2)

```

Código B.3: Script en python que permite convertir las mediciones de longitud de onda del interrogador a mediciones de temperatura dibujando una gráfica en tiempo real.

Bibliografía

- [1] Lam F Ferlay J, Ervik M. Global cancer observatory: Cancer today. lyon, france: International agency for research on cancer, 2020.
- [2] NIH. Cirugía para tratar el cáncer, 2015. Instituto Nacional del Cáncer (NIH).
- [3] NIH. Quimioterapia para tratar el cáncer, 2015. Instituto Nacional del Cáncer (NIH).
- [4] NIH. Radioterapia para tratar el cáncer, 2019. Instituto Nacional del Cáncer (NIH).
- [5] INC. Plan nacional para el control del cáncer en colombia 2012-2020, 2012. Instituto Nacional de Cancerología - ESE (INC).
- [6] Helen HW Chen and Macus Tien Kuo. Improving radiotherapy in cancer treatment: promises and challenges. *Oncotarget*, 8(37):62742, 2017.
- [7] Catherine M Clavel, Patrycja Nowak-Sliwinska, Emilia Păunescu, and Paul J Dyson. Thermoresponsive fluorinated small-molecule drugs: a new concept for efficient localized chemotherapy. *MedChemComm*, 6(12):2054–2062, 2015.
- [8] S.K. Sharma, Navadeep Shrivastava, Francesco Rossi, Le Duc Tung, and Nguyen Thi Kim Thanh. Nanoparticles-based magnetic and photo induced hyperthermia for cancer treatment. *Nano Today*, 29:100795, 2019.
- [9] CM Van Leeuwen, AL Oei, R Ten Cate, NAP Franken, A Bel, LJA Stalpers, J Crezee, and HP Kok. Measurement and analysis of the impact of time-interval, temperature and radiation dose on tumour cell survival and its application in thermoradiotherapy plan evaluation. *International Journal of Hyperthermia*, 34(1):30–38, 2018.
- [10] Sarah C Brüningk, Peter Ziegenhein, Ian Rivens, Uwe Oelfke, and Gail Ter Haar. A cellular automaton model for spheroid response to radiation and hyperthermia treatments. *Scientific reports*, 9(1):1–12, 2019.
- [11] JE Chong, L Leija, CP Pennisi, and WH Fonseca. Optical fiber based thermometry system for a hyperthermia laboratory. In *2001 Conference Proceedings of the 23rd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, volume 3, pages 3036–3039. IEEE, 2001.

- [12] Tomohiro Matta, Hideki Fukano, and Shuji Taue. Simultaneous operation of laser ablation and temperature monitor using single optical fiber for hyperthermia. In *2017 Conference on Lasers and Electro-Optics Pacific Rim*, page s1661. Optica Publishing Group, 2017.
- [13] Nicolas Ospina Mendivelso, C. Camilo Cano, Juan Coronel-Rico, Hector Fabian Guarino, and Margarita Varón Duran. Fbg sensors for temperature measurements in microwave irradiated breast phantoms. In *Optical Fiber Sensors Conference 2020 Special Edition*, page Th4.50. Optical Society of America, 2020.
- [14] Sarah Catharina Brüningk, Jannat Ijaz, Ian Rivens, Simeon Nill, Gail Ter Haar, and Uwe Oelfke. A comprehensive model for heat-induced radio-sensitisation. *International Journal of Hyperthermia*, 34(4):392–402, 2018.
- [15] H Petra Kok, Johannes Crezee, Nicolaas AP Franken, Lukas JA Stalpers, Gerrit W Barendsen, and Arjan Bel. Quantifying the combined effect of radiation therapy and hyperthermia in terms of equivalent dose distributions. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 88(3):739–745, 2014.
- [16] Neil T Wright. Comparison of models of post-hyperthermia cell survival. *Journal of Biomechanical Engineering*, 135(5), 2013.
- [17] Yusheng Feng, J Tinsley Oden, and Marissa Nichole Rylander. A two-state cell damage model under hyperthermic conditions: theory and in vitro experiments. 2008.
- [18] Michael A Mackey and Joseph L Roti Roti. A model of heat-induced clonogenic cell death. *Journal of theoretical biology*, 156(2):133–146, 1992.
- [19] R Gassino, A Vallan, G Perrone, M Konstantaki, and S Pissadakis. Characterization of fiber optic distributed temperature sensors for tissue laser ablation. In *2017 IEEE International Instrumentation and Measurement Technology Conference (I2MTC)*, pages 1–5. IEEE, 2017.
- [20] Pablo Pérez, Juan Alfonso Serrano, and Alberto Olmo. 3d-printed sensors and actuators in cell culture and tissue engineering: framework and research challenges. *Sensors*, 20(19):5617, 2020.
- [21] Luca Schenato, Qiangzhou Rong, Zhihua Shao, Xueguang Quiao, Alessandro Pasuto, Andrea Galtarossa, and Luca Palmieri. Highly sensitive fbg pressure sensor based on a 3d-printed transducer. *J. Lightwave Technol.*, 37(18):4784–4790, Sep 2019.
- [22] Matthew Mallory, Emile Gogineni, Guy C Jones, Lester Greer, and Charles B Simone II. Therapeutic hyperthermia: The old, the new, and the upcoming. *Critical reviews in oncology/hematology*, 97:56–64, 2016.

-
- [23] Hernan I Vargas, William C Dooley, Robert A Gardner, Katherine D Gonzalez, Rose Venegas, Sylvia H Heywang-Kobrunner, and Alan J Fenn. Focused microwave phased array thermotherapy for ablation of early-stage breast cancer results of thermal dose escalation. *Annals of surgical oncology*, 11(2):139–146, 2004.
- [24] Zhaleh Behrouzkhia, Zahra Joveini, Behnaz Keshavarzi, Nazila Eyvazzadeh, and Reza Zohdi Aghdam. Hyperthermia: how can it be used? *Oman medical journal*, 31(2):89, 2016.
- [25] Eduardo Moros. *Physics of thermal therapy : fundamentals and clinical applications*. Imaging in medical diagnosis and therapy. CRC/Taylor and Francis, 2013.
- [26] Phong Thanh Nguyen, Amin Abbosh, and Stuart Crozier. Microwave hyperthermia for breast cancer treatment using electromagnetic and thermal focusing tested on realistic breast models and antenna arrays. *IEEE Transactions on antennas and propagation*, 63(10):4426–4434, 2015.
- [27] John Stang, Mark Haynes, Paul Carson, and Mahta Moghaddam. A preclinical system prototype for focused microwave thermal therapy of the breast. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 59(9):2431–2438, 2012.
- [28] Lifan Xu and Xiong Wang. Comparison of two optimization algorithms for focused microwave breast cancer hyperthermia. In *2018 International Applied Computational Electromagnetics Society Symposium-China (ACES)*, pages 1–2. IEEE, 2018.
- [29] Rafael Zamorano Ulloa, Ma Guadalupe Hernandez Santiago, and Veronica L Villegas Rueda. The interaction of microwaves with materials of different properties. In *Electromagnetic Fields and Waves*. InTech, 2019.
- [30] Byoung-ho Lee. Review of the present status of optical fiber sensors. *Optical fiber technology*, 9(2):57–79, 2003.
- [31] Yang Du, Qingbo Yang, and Jie Huang. Soft prosthetic forefinger tactile sensing via a string of intact single mode optical fiber. *IEEE Sensors Journal*, 17(22):7455–7459, 2017.
- [32] Vineet Kumar Rai. Temperature sensors and optical sensors. *Applied Physics B*, 88(2):297–303, 2007.
- [33] Davide Polito, Michele Arturo Caponero, Andrea Polimadei, Paola Saccomandi, Carlo Massaroni, Sergio Silvestri, and Emiliano Schena. A needlelike probe for temperature monitoring during laser ablation based on fiber bragg grating: Manufacturing and characterization. *Journal of Medical Devices*, 9(4), 2015.

- [34] D. Tosi, E.G. Macchi, G. Braschi, M. Gallati, A. Cigada, S. Poeggel, G. Leen, and E. Lewis. Monitoring of radiofrequency thermal ablation in liver tissue through fibre bragg grating sensors array. *Electronics Letters*, 50(14):981–983, 2014.
- [35] Giovanna Palumbo, Agostino Iadicicco, Daniele Tosi, Paolo Verze, Nicola Carlomagno, Vincenzo Tammaro, Juliet Ippolito, and Stefania Campopiano. Temperature profile of ex-vivo organs during radio frequency thermal ablation by fiber bragg gratings. *Journal of Biomedical Optics*, 21:117003, 11 2016.
- [36] Eigil Samset, Tom Mala, Reinold Ellingsen, I Gladhaug, O Soreide, and Erik Fosse. Temperature measurement in soft tissue using a distributed fibre bragg-grating sensor system. *Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies*, 10:89–93, 03 2001.
- [37] Indu Fiesler Saxena, Kaleo Hui, and Melvin Astrahan. Polymer coated fiber bragg grating thermometry for microwave hyperthermia. *Medical physics*, 37(9):4615–4619, 2010.
- [38] Nicolas Ospina Mendivelso, C. Camilo Cano, Juan Coronel-Rico, Hector Fabian Guar-nizo, and Margarita Varón Duran. Optical fiber bragg grating sensors for tempera-ture measurements in the hyperthermia treatment. In *Proceedings, Latin American Workshop on Optical Fiber Sensors*, 2019.
- [39] Mariya Lazebnik, Ernest L Madsen, Gary R Frank, and Susan C Hagness. Tissue-mimicking phantom materials for narrowband and ultrawideband microwave applica-tions. *Physics in Medicine & Biology*, 50(18):4245, 2005.
- [40] Alexis I Farrer, Henrik Odéen, Joshua de Bever, Brittany Coats, Dennis L Parker, Allison Payne, and Douglas A Christensen. Characterization and evaluation of tissue-mimicking gelatin phantoms for use with mrgfus. *Journal of therapeutic ultrasound*, 3(1):9, 2015.
- [41] Jill Van der Zee. Heating the patient: a promising approach? *Annals of oncology*, 13(8):1173–1184, 2002.
- [42] Emma MN Polman, Gert-Jan M Gruter, John R Parsons, and Albert Tietema. Com-parison of the aerobic biodegradation of biopolymers and the corresponding bioplastics: A review. *Science of the Total Environment*, 753:141953, 2021.
- [43] Evangelia Balla, Vasileios Daniilidis, Georgia Karlioti, Theocharis Kalamas, Myrika Stefanidou, Nikolaos D Bikiaris, Antonios Vlachopoulos, Ioanna Koumentakou, and Dimitrios N Bikiaris. Poly (lactic acid): A versatile biobased polymer for the future with multifunctional properties—from monomer synthesis, polymerization techniques and molecular weight increase to pla applications. *Polymers*, 13(11):1822, 2021.

-
- [44] Sithira H Ratnayaka, Taylor E Hillburn, Omid Forouzan, Sergey S Shevkoplyas, and Damiir B Khismatullin. Pdms well platform for culturing millimeter-size tumor spheroids. *Biotechnology progress*, 29(5):1265–1269, 2013.
- [45] John G Lock, Bernhard Wehrle-Haller, and Staffan Strömblad. Cell–matrix adhesion complexes: master control machinery of cell migration. In *Seminars in cancer biology*, volume 18, pages 65–76. Elsevier, 2008.
- [46] S. Iannace, L. Sorrentino, and E. Di Maio. 6 - biodegradable biomedical foam scaffolds. In Paolo A. Netti, editor, *Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications*, pages 163–187. Woodhead Publishing, 2014.
- [47] Yun-Jiang Rao. In-fibre bragg grating sensors. *Measurement science and technology*, 8(4):355, 1997.
- [48] David A Krohn, Trevor MacDougall, and Alexis Mendez. In-fiber grating optic sensors. In *Fiber optic sensors: fundamentals and applications*, chapter 4, pages 110–154. Spie Press Bellingham, WA, 2014.
- [49] Shizhuo Yin and TS Francis. Wavelength-modulated sensors. In *Fiber optic sensors*, chapter 5, pages 63–77. CRC press, 2002.
- [50] Günther Wehrle, Percy Nohama, Hypolito José Kalinowski, Pedro Ignacio Torres, and Luiz Carlos Guedes Valente. A fibre optic bragg grating strain sensor for monitoring ventilatory movements. *Measurement Science and Technology*, 12(7):805, 2001.
- [51] German Alvarez-Botero, Fabian E. Baron, C. Camilo Cano, Oscar Sosa, and Margarita Varon. Optical sensing using fiber bragg gratings: Fundamentals and applications. *IEEE Instrumentation & Measurement Magazine*, 20(2):33–38, 2017.
- [52] Technica. *FBGs array*, 9 2021.
- [53] Ramon Pallas-Areny and John G Webster. Introduction to sensor-based measurement systems. In *Sensors and signal conditioning*, chapter 1, pages 1–73. John Wiley & Sons, 2 edition, 2012.
- [54] J Jacob. Radio frequency solid state amplifiers. *arXiv preprint arXiv:1607.01570*, 2016.
- [55] J Carlton Gallawa. *The Complete Microwave Oven Service Handbook: Operation, Maintenance, Troubleshooting, and Repair*. Prentice Hall, 1989.
- [56] G. Mourier (Eds.). *Crossed-field Microwave Device. Principal Elements of Crossed-Field Devices*. Crossed-field microwave devices, v. 1. Academic Press, 1961.
- [57] Sally P Wheatley and Denys N Wheatley. Transporting cells over several days without dry-ice. *Journal of Cell Science*, 132(21):jcs238139, 2019.

-
- [58] Lynne S Garcia. *Clinical microbiology procedures handbook*, volume 1. American Society for Microbiology Press, 2010.
- [59] Claudia Campos Liste et al. Aplicación de la técnica de citometría de flujo al control de un cultivo iniciador de *Lactobacillus casei* en la industria láctea. 2012.
- [60] Jenna Bleloch. Cell culture basics: Equipment, fundamentals and protocols. *Cell Science from Technology Networks*, May 2021.
- [61] Maria del Carmen Rodríguez-Salazar, Moises Armides Franco-Molina, Edgar Mendoza-Gamboa, Ana Carolina Martínez-Torres, Pablo Zapata-Benavides, Jose Sullivan López-González, Erika Evangelina Coronado-Cerda, Juan Manuel Alcocer-González, Reyes Silvestre Tamez-Guerra, and Cristina Rodríguez-Padilla. The novel immunomodulator immunepotent crp combined with chemotherapy agent increased the rate of immunogenic cell death and prevented melanoma growth. *Oncology letters*, 14(1):844–852, 2017.
- [62] Lili Ma. *3D computer modeling of magnetrons*. PhD thesis, 2005.