

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
LICENCIATURA EN BIOINGENIERÍA MÉDICA
DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN PROFESIONAL



**EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS EN LA FOTOPORACIÓN DE
CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA MEDIADA POR LÁSER.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOINGENIERÍA MÉDICA**

PRESENTA

PLBM. ELSY YANDELIN GARDUÑO RIOS

DIRECTORA DE TESIS

DRA. EN C. NALLELY PATRICIA JIMENEZ MANCILLA

CODIRECTORA DE TESIS

DRA. EN Q. KEILA ISAAC OLIVÉ

REVISORA

DRA. EN I.M. BEATRIZ ELINA MARTÍNEZ CARILLO

TOLUCA, MÉXICO A ABRIL DE 2024

TÍTULO

**EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS EN LA
FOTOPORACIÓN DE CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA
MEDIADA POR LÁSER.**

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
Capítulo 1. ESTADO DEL ARTE	3
1.1 Antecedentes	3
1.2 Planteamiento del Problema	5
Pregunta de investigación	5
1.3 Justificación	6
1.4 Hipótesis	6
1.5 Objetivos	7
Objetivo General	7
Objetivos Específicos	7
Capítulo 2. MARCO TEÓRICO	8
2.1 La célula	8
Células de cáncer	9
2.2 Membrana celular	9
Membrana celular de células de cáncer	11
2.3 Cáncer de Próstata	13
Células PC3	13
2.4 Fotoporación	14
Mecanismos formadores de poros	15
2.5 Láser	17
Características Físicas del Láser	18
Aplicaciones Médicas del láser	22
Láser Nd:YAG	23
Capítulo 3. MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1 Materiales	25
3.2 Métodos	25
Láser Nd:YAG (Quantel, Q-smart 100)	25
Medición de la temperatura	27
Cultivos celulares, células PC3	27
Irradiación láser	29
Ensayo de viabilidad celular post-irradiación láser	30
Monitorear de la temperatura en la irradiación láser	31
Ensayo de inmunofluorescencia celular post-irradiación láser	31

Capítulo 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1 Habilitación del láser.....	33
4.2 Monitoreo de la temperatura.....	34
4.3 Ensayo de viabilidad.....	37
4.5 Ensayo de inmunofluorescencia	45
Capítulo 5. CONCLUSIONES	49
Capítulo 6. REFERENCIAS	50
Capítulo 7. ANEXOS.....	54
Anexo 1. Manual del laser Nd:YAG	55
Anexo 2. Código de Arduino y Termopar	59
Anexo 3. Células PC3 y medios de cultivo	60
Anexo 4. Metodología para imágenes de fluorescencia.	64

RESUMEN

La entrega de medicamentos en condiciones fisiológicas se enfrenta a barreras tanto físicas como biológicas las cuales limitan su acumulación en sitios específicos. La fotoporación mediada por irradiación láser es una técnica que permite la manipulación de la permeabilidad de la membrana celular mediante la formación de poros transitorios, sin embargo, dicha generación de poros está regida por los parámetros físicos y el tipo de láser empleado. Así bien, este proyecto tuvo como objetivo determinar los parámetros físicos de irradiación láser a 1064 nm y 532 nm para producir fotoporación en células de cáncer de próstata humano manteniendo una pérdida de viabilidad celular menor al 20%.

Para alcanzar este objetivo, se realizaron estudios de viabilidad celular utilizando el Kit Colorimétrico XTT tras irradiar células PC3 a las longitudes de onda de 532 y 1064 nm proporcionadas por el láser Nd:Yag (Quantel, Q-Smart 100), teniendo en cuenta variaciones en los parámetros de energía, frecuencia y tiempo de irradiación. Posteriormente, se realizó la evaluación de la producción de poros mediante imágenes de microscopía de fluorescencia tomando en cuenta las variaciones de los parámetros físicos que mostraron una pérdida de viabilidad inferior al 20%. Las imágenes de fluorescencia obtenidas con los colorantes DAPI y yoduro de propidio (PI) fueron analizadas y cuantificadas colorimétricamente en el software imageJ, teniendo en cuenta que el aumento de PI en el citoplasma de las células se debe a un efecto de fotoporación.

Como resultado de este proyecto se determinó que, la energía por pulso entregada en la longitud de onda de 1064 nm (115.5 mJ) aun con la frecuencia y tiempo más bajos se encontró fuera de rangos de aplicabilidad para fotoporación, según lo recomendado por diversos autores y corroborado con los resultados de viabilidad y temperatura obtenidos, ya que bajo esta irradiación la temperatura se incrementaba 30°C sobre la temperatura basal y la viabilidad se disminuía por debajo del 20%.

Para el caso de la irradiación a una longitud de onda de 532 nm, se determinó que la entrega de una densidad de energía de 120 mJ/cm² con nivel de energía 1 (3 mJ/pulso), frecuencia 5Hz y tiempo de irradiación 3 s, la intensidad de color debida al IP fue 56% mayor que el grupo control (grupo sin irradiación), lo que implica que el 56% de la población celular presento fotoporación y la viabilidad no se vio comprometida (99%) por lo que, estos parámetros de irradiación resultaron ser los más aceptables para generar fotoporación.

ABSTRACT

The delivery of drugs under physiological conditions is confronted with both physical and biological barriers that limit the accumulation of drugs at specific sites. Photoporation mediated by laser irradiation is a technique that allows to manipulate cell membrane permeability by forming transient pores, but such pore formation is governed by the physical parameters and the type of laser used. Therefore, the aim of this project was to determine the physical parameters of 1064nm and 532nm laser irradiation to induce photoporation in human prostate cancer cells with less than 20% cell viability loss.

To achieve this goal, cell viability studies were performed using the XTT Colorimetric Kit after irradiation of PC3 cells at wavelengths of 532 and 1064 nm delivered by a Nd:Yag laser (Quantel, Q-Smart 100), taking into account variations in the parameters of energy, frequency and irradiation time. Pore production was then evaluated using fluorescence microscopy images, taking into account variations in physical parameters that showed a loss of viability of less than 20%. The fluorescence images obtained with DAPI and propidium iodide (PI) dyes were analyzed and quantified colorimetrically using imageJ software. The increase in PI in the cytoplasm of the cells was considered to be due to a photoporation effect.

As a result of this project, it was found that the energy per pulse delivered at 1064 nm wavelength (115.5 mJ), even at the lowest frequency and time, was outside the applicability range for photoporation as recommended by several authors and confirmed by the viability and temperature results obtained. Under this irradiation, the temperature increased 30°C above the basal temperature and viability decreased below 20%.

In the case of irradiation with a wavelength of 532 nm, it was found that the delivery of an energy density of 120 mJ/cm² with energy level 1 (3 mJ/pulse), frequency 5 Hz and irradiation time 3 s, the color intensity due to PI was 56% higher than the control group (no irradiation group), meaning that 56% of the cell population showed photoporation and viability was not affected (99%); thus, these irradiation parameters were the most acceptable to generate photoporation.

Capítulo 1. ESTADO DEL ARTE

1.1 ANTECEDENTES

La técnica de fotoporación se ha implementado en procesos de entrega e internalización de medicamentos en condiciones fisiológicas teniendo como base la creación de poros transitorios, es decir, de agujeros en la membrana celular mediante láser asistido, donde un haz o rayo firmemente enfocado o dirigido a la célula la irradia generando calor y manipulando así la permeabilidad de la membrana celular, permitiendo que moléculas externas se incorporen a la célula.(1)

Algunos procesos como la *electroporación*, *microinyección*, *pistola de genes*, *sonoporación* y *magnetoporación* se han implementado bajo los mismos fines de internalización celular. Sin embargo, estos procesos han resultado de cierta forma invasivos, con mala eficiencia de entrega y generando daño en la viabilidad de la célula.(2)

El proceso de fotoporación fue llamado *Optical injection* por Tirlapur y König en su proyecto en 2002, donde generaron transfección dirigida mediante láser de femtosegundos (fs) de alta intensidad de infrarrojo cercano, con longitud de onda de 800 nm, resultando en la formación de una única perforación transitoria específica en la membrana celular a través de la cual podía entrar ADN. (2)

Otro término para la fotoporación fue *Optical transfection* usado por Stevenson en 2010. En su estudio transfecto ADN por medio de un micro haz láser similar al usado en microscopía estándar, donde lo alineaba al plano de la imagen para poder observar fácilmente la célula durante la transfección.(3)

Un término más es la *Optoporación*, este fue empleado por Yao en 2020, en su investigación, expuso que el transporte intracelular de moléculas biológicamente activas es uno de los problemas clave en la administración de un fármaco y que recurrir a métodos de administración requiere de mucho tiempo y bajo rendimiento. Este problema podría solucionarse mediante la implementación de nanopartículas absorbentes (NP) irradiadas con luz láser de pulsos cortos que conducen a aumentos localizados y transitorios de la permeabilidad celular. (4)

En 2021, Durckertn en su investigación sobre *Optoinyección*, menciona que esta técnica bien podría referirse a la fotoporación u optoporación, ya que se trata de una inyección óptica en la que se condensa un pulso láser de alta intensidad en un punto submicrométrico de la célula, creando una herramienta de nanocirugía capaz de

diseccionar la membrana plasmática para la entrega de carga molecular en la célula. Con base a este estudio se desarrollaría una inyección óptica automatizada y mejorada con NP que podría procesar hasta 200 células por segundos. (5) Así, una vez mostrado que la fotoporación puede ser un método automatizado y de alto rendimiento, se concluyó que la fotoporación enfocada por láser inducía fotoablación y se generaba una onda de choque que provocaba una permeabilización temporal en las membranas de las células. (6)

En estudios actuales, se proponen aplicaciones avanzadas para la fotoporación sensibilizada con nanomateriales activadas por láser, lo que brinda la posibilidad de aumentar la eficiencia de entrega. La optimización de la fotoporación tiene como objetivo lograr altas tasas de administración y al mismo tiempo minimizar la muerte celular inmediata. (7)

Sin embargo, estas investigaciones no fueron las primeras en las que se implementó irradiación de luz láser en células. Ya que, una de las primeras investigaciones ocurrió en 1984 por Tsukakoshi, que debido al reciente desarrollo de la técnica de *micro-rayoláser*, decidió poner en práctica la microcirugía en detalle subcelular, sugiriendo el posible uso de luz láser enfocada como *microescalpelo* para estimular la transfección de ADN en un cultivo celular. En su investigación, empleó luz láser ultravioleta con longitud de onda de 355 nm y pulso de 5ns, como una aguja óptica para pinchar las células. Finalmente este método resultó tener una amplia aplicación en el campo de la biología celular como método práctico para transferir materiales citoplasmáticos. (8)

La elección de los métodos desarrollados en las diferentes investigaciones depende del objetivo del experimento y de la disponibilidad de los equipos empleados. Dejando en claro la implementación de un haz de luz láser como medio para la manipulación de la permeabilidad celular.

Así, ante los experimentos de fotoporación, se debe tener en cuenta cada factor interviniente para equilibrar la producción de poros y la viabilidad celular concluyendo que los parámetros empleados en la irradiación juegan un papel determinista en el éxito de la fotoporación.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Diferentes tipos de enfermedades, entre ellas el cáncer, producen cambios en las células que las lleva a ser más sensibles o resistentes a agentes físicos y/o químicos. Así, el éxito de la terapia dirigida se ve afectado por el acceso a la célula a tratar.

La fotoporación es un tipo de terapia génica que se ha empleado para la manipulación de la membrana celular como medio de administración física de fármacos con direccionamiento intracelular. Estudios previos han mostrado que estos procesos a menudo suelen ser difíciles de optimizar para mantener la formación de poros y mantener la viabilidad celular. (9)

Los dispositivos láser empleados en la fotoporación están basados en la variación de parámetros físicos como la longitud de onda, la frecuencia, el tiempo de irradiación y la energía del dispositivo. De esta manera, se tiene un número amplio de posibilidades de generar fotoporación conllevando a no conocer los parámetros ideales o específicos en la formación de poros.

Debido a lo anterior es necesario evaluar los parámetros a variar físicos del láser en los procesos de fototerapia, con el fin de identificar como se incrementa o disminuye la formación de poros en las células PC3 de cáncer de próstata mediante estudios de inmunofluorescencia y viabilidad.

Pregunta de investigación

¿Cómo afecta la variación de los parámetros físicos del láser Nd:YAG en las longitudes de onda de 1064 nm y 532 nm en la formación de poros en células de cáncer de próstata PC3 y en la viabilidad de las mismas?

1.3 JUSTIFICACIÓN

El cáncer de próstata (CaP) es una neoplasia hormono-dependiente que constituye la segunda causa de muerte en el hombre a nivel mundial y ocupa el quinto lugar de las causas por esta afección, con un estimado de 330 000 casos nuevos por año en el mundo. El CaP es la segunda neoplasia maligna más frecuente (después del cáncer de pulmón) en los hombres a nivel mundial. (10)

Los pacientes con CaP son tratados mediante terapias hormonales, ya sea supresión por orquiectomía, bloqueo androgénico completo o antiandrógenos. La duración de la respuesta al tratamiento es de 12 a 18 meses después de lo cual, de no haber remisión completa, el tumor puede progresar de nuevo y las opciones terapéuticas son más escasas.

Una de las líneas celulares más empleada en la experimentación de técnicas de tratamiento es la línea celular PC3, que son células de cáncer de próstata humano con receptor antígeno prostático específico de membrana (PSMA). En la actualidad, se ha implementado la fotoporación de células como una terapia alternativa para la introducción de material extracelular como material genético o fármacos, mediante el uso de láseres de femtosegundos (fs) para la creación de poros. Algunos autores sugieren emplear láseres de nanosegundos (ns) para la irradiación y ampliar el área a irradiar con energías de pulso bajas y tiempos de irradiación largos (en el orden de minutos) para proveer la formación de poros de forma más eficiente.(11)

La optimización de la fotoporación tiene como objetivo lograr altas tasas de administración y al mismo tiempo minimizar la muerte celular.

En esta investigación, se plantea variar los parámetros físicos (tiempo de irradiación, frecuencia, longitud de onda) del láser Nd:YAG (Quantel, Q-smart100) con longitudes de onda de 1064 nm y 532nm para determinar los parámetros que afectan la formación de poros de las células PC3 en comparación con la viabilidad de las mismas.

1.4 HIPÓTESIS

La formación de poros en la membrana celular de células de cáncer de próstata se ven favorecida al disminuir la energía total entregada por ambas longitudes de onda (1064 nm y 532 nm) del láser Nd:YAG (Quantel, Q-smart 100).

1.5 OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar los parámetros físicos de irradiación láser a 1064 nm y 532 nm para producir fotoporación en células de cáncer de próstata humano manteniendo una pérdida de viabilidad celular menor al 20%.

Objetivos Específicos

- Irradiar las células PC3 con longitudes de onda de 532 y 1064 nm y variaciones de parámetros de tiempo de irradiación y frecuencia y determinar la viabilidad celular en cada una de las variaciones.
- Monitorear el aumento de temperatura en cada una de las variaciones de objetivo anterior.
- Determinar la producción de poros en células PC3 post irradiación mediante imágenes de microscopia de fluorescencia utilizando Yoduro de Propidio, considerando los parámetros de irradiación láser.

Capítulo 2. MARCO TEÓRICO

2.1 LA CÉLULA

La célula es considerada la unidad básica, funcional y estructural que cuenta con vida propia capaz de llevar a cabo todos los procesos vitales. El cuerpo humano en su totalidad contiene aproximadamente cien billones de células con características y funciones diferentes y que en conjunto forman cada uno de los órganos y sistemas del cuerpo ya que aportan la estructura de los tejidos y los órganos del cuerpo, contienen el código hereditario del organismo que controla las sustancias sintetizadas por las células y les permite realizar copias de sí mismas. (12)

El tamaño promedio de las células varía entre 10 y 60 μm y su vida va desde unas cuantas semanas hasta años, adoptan diversas formas siendo esféricas, ovaladas, hasta incluso de forma poliédrica, pudiendo adaptarse a los espacios o cambiar de forma si es necesario. (13)

En la Figura 1, podemos observar la estructura y los componentes principales de la célula, como es, el núcleo, el citoplasma y la membrana celular. Estos, contienen en su interior diferentes sustancias que les permiten desarrollar las actividades fisiológicas, dichas sustancias, en conjunto se conocen como protoplasma y está formado principalmente por agua, electrólitos, proteínas, lípidos e hidratos de carbono. (12)

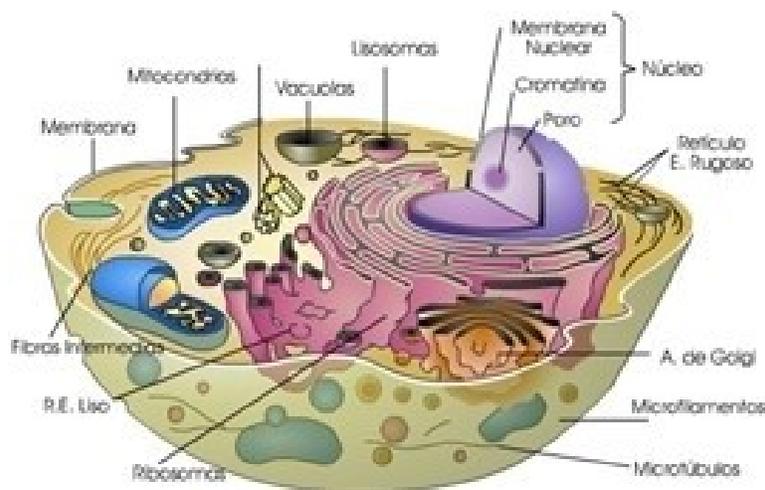


Figura 1. Estructura y componentes de una célula

Células de cáncer

A diferencia de las células “normales”, las células de cáncer presentan alteraciones en su material genético (ADN), debido a que contienen mutaciones en sus genes y su expresión génica se encuentra afectada haciéndolas perder el control en su desarrollo y reproducción. Estos cambios se producen debido a errores en la multiplicación celular, daños en el ADN ya sea por sustancias perjudiciales en el medio ambiente y/o por herencia de padres a hijos. (14)

Una célula de cáncer prolifera a mayor velocidad que las células normales. Esta reproducción acelerada tiene como consecuencia la formación de masas celulares denominadas tumores malignos. (15)

El cáncer puede extenderse por fuera de los límites de una zona particular, es decir que puede afectar zonas adyacentes e incluso lejanas al origen de este mediante un proceso denominado metástasis, siendo su principal causa de muerte. (16)

Además de los factores genéticos existen otros que, al exponerse a ellos, pueden causar la formación de cáncer, por ejemplo, radiación ionizante, Rayos X, Gamma e incluso la luz ultravioleta puede aumentar la probabilidad de mutaciones. Asimismo, algunos agentes químicos y otras enfermedades como leucemia aumentan la predisposición al cáncer. (17)

Las células de cáncer presentan una resistencia a diversos agentes tanto físicos como químicos. Existe una gran cantidad de líneas celulares utilizadas para la experimentación, entre estas encontramos las células PC3 que son células de cáncer de próstata humano. (16)

2.2 LA MEMBRANA CELULAR

La membrana celular se define como *placas o láminas flexibles* que se caracterizan por su permeabilidad y su capacidad para rodear la célula, separar su contenido del medio exterior e interior y formar espacios específicos dentro del citoplasma. Se componen de lípidos y proteínas y posee una estructura de doble capa. Dada su composición y arquitectura posee una serie de propiedades que condicionan su interacción con otras biomoléculas y en especial con las proteínas. (18)

La membrana celular proporciona una frontera externa a la célula mediante una estructura básica formada por una bicapa fosfolipídica que se encarga de la interacción entre la composición intracelular y extracelular a través de la transmisión de mensajes o actividad eléctrica para que la membrana cumpla con numerosas funciones y así mismo concentraciones de los iones fuera y dentro de la célula. La

permeabilidad selectiva de la membrana depende de la carga eléctrica de la molécula (intra y extracelular). Por ejemplo, se permite el paso de las moléculas siempre y cuando sean lipófilas, por lo tanto, los iones son impermeables a la membrana. Algunos compuestos no cargados pueden pasar a través de la membrana por el proceso de difusión. (14)

Por otro lado, los compuestos con carga eléctrica tienen mecanismo que facilitan el transporte de la membrana. Algunos iones y moléculas solubles en agua normalmente no pueden cruzar la barrera, de tal manera que necesitan de los canales proteicos. (12)

Su estabilidad se debe principalmente a dos tipos de interacciones no covalentes (hidrofóbicas e hidrofílicas). Las hidrofóbicas representan el conjunto de factores termodinámicos necesarios para alejar a los grupos no polares del agua y las interacciones hidrofílicas comprenden el conjunto de factores termodinámicos responsables de la preferencia de los grupos iónicos y polares por una solución acuosa.(19)

El modelo estructural de membrana celular que comúnmente conocemos y que es el más aceptado es conocido como “mosaico fluido”, el cual fue propuesto en 1972 por Seymour Jonathan Singer y Garth L. Nicholson. Su modelo representa a la membrana en forma de matriz lipídica y viscosa de dos dimensiones en las que las proteínas difunden libremente e interactúan con los lípidos mediante fuerzas hidrofóbicas. Este modelo de membrana puede visualizarse en la Figura 2. (20)

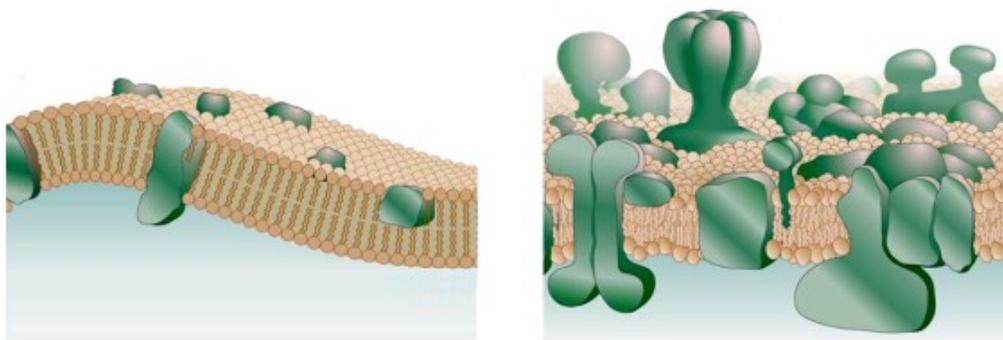


Figura 2. Modelos de mosaico fluido propuesto en 1972 por S. J. Singer y G.L. Nicolson y adaptación del modelo Singer y Nicolson 33 años después por D. M. Engelman

Propiedades como el espesor, la curvatura intrínseca de los lípidos, su compresión elástica, la flexibilidad y su heterogeneidad lateral, han sido puntos de atención para la postulación de hallazgos bioquímicos y biofísicos. La forma física de la membrana está determinada por la curvatura, la cual juega un rol preponderante en muchos procesos fisiológicos, por ejemplo, la capacidad de controlar la forma que adquiere

la membrana bajo condiciones específicas es importante en procesos como la fisión, fusión o el tráfico vesicular (endocitosis y fagocitosis). (10)

Para modelar las condiciones de fusión y caracterizar tanto las secuencias como las estructuras intermedias que se forman, usualmente se utilizan arreglos de doble capa como los liposomas. Con estas aproximaciones se han caracterizado dos tipos importantes: la hemifusión y los poros de fusión (Ver Figura 3). (19)

La hemifusión es una estructura transitoria que representa la conexión entre las hojas externas de las membranas yuxtapuestas. La fusión de las membranas permite el intercambio de lípidos entre ellas y el resultado de la fusión puede conducir a la separación de las membranas o dar lugar a un poro de fusión.(19)

Los poros biológicos son entidades importantes en las células y desempeñan un papel crucial en el control espacial y temporal de los flujos de energía y materia, en sí mismos son fenómenos naturales que tienen diferentes orígenes. Actualmente se sabe que la exposición a esfuerzos mecánicos incrementa la tensión para que estos procesos celulares puedan llevarse a cabo.(19,21)

La formación del poro de fusión se produce a través de la acción de la maquinaria proteica que tiene que aplicar fuerzas mecánicas en el rango de $2-20 pN$ para la apertura del poro. Se forman comúnmente después de la interacción entre péptidos y membranas lipídicas y su crecimiento puede ser generado por fuerzas físicas sin la presencia de proteínas. (22,23)

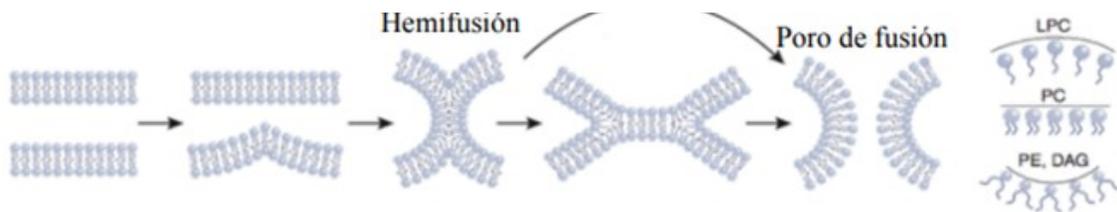


Figura 3. Hemifusión y poros de fusión

Membrana celular de células de cáncer

El cáncer se caracteriza por la proliferación de células neoplásicas acompañada de alteraciones como insensibilidad y evasión a la muerte celular, mutaciones a nivel físico y genético. Para que la función celular se vea afectada deben ocurrir dos o más anomalías en la misma célula trayendo consigo cambios en las capacidades físico-químicas y en consecuencia la membrana celular deja de funcionar. (17)

El desarrollo del cáncer se debe a partir de la acumulación de alteraciones genéticas permitiendo a la célula cancerígena su replicación, sobrevivencia y evasión de mecanismos reguladores de la apoptosis, el crecimiento de las células y el ciclo celular. (15)

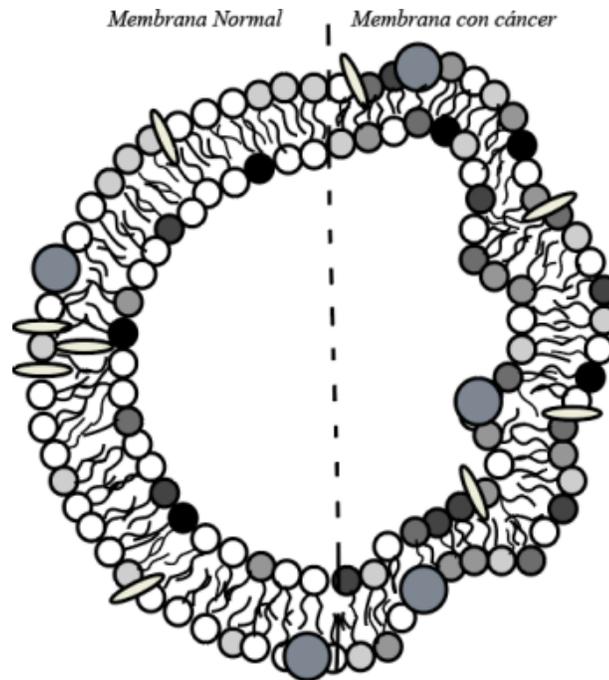


Figura 4. Comparación de una membrana normal y una membrana afectada por cáncer

Es inevitable que las células en su transformación maligna no presenten cambios físicos (ver Figura 4) y más en la membrana siendo esta la barrera de protección que tiene la célula. En un inicio, las proteínas al estar en la superficie son las principales afectada en su actividad, las alteraciones en la bicapa lipídica, relacionadas con la cantidad de lípidos inespecíficos que pueden afectar las cascadas de señalización, siendo las encargadas de la transmisión de mensajes de control de crecimiento. (17)

Otro factor que mencionar es la proliferación celular desregulada como la característica principal del cáncer. Cuando las células se dividen sin control, la estructura de sus membranas cambia ya que todas las biomoléculas que la componen tienen que satisfacer a la cantidad de células que se han proliferado a causa del cáncer.(15)

La presencia de receptores (proteínas o glicoproteínas) en la membrana permiten su interacción con determinadas sustancias y los mecanismos encargados del metabolismo celular. En células de cáncer estos receptores cambian su expresión y tienden a la sobreexpresión. Por ejemplo, la enzima glutamato carboxipeptidasa

El o mejor conocida como antígeno prostático específico de membrana (PSMA), está expresada en células epiteliales de la próstata correlacionándose directamente a la independencia de andrógenos, metástasis y la progresión de cáncer de próstata. El PSMA actúa como blanco molecular adecuado para la radioterapia de cáncer de próstata metastásico que utiliza radiofármacos específicos ya que avanzada la enfermedad poseen mayor expresión. (24)

2.3 CÁNCER DE PRÓSTATA

La próstata es una glándula exocrina tubuloalveolar, de color gris y consistencia dura que rodea la porción inicial de la uretra masculina situada bajo la vejiga que forma parte del aparato reproductor masculino y tiene como función la producción del líquido seminal, contiene un epitelio con tres tipos de células epiteliales: luminal, básica y neuroendocrina. La mayor incidencia de cáncer de próstata aumenta con la edad, sin embargo, hay factores de riesgo que pueden contribuir a la aparición de la patología como factores genéticos y étnicos. (17)

La transformación mala de la próstata sigue un proceso de varios pasos comenzando con una neoplasia intraepitelial prostática, seguida por el cáncer de próstata localizado y avanzando por el adenocarcinoma con invasión local culminando en el cáncer de próstata metastásico. (10)

Células PC3

Es una línea epitelial humana de adenocarcinoma prostático metastásico resistente a castración con código ATCC CRL-1435, la cual procede de una metástasis ósea. (Ver Figura 5). (25)

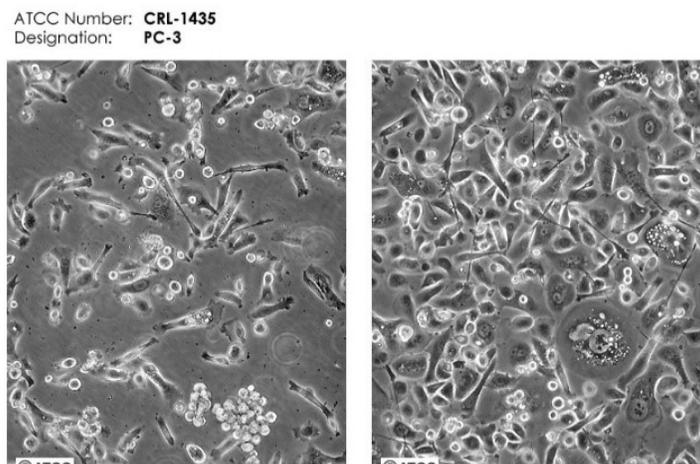


Figura 5. Células PC3

Las células PC3 no expresan receptor de andrógeno (AR) y a bajo nivel expresan el Antígeno Prostático Específico de Membrana (PSMA), con una proliferación independiente de los andrógenos, lo que las hace similar al carcinoma neuroendocrino de células pequeñas prostáticas (SCNC), siendo una forma variante del CaP extremadamente agresivo que no responde a terapia hormonal. (25,26)

Estas células han resultado ser muy adecuadas para analizar cambios bioquímicos en etapas metastáticas y la comprobación de la eficacia de diferentes fármacos.

2.4 FOTOPORACIÓN

La fotoporación es una técnica empleada para crear un poro transitorio autocicatrizante con diámetro de micrones en la membrana plasmática de una célula, con la finalidad de llevar a cabo la integración y liberación de moléculas intracelulares como fármacos o sustancias con tamaños nanométrico. (21,27)

Esta técnica basada en enfoques y metodologías físicas para la penetración de la membrana celular requiere del uso de un dispositivo láser enfocado con precisión sobre la membrana celular para ser irradiada, después de la irradiación con láser se espera que los compuestos exógenos del medio celular se difundan a través de los poros de la membrana hacia el citoplasma de la célula. En la Figura 6, se muestra esquemáticamente el proceso de fotoporación indirecta producida por láser. (27)

Algunas otras técnicas que están dirigidas al mismo objetivo son la *microinyección*, que comprende compuestos inyectados en células individuales, *electroporación*, alternativa física en la que se puede administrar moléculas en un lote grande de células mediante la aplicación de un campo eléctrico, *pistola de genes*, utiliza nanopartículas o micropartículas conjugadas con ácido nucleicos que se disparan en las células como una especie de balas de presión y *sonoporación*, en la que se permeabiliza la membrana celular mediante el uso de microburbujas sensibles a ultrasonido. (22)

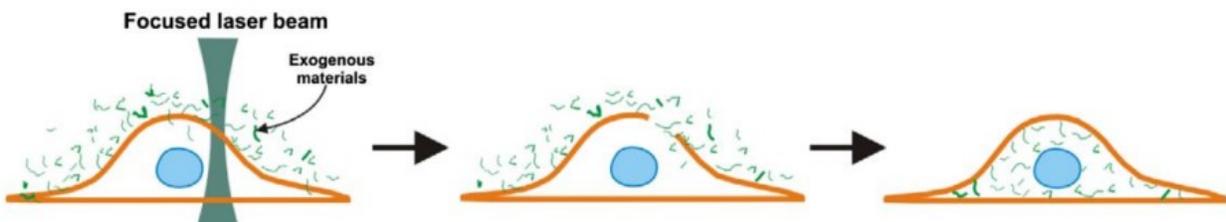


Figura 6. Mecanismo de fotoporación

En todas las técnicas de administración intracelular física, se requiere lograr una captación eficiente de moléculas exógenas y mantener una alta viabilidad celular. (1)

Inherente a la aplicación de la fotoporación inducida por láser se tiene la variación de los parámetros intervinientes en el proceso y propios del láser utilizado para la técnica, como lo es, la fluencia de energía del láser, el tiempo de exposición, la longitud de onda del pulso y a su vez los efectos físicos y biológicos presentados en la célula como mecanismos fototérmicos, fotomecánicos, fotoquímicos, fotoacústicos y hasta la existencia de transporte activo y pasivo.(21)

Mecanismos formadores de poros.

Los mecanismos de fotoporación son complejos y dependen del tipo de láser, ya sea un de pulso continuo (Cw), femtosegundo (fs) o nanosegundo (ns).

Efecto fototérmico

Se manifiesta como un aumento en la temperatura después de la absorción de fotones por moléculas ya sea de agua, proteínas o ADN.

En un láser Cw, donde el aumento de la temperatura genera un calentamiento localizado, inducirá en la membrana un cambio de dinámica. Primero, se formará una transición de fase de gel a líquido cristalino en la membrana, por lo que, su permeabilidad celular cambiará dando paso el ingreso a materiales exógenos. (1,7)

Según Stevenson, en su investigación con láser Cw, la eficiencia de entrega no es satisfactoria (menor al 30 %) y además el proceso requiere de mucho tiempo. (3)

La absorción de la luz puede provocar una transición entre los niveles de energía eléctrica y vibratoria de las moléculas absorbentes, de modo que se genera calor al relajarse hasta el estado fundamental. (19,28)

En un láser ns la eficiencia de entrega no es ideal debido a los efectos fototérmicos que pueden inducir, estos deben ser caracterizados. A continuación se describen dichos efectos.

Efecto fotomecánico.

Los poros se pueden crear en las membranas celulares por tensión mecánica inducida por ondas acústicas o por un efecto denominado *cavitation bubbles*. Este efecto depende directamente de la duración del pulso.(22)

Para un láser de fs, este efecto se ve presente mediante un fenómeno de absorción no lineal, que genera un plasma de baja densidad para penetrar la membrana celular lo que produce las nanoburbujas de vapor (VNB). Estas burbujas al expandirse y colapsar crean una tensión mecánica la cual destruye a la membrana para abrir un poro. Baumgart en su investigación transfecto células de melanoma de cáncer humano basadas en burbujas de cavitación en un láser fs obteniendo un 70% de eficiencia en la entrega.(1)

En el láser ns, la fotoporación se basa en el calentamiento de nanoburbujas de cavitación y éstres mecánico termoelástico. Primeramente, cambia la permeabilidad de la membrana mediante el efecto de calentamiento localizado cuando el láser está por debajo del umbral de formación de VNB, cuando este umbral sobrepasa, la presencia del efecto termomecánico se ve reflejando en la generación de VNB con la generación de chorros de líquidos y choques de ondas en sus procesos de expansión y colapso que pueden formar poros en la membrana.(1,27)

Efecto fotoquímico

Las reacciones fotoquímicas pueden contribuir a la fotoporación de las membranas celulares.

Con pulso laser en el orden de femtosegundos (fs) o luz laser UV los poros pueden formarse por fotodisociación o la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, Reactive Oxygen Species). (27)

Un láser de fs puede romper los enlaces moleculares orgánicos y provocar la ruptura de la membra, generando un efecto fotoquímico.(1)

Efecto fotoacústico

Existe la presencia de otro efecto generado después de la absorción de calor en materiales irradiados, el efecto de ondas acústicas provoca la tensión termoelástica, ocasionando tensión de tracción y formación de VNB, lo que conducirá a la perforación celular. (1)

El efecto fotoacústico se genera cuando una luz variable interactúa con un material fuertemente absorbente como las NP. (29)

En el agua, puede producir VNB y ondas de choque que podrían afectar la integridad de las membranas celulares cercanas abriendo poros transitorios. El efecto fotoacústico provoca aperturas transitorias en las membranas, lo que permite la difusión de flujos impulsados por concentraciones de gradiente. (29)

2.5 LÁSER

Un láser se presenta como una fuente de luz que hace uso del fenómeno físico denominado “*Emisión estimulada*” para la generación de una señal luminosa con características peculiares como monocromaticidad, coherencia y direccionalidad las cuales se encuentran perfectamente controladas.(30)

El acrónimo LASER proviene de “*Ligh Amplification by Stiulated Emission of Radiation*”. La emisión estimulada es un fenómeno físico que se produce cuando inicialmente tenemos un fotón y un átomo se encuentra excitado provocando que un electrón en un nivel de energía superior pase a su estado fundamental emitiendo un nuevo fotón. Un láser es un haz de luz estrecho, unidireccional, coherente en movimiento y amplificado que surge gracias a átomos excitados que son disparados a través de un medio como cristal, gas o líquido. A medida que la cascada de fotones recorre el medio, rebotando en los espejos, se refleja de un lado a otro y gana energía para producir un haz de luz de alto voltaje. (31)

En 1917, Einstein propuso el concepto de emisión estimulada de radiación en el cual establece dos principios básicos sobre el láser. Por un lado, denomina fotones (paquetes de luz que viajan en el espacio) y explica que el átomo está formado el núcleo compuesto de protones y neutrones y este, se encuentra rodeado por electrones que dispone en distintos niveles u órbitas. Una vez introducida energía en este sistema, los electrones tienden a migrar a una órbita superior. En estado excitado, estos electrones pueden pasar espontáneamente a su estado basal liberando energía electromagnética del sistema que viajara en forma de fotones. (31,32)

Al referirnos a *Luz amplificada*, entendemos de inmediato que estamos dentro del espectro electromagnético, en el campo de la luz, pero con la característica de ser amplificada por varios métodos. Los primeros sistemas de amplificación de radiaciones utilizados para procedimientos de estimulación de emisión fueron llevados a cabo por Townes y colaboradores. El sistema se encontraba en la zona del espectro correspondiente a las microondas al cual denominaron MASER. Pero no fue hasta 1958, donde Townes y Schawlow demostraron la posibilidad de construir un sistema capaz de reproducir tales características, pero dentro ya de la emisión lumínica. En 1960, Teodoro Maiman consigue construir el primer láser de rubí y en 1962 se crean los primeros láseres con diversos tipos de gas como medio activo. Sin embargo, fue hasta 1960, Maimen, T. H. uso la teoría de Einstein para fabricar por primera vez luz láser visible usando un cristal sintético de rubidio con extremos envueltos en plata y colocando dentro de un tubo de flash para producir energía.(33)

Hoy en día, se tiene un amplio campo de posibilidades útiles de los diversos sistemas de emisión láser en ingeniería, comunicaciones, informática, industria del espectáculo y a partir del año de 1965 en medicina. Sinclair y Knoll realizaron los primeros trabajos para adaptar el láser a la práctica médica. (30)

Así, también, actualmente se tienen algunas normas oficiales como la PROY-NOM-241-SSA1-2018, Buenas prácticas de fabricación de dispositivos, en el cual define a un dispositivo médico como:

“Instrumento, aparato, utensilio, máquina, incluido el software para su funcionamiento, producto o material implantable, agente diagnóstico, material, sustancia o producto similar, para ser empleado, solo o en combinación, directa o indirectamente en seres humanos...” (34)

Los dispositivos médicos considerados en la Ley General de salud son los equipos médicos que incluye a los aparatos, accesorios e instrumental para uso específico, destinados a la atención médica, quirúrgica o a procedimientos de exploración, diagnóstico, tratamiento y rehabilitación de pacientes, así como aquellos para efectuar actividades de **investigación biomédica**.

Con base al planteamiento anterior, podemos clasificar a los laser como un dispositivo médico ya que su empleo se ha destinado a actividades de terapia, diagnóstico e investigación.

Características Físicas del Láser

Los láseres no solo son capaces de amplificar una señal, sino también de crearla, por lo que requieren de un mecanismo por el que el propio medio activo crea un primer fotón y a lo cual se recurre a un proceso denominado *Emisión espontánea*. Este proceso nos habla de que un electrón en estado de energía excitado es inestable y, tarde o temprano decaerá a un nivel de energía inferior emitiendo un fotón cuya energía corresponde a la diferencia de esos dos niveles. (30)

El balance global de absorción/amplificación depende de la fracción relativa entre el número total de átomos en el estado fundamental y el estado excitado, de manera que, para lograr una amplificación neta, este último debe superar al primero, proceso tal que se denomina *inversión de población en el medio* y el sistema a cargo de este proceso es el *bombeo*.(35)

El *bombeo* debe ser lo suficientemente eficiente como para poder compensar la pérdida de átomos excitados y mantener la inversión de población, sin embargo, a pesar del mecanismo de bombeo y de contar con un medio activo (material

amplificador), un láser requiere de un control estricto de longitud de onda y de una fuente de luz brillante. (35)

Colocar el medio activo en el interior de una cavidad formada por dos espejos ha sido una solución sencilla ya que el medio activo será capaz de seleccionar la radiación en un intervalo de longitudes de onda mucho mejor definido. (30)

La cavidad resonante del láser se compone de dos espejos enfrentados, estos espejos permiten retroalimentar el dispositivo, de forma que la luz amplificada en el medio activo se refleje y vuelva a pasar por éste, amplificándose nuevamente. (30)

Propiedades de la luz láser.

- **Coherencia:** Una onda electromagnética es coherente cuando su fase no varía aleatoriamente a través del espacio o a lo largo del tiempo.

Esta propiedad es el resultado de la emisión estimulada, en la que cada nuevo fotón es emitido de forma idéntica a los anteriores y por tanto contribuyen a la fase del campo electromagnético.

Esta propiedad es fundamental para múltiples aplicaciones.

- **Direccionalidad:** Consecuencia directa de la cavidad, ya que solo los fotones que viajan en dirección perpendicular a los espejos contribuyen al proceso de amplificación.

Esta propiedad es fundamental para muchas aplicaciones en las que la concentración de la energía va dirigida a una zona específica.

- **Monocromaticidad:** Solo contiene una longitud de onda. Los láseres emiten un intervalo de frecuencias lo suficientemente estrecho como para que en la mayoría de los casos, su emisión pueda considerarse perfectamente monocromática.

Es una consecuencia de la emisión estimulada, ya que al ser los fotones iguales, tienen la misma longitud de onda.

Parámetros físicos del láser.

Algunos de los parámetros que pueden medirse en los láseres y que son propios de cada tipo de láser son los siguientes:

Longitud de onda: Longitud o distancia de un ciclo completo de la onda (dos crestas) medida en metros (m).

Frecuencia: Número de ondas que pasan por un punto dado del espacio en la unidad de tiempo (número de oscilaciones en un segundo).

Energía pico (E_p): Se le denomina energía pico a la energía de salida que tiene cada pulso del láser.

Potencia pico (P_p): Se le denomina potencia pico o potencia de emisión a la relación entre la energía de salida y el tiempo (t_p) que tiene cada pulso.

Potencia media (P_m): la potencia media puede calcularse de la siguiente manera.

$$E_p = P_p * t_p$$

$$P_m = P_p * t_p f = E_p f$$

Donde P_p es la potencia pico, t_p es el tiempo de duración del pulso y f es la frecuencia de repetición (número de pulsos por segundo).

Densidad de potencia (DP): Se denomina densidad de potencia a la relación entre la potencia de emisión y la superficie de irradiación (área).

$$DP = P_m/S \text{ (W/cm}^2\text{)}$$

En el ámbito de radiación también recibe el nombre de irradiada por unidad de tiempo.

Densidad de energía (DE): La densidad de energía o fluencia de energía, también denominada exposición radiante, representa la densidad de potencia o irradiancia durante el tiempo de aplicación t .

$$DE = DP * t \text{ (W * s = J/cm}^2\text{)}$$

Otra característica que distingue a los láseres de todas las demás fuentes de luz y es la denominada “*radiación espectral*”, la cual refiere a la potencia del emisor por unidad de área de sección transversal del haz, por unidad de ángulo sólido de apertura y por unidad de longitud de onda.(31,36)

La elección del dispositivo láser adecuado para una aplicación depende específicamente de la aplicación y las características del blanco de choque.

En la tabla 1, se muestran algunos de los láseres más utilizados, resaltando sus características y aplicación. (37)

Tabla 1. Láser más empleados, características y aplicaciones.

Láser	Medio activo*	Rango de frecuencia**	Tipo de emisión	Potencia pico	Aplicaciones
Helio- Neon	Gas	Rojo	Continuo (Cw)	10 mW	Metrología y lector de códigos
Ión de Ar	Gas	verde-azul	Continuo (Cw)	10 mW	Bombeo y espectáculo.
CO2	Gas	infrarrojo	continuo o pulsado	1kW	corte, soldadura y cirugía
Excímero	Gas	Ultravioleta	Pulsado	1MW	Microprocesador y cirugía
Químicos	Gas	infrarrojo	Continuo	1MW	Escudos antimisiles
Colorante	Líquido o sólido	IR-Visible-UV	Continuo o pulsado	1MW	Espectroscopia
Rubí	Sólido	Rojo	Pulsado	1kW	Investigación
Nd:YAG	sólido	Fundamental en 1064, 2° y 3er armónico	Continuo o pulsado	1GW	Bombeo, procesamiento de materiales y cirugía
Titánio:Zafiro	Sólido	infrarrojo	Continuo o pulsado	1PW	Investigación y Pulsos ultracortos
Semiconductor	Sólido	Infrarrojo-visible	Continuo	1mW-1kW	Comunicaciones, CD, DVD, punteros y bombeo
Fibra	Sólido	Infrarrojo-visible	continuo o pulsado	1W-1kW	Procesado de materiales y comunicaciones

* El medio activo es un material que contiene átomos con una estructura de niveles de energía adecuada para la radiación láser. Lo importante de un medio activo es que el material debe tener dos niveles de energía entre los que se da la transición en la que se emite luz láser. **La luz de estos láseres suele doblarse en frecuencia mediante un proceso llamado generación de segundo armónico, dando lugar a un haz de luz verde. (30)

Aplicaciones Médicas del láser

Las investigaciones relativas a la aplicación de la tecnología láser en el área de las Ciencias de la Salud se iniciaron en los primeros años de la década de los sesenta, a partir de la fabricación del primer láser de Rubí en 1960 por Theodor Maiman. Los investigadores comenzaron a estudiar la viabilidad de utilizar diferentes tipos de láseres en los procedimientos quirúrgicos a lo cual encontraron múltiples indicaciones tanto en las áreas médicas como oftalmología, dermatología, cirugía plástica, ginecología y gastroenterología, entre otras.(31,38)

La utilización de diferentes láseres como un instrumento médico se ha desarrollado mediante un proceso evolutivo de continuo refinamiento técnico y fundamentalmente basado en el entendimiento de interacciones láser-materia biológica. Su empleo en el campo de la salud se expande rápidamente ya que técnicas que utilizan radiación láser han sido de gran utilidad en aplicaciones como tratamiento para cáncer, monitorización del sistema circulatorio, transiluminación del tejido para mamografías ópticas u operaciones de miopía en los ojos. (39)

El uso de láseres de emisión continua o de láseres pulsado pese a sus innumerables ventajas potenciales en determinadas operaciones como osteotomías, cirugías convencionales o uso en odontología, no han tenido la aceptación esperada debido al daño producido en los tejidos. Daño dependiente de la longitud de onda y de carácter térmico. La principal razón de este daño reside de la naturaleza térmica de la interacción entre el láser y el tejido biológico. Así, al realizar una incisión debido a la deposición de calor en el tejido, se suelen producir daños no deseados en tejidos adyacentes, también cauterización y en el peor de los casos carbonización, produciendo un retraso en la recuperación y dolor en el paciente.(39,40)

Cuando la luz láser interacciona con la piel ocurren cuatro fenómenos fundamentales como la reflexión, transmisión, dispersión y absorción de la energía. La energía láser, al ser absorbida en el tejido produce elevación de la temperatura por lo que la extensión del área que debe calentarse y el tiempo durante el cual el calor debe mantenerse condicionan su acción sobre la cicatrización. La energía térmica en el tejido se distribuye espacialmente en función de los parámetros del láser y de los coeficientes ópticos de absorción. (41)

La luz láser irradiada implica un aumento moderado de la temperatura tisular, activando las proteínas de estrés, los cuales juegan un papel destacado en el proceso de reacción inflamatoria que ocurre en el tejido durante la cicatrización. En la Figura 7, se observan los coeficientes de absorción de la luz en el agua, así como de cromóforos distribuidos en la piel. Así también se puede observar que existe un rango de longitudes de onda que va de los 700 a los 1100 nm en la que la absorción

de la luz por los cromóforos es mínima. Este rango de longitudes de onda se le conoce como ventana óptica del tejido y es definida como la región en la que se considera que el tejido es ópticamente transparente. (39)

Para la elaboración de esta investigación entre las características a considerar tenemos: Tipo de tejido, parámetros de absorción y dispersión del tejido, longitud de onda de irradiación, parámetros temporales de la energía, como el nivel de potencia o fluencia de energía y la duración de la exposición (repetición de pulso y el modo de suministro de energía del haz de un tejido).(27,42,43)

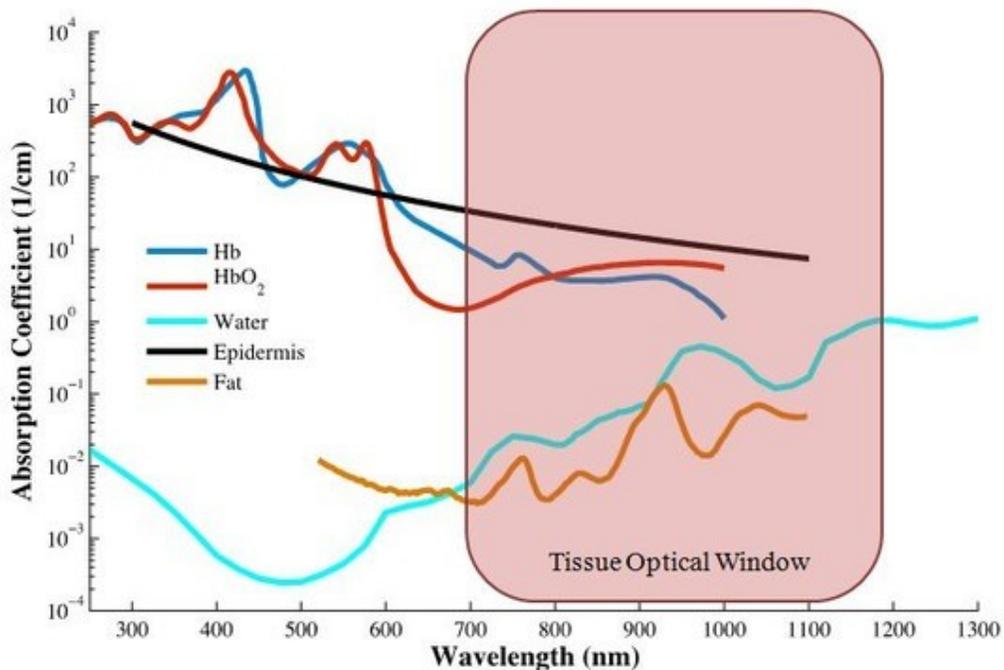


Figura 7. Espectro de absorción de luz láser en tejidos

Láser Nd:YAG

Junto con el láser CO₂ y el de Argón, el Nd:YAG es otro de los tres típicos láseres quirúrgicos, más empleados.

Este tipo de láser está compuesto por un granate (cristal) de itrio, aluminio y oxígeno formado por una matriz cristalina contaminado por neodimio (ion trivalente de la familia de los lantánidos), emite una longitud de onda de 1064 nm, en el infrarrojo cercano y ligeramente superior a la luz visible. Las potencias de emisión están

próximas a los 100 watts siendo un láser principalmente empleado en la coagulación dentro de la cirugía general. (35)

El láser Nd:YAG comenzó a utilizarse desde principios del siglo XX principalmente para el tratamiento de lesiones de la vía aérea inferior como tratamiento de lesiones del árbol traqueobronquial empleado como endoscopio. Una ventaja que ofrece el láser después de su aplicación es la escasa presencia de secuelas por procesos cicatriciales que pudieran obstruir la vía aérea. (40)

A diferencia de otros láseres, puede transmitirse a través de fibra óptica permitiéndole una fácil aplicación de este tipo de energía en espacios anatómicos específicos. (35) Siendo así, adaptable a diversos endoscopios, lo que le ha permitido un amplio campo de aplicaciones en cirugía endoscópica, urología, gastroenterología, neumología, neurocirugía, etc. (38)

Capítulo 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

- Láser Nd:Yag (Quantel, Q-Smart 100) longitud de onda fundamental y generador de 2° armónico.
- Medidor de potencia
- Tarjeta Arduino one-termopar tipo K
- Sistema óptico de irradiación
- Células PC3,
- Incubadora de CO₂
- Medio de cultivo celular RPMI (Roswell Park Memorial Institute)
- Kit de viabilidad XTT
- Lector de microplacas
- *Azul de tripano*
- Cámara de Neubauer
- Placa de 96 pozos
- Portaobjetos de cámara
- Cubreobjetos de vidrio con cámara
- Microscopio de fluorescencia

3.2 MÉTODOS

Láser Nd:YAG (Quantel, Q-smart 100)

El laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos (LANIDER) del ININ tiene a disposición un láser de Nd: YAG marca Quantel, Modelo Q-Smart

100. La Tabla 2, muestra las características del láser, según lo reportado por el proveedor.

Tabla 2. Características de emisión del láser Nd: YAG (Quantel, Q-Smart 100)

Láser Nd: YAG	1064 nm	532 nm
<i>Energía (mJ)</i>	112.2	45.9
<i>Diámetro del haz (mm)</i>	3.87	3.56
<i>Ancho del Pulso (ns)</i>	7.13	5.45
<i>Frecuencia del pulso (Hz)</i>	1 a 21	1 a 21

El láser se compone de un módulo de operación (ICE), un cabezal primario (primer armónico o fundamental) que proporciona la longitud de onda de 1064 nm y un cabezal secundario (segundo armónico) que proporciona la longitud de onda de 532 nm. Los componentes de láser pueden visualizarse en la Figura 8.



Figura 8. Componentes del láser Nd:YAG (Quantel, Q-Smart 100)

Antes de comenzar a utilizar el láser, se realiza una prueba de funcionamiento y acondicionamiento del dispositivo. En el *Anexo 1*, se adjunta un manual de habilitación y detalles de operación del equipo.

Aunado a lo anterior se realiza una prueba de congruencia entre la emisión de energía láser teórica y experimental, con la finalidad de conocer la energía total entregada durante la irradiación. Esta prueba mide la *energía de pulso* mediante el

uso de un sensor medidor de potencia de fotodiodos de la serie C con revestimiento cerámico marca Thorlabs, modelo ES5220, con rango de energía del sensor de 500 μJ a 15 J y rango de longitud de onda de 0.185 a 25 μm . El láser Nd:YAG (Quantel, Q-Smart 100), cuenta con 10 niveles de energía en cada longitud de onda 1064 nm y 532 nm. Por lo que se debe realizar la prueba en cada uno de los niveles de energía.

Sumado a las pruebas anteriores se realiza una prueba de verificación de la longitud de onda mediante el uso de un espectrómetro de fibra óptica, midiendo la luz emitida en el segundo armónico y verificando la intensidad máxima en 532 nm.

Medición de la temperatura

La medición de la temperatura se realizó mediante la configuración de un sensor de temperatura (termopar tipo K) acoplado a una tarjeta Arduino uno (ver Figura 9), que contaba con el código de programación para realizar la medición y registro de la temperatura por segundo. El código empleado se muestra en el *Anexo 2*.

El cabezal del termopar es sumergido en el medio a irradiar quedando inmerso en el flujo del láser.

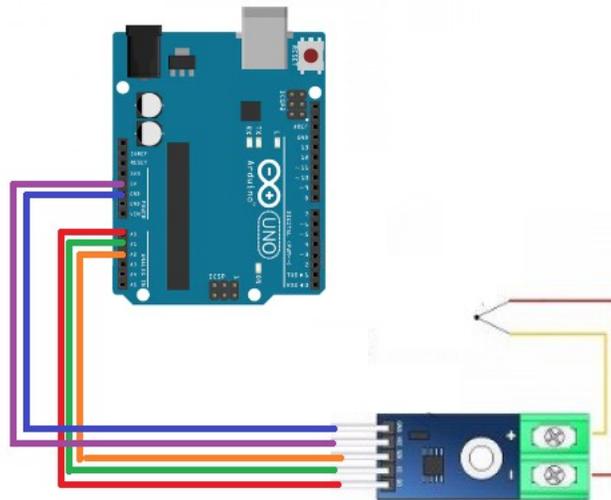


Figura 9. Representación del termopar acoplado a la tarjeta Arduino Uno.

Cultivos celulares, células PC3

Se siguieron las indicaciones sanitarias y de bioseguridad para ingresar al laboratorio de microbiología y poder realizar los medios de cultivo y monitorear el

estado de las células, estas indicaciones fueron: uso del equipo de protección, guantes, gafas de seguridad, botas o calzado para laboratorio, cubrebocas o mascarillas respiratorias y gorro de laboratorio.

Se utilizó la línea celular PC3, representativa de un estadio andrógeno independiente de cáncer de próstata, obtenidas originalmente de la ATCC (American Type Culture Collection) por el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares cumpliendo con todas las normas vigentes de bioseguridad para su adquisición.

Las células fueron cultivadas en placa de cultivo celular a 37 °C, en una atmósfera al 5 % de dióxido de carbono (CO₂) y 100 % de humedad, en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Sigma-Adrich Co) suplementado al 10 % con suero fetal bovino (FBS) y antibióticos (100 µg/mL de estreptomina). El protocolo de preparación del medio RPMI, se encuentra descrito en el *Anexo 3*. Una vez alcanzada la confluencia de un 90% (10⁶ células por caja), las células fueron llevadas de la caja de cultivo con 0.025 % de tripsina y 0.01 % de HANK's y redistribuidas en otras placas. El protocolo de redistribución mediante tripsina se encuentra en el *Anexo 3*. El medio fue sustituido cada tercer día con 10 mL por caja de cultivo.

Una vez alcanzada una máxima proliferación de células en cada caja, se procede a hacer es el conteo celular. Este proceso es importante ya que las células cultivadas se distribuirán en una placa de 96 pozos y es necesario conocer el numero células en cada pozo.

La cuantificación del número de células por mililitro se realizó utilizando adicionando a la caja de cultivo 20 µL de tripsina y 2 mL de HANK's por tres minutos a 37 °C con 5 % de CO₂. La solución celular fue centrifugada a 1000 rpm durante 5 minutos. El botón obtenido se resuspendió y se realizó un conteo de células utilizando un ensayo de exclusión con *azul de tripano* y cámara de Neubauer. El azul de tripano es un colorante que permite teñir las células que no conservan su integridad membranal (consideradas células muertas) y así diferenciarlas de las células vivas que se observan brillantes.

Finalmente, la preparación de las células para los experimentos de irradiación láser consistió en sembrar 10 000 células por pozo en una placa de 96 pozos un día antes de realizar la irradiación láser. Cada pozo de la placa tiene un volumen de trabajo que oscila entre 0.1 y 0.2 ml, los cuales proporcionan un espacio óptimo para el crecimiento y desarrollo de las células. El área de cultivo por pozo en la placa de 96 pozos es de 0.35 cm² la cual ofrece una superficie adecuada para la adhesión celular.

Irradiación láser

Las células cultivadas fueron distribuidas en placas de 96 pozos destinadas con la finalidad de realizar el estudio de viabilidad celular post irradiación. La Figura 10 muestra la distribución de las células en la placa de 96 pozos, considerando que no queden pozos consecutivos a irradiar.

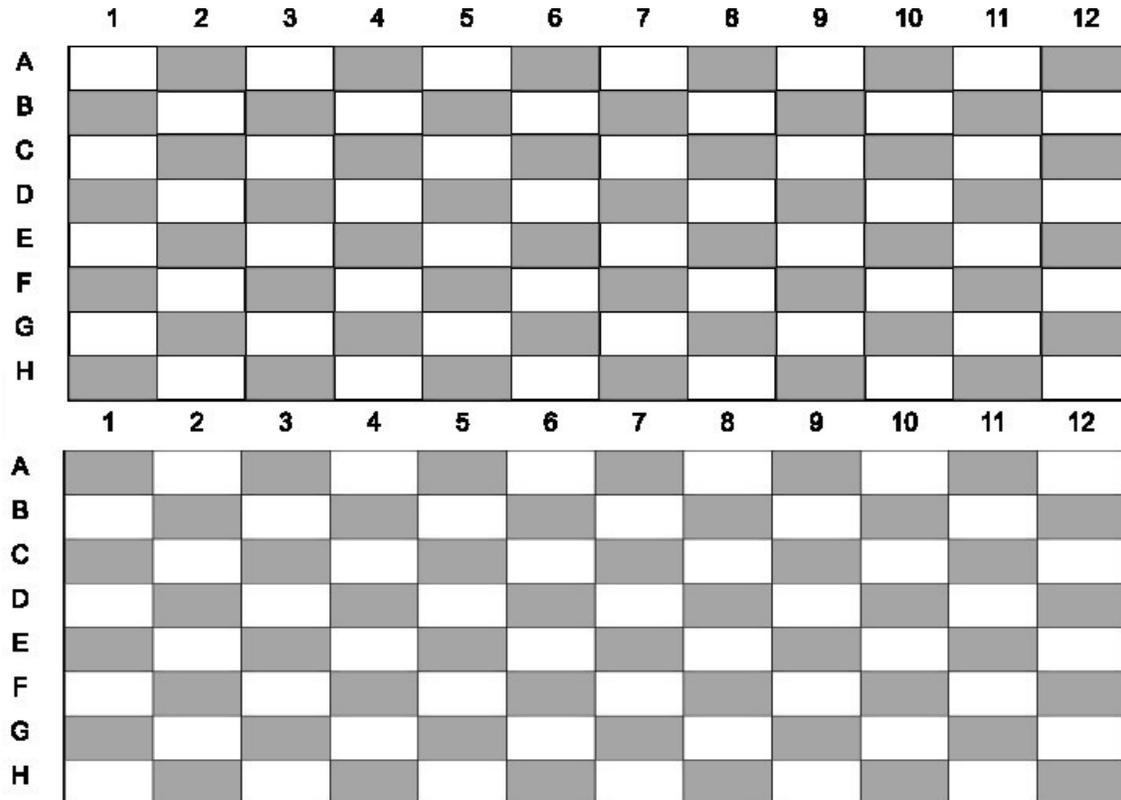


Figura 10. Distribución de células PC3 en caja de 96 pozos

También, fueron sembradas en placas de 4 pozos destinados para un análisis de inmunofluorescencia.

La elección de la energía a irradiar, frecuencia y tiempo de irradiación, se determinó calculando la Densidad de energía total liberada con la ecuación siguiente y cubriendo energías bajas y altas de las proporcionadas por el láser Nd:YAG.

$$DE = DP * t (W * s = J/cm^2)$$

Para la irradiación láser de los pozos ya sea de la placa de 96 o 4 pozos, se construyó un arreglo óptico, capaz de irradiar perpendicularmente la superficie de la placa. Dicho arreglo se puede observar en la Figura 11.

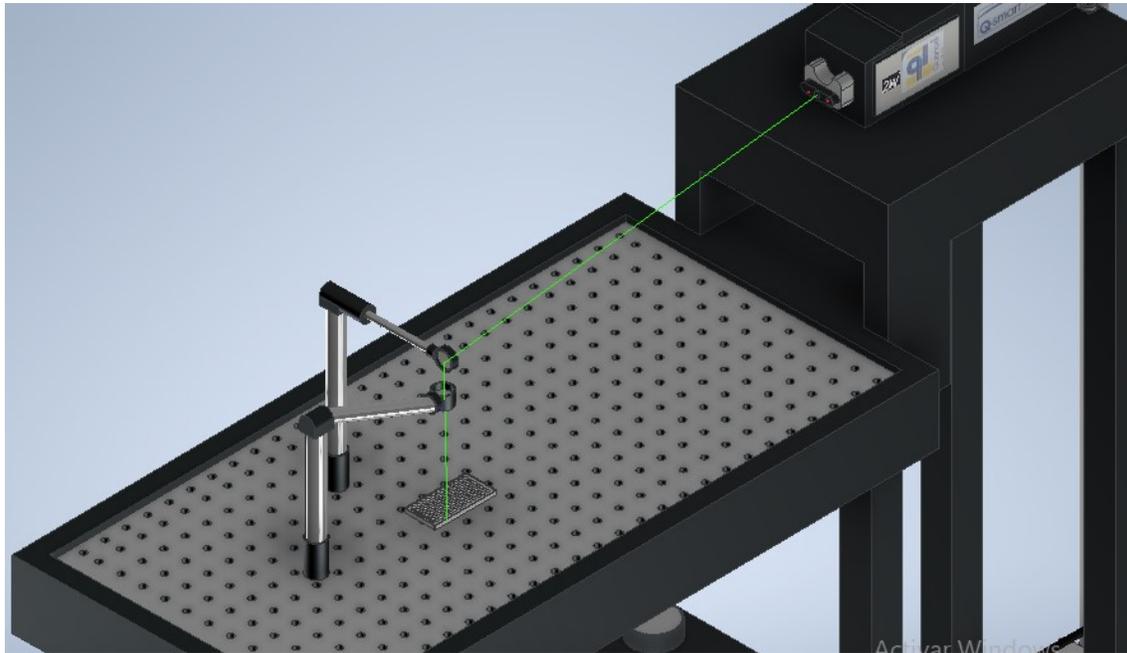


Figura 11. Arreglo Óptico del láser Nd:YAG(Quantel, Q-smart 100) empleado para la sesión de irradiación

Ensayo de viabilidad celular post-irradiación láser

Una vez concluidas las sesiones de irradiación se realizó el estudio de viabilidad celular con el kit XTT, el cual es un ensayo colorimétrico, no reactivo que mide la actividad metabólica de las células viables, basado en la reducción metabólica de la sal de tetrazolium. Así, el porcentaje de células vivas, se evaluó mediante la medición espectrofotométrica de la viabilidad celular en función de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial por la ruptura del anillo de tetrazolium (sodium 3'-[1-[phenylaminocarbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis[4-methoxy-6-nitro] benzene sulfonic acid hydrate). Las células viables para producir cristales de formazán de color naranja son acidificadas con isopropanol. Con este método se tiene una relación directa entre la señal colorimétrica y el número de células vivas. La absorbancia resultante de la solución de color naranja con este método es medida a 480 nm en un lector de microplacas (Espectrofotómetro, Epoch, BioTek). El ensayo de viabilidad celular con XTT, se encuentra explicado ampliamente en el Anexo 3.

Monitorear de la temperatura en la irradiación láser

El cabezal del termopar acoplado a la tarjeta Arduino uno, fue introducido en cada pozo de la placa de 96 pozos durante la irradiación y se tomó registro de la temperatura generada en el medio. (ver Figura 12).

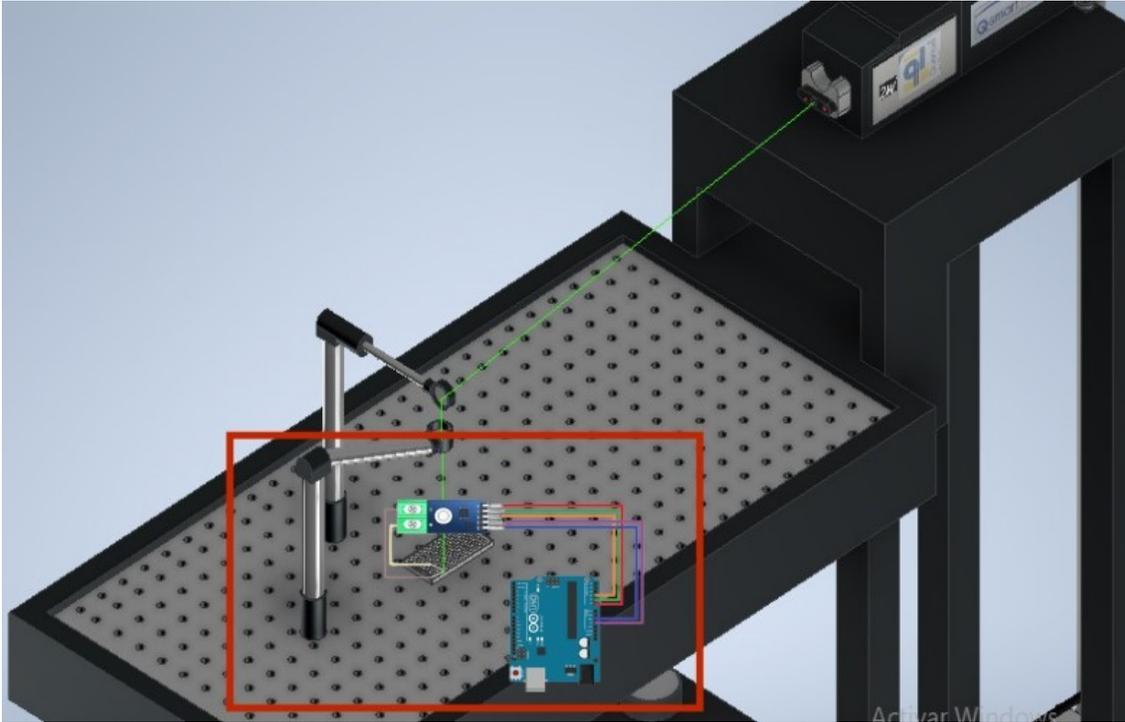


Figura 12. Arduino One Acoplado a termopar

Ensayo de inmunofluorescencia celular post-irradiación láser

Para este ensayo, las células fueron sembradas en placas de 4 pozos, cada pozo fue irradiado con parámetros del láser determinados por la cantidad de Energía total liberada y considerando los valores obtenidos de viabilidad del ensayo XTT realizado anteriormente, considerando los parámetros de irradiación que dieron resultados en la pérdida de viabilidad menores al 20%.

Una vez obtenidas las placas con las células irradiadas se comenzó el desarrollo del estudio de inmunofluorescencia el cual nos permitirá visualizar si las sesiones de irradiación generaron fotoporación mediante un análisis colorimétrico de imágenes de fluorescencia con Yoduro de Propidio (PI) el cual nos indicará si existe fijación y permeabilización en la membrana celular en lo que resulta la creación de poros lo cual permitió que el tinte ingresara y así teñir las células. En biología celular

el IP se utiliza como colorante de contraste que permite diferenciar el núcleo celular del citoplasma (se intercala en el ADN).

A partir de este ensayo se obtuvieron las imágenes por cada pozo de la placa, una con DAPI para visualizar los núcleos y otra con IP para visualizar el citoplasma de la célula.

Capítulo 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 HABILITACIÓN DEL LÁSER

Las pruebas de funcionamiento y acondicionamiento del dispositivo se realizaron con éxito, siguiendo los lineamientos sugeridos por el proveedor y los pasos descritos en el *Anexo 1*.

La prueba de verificación de longitud de onda de emisión en el segundo armónico se realizó con un espectrómetro compacto de fibra óptica, midiendo la luz emitida y verificando que la máxima intensidad estuviera centrada en 532 nm. La Figura 13 muestra la gráfica de intensidad obtenida en esta prueba y se observa claramente que el punto máximo corresponde a la longitud de onda de 532 nm.

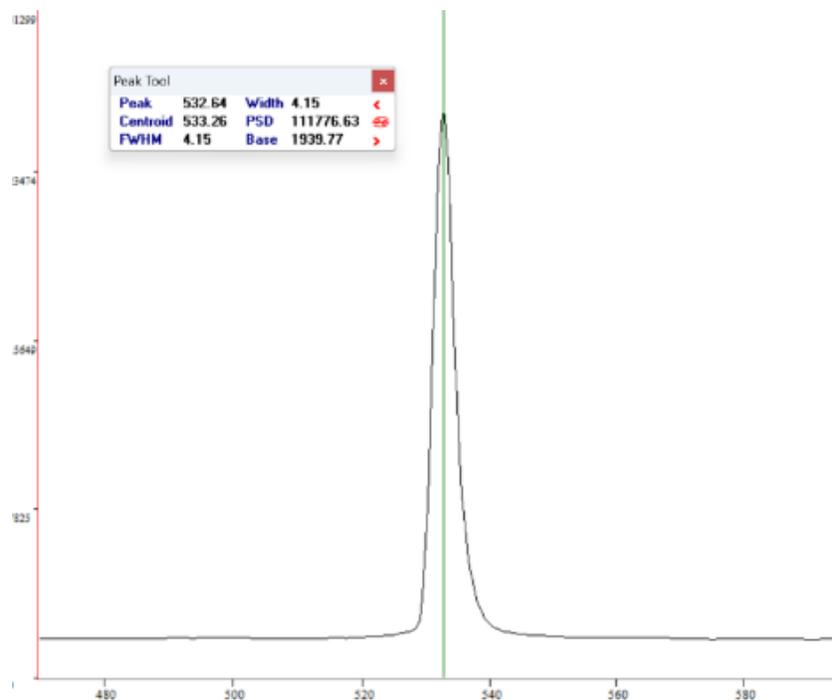
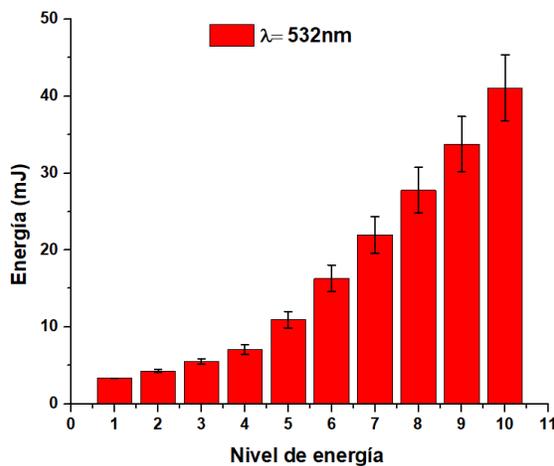


Figura 13. Medición de longitud de onda de 532 nm del pulso

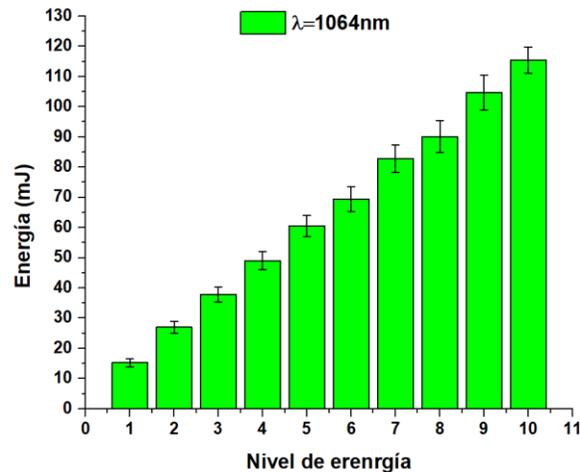
La prueba de congruencia entre la emisión de energía láser teórica y experimental mide la *energía de pulso* del láser. El láser Nd:YAG (Quantel, Q-Smart 100), cuenta con 10 niveles de energía en cada longitud de onda 1064 nm y 532 nm. Por lo que la prueba se realizó en cada uno de los niveles de energía. Esta prueba se llevó a cabo usando un sensor de potencia de fotodiodos de la serie C con revestimiento cerámico marca Thorlabs, modelo ES5220.

Cada nivel de energía del láser en cada longitud de onda (532 y 1064 nm) fue censada con un conteo de 60 pulsos a 1 Hz. En las Gráfica 1 y Gráfica 2, se muestran los resultados de la prueba de congruencia entre la emisión de energía láser teórica y experimental. De la Gráfica 1 podemos observar que la energía en nivel 10 a para la longitud de onda de 532 nm fue de 41.08mJ, mientras que en la Gráfica 2 a 1064 nm fue de 115.5 mJ, además, el aumento de la energía es gradual para las dos longitudes de onda, pero habiendo en 532 nm un aumento de 38mJ entre el nivel de energía 1 y el 10 y en la longitud de onda de 1064 nm una diferencia de 100 mJ.

La energía censada en el nivel 10 a una irradiación de 532 nm fue de 41.08mJ, mientras que en la irradiación a 1064 nm fue de 115.5 mJ. El aumento de la energía es gradual en los dos casos, pero habiendo en 532 nm un aumento de 38mJ entre el nivel de energía 1 al 10 y en la longitud de onda de 1064 nm una diferencia de 100 mJ.



Gráfica 1. Valores de energía en 532 nm



Gráfica 2. Valores de energía en 1064 nm

4.2 MONITOREO DE LA TEMPERATURA

La medición de la temperatura se realizó utilizando un termómetro tipo k, acoplado a una tarjeta Arduino one. El cabezal del termopar fue introducido en cada pozo de la placa de 96 pozos durante la irradiación. Para tener un espectro amplio del comportamiento de las variables como Energía y tiempo de irradiación se estableció para la longitud de onda de 532 nm los niveles de energía 1, 3, 6 y 10, con frecuencias de 2, 5 y 10 Hz y tiempo de repetición de 1 y 3 s. El tiempo de irradiación

se determinó, siguiendo las sugerencias de diversos autores reportadas en sus investigaciones sobre fotoporación. (1)

Para el caso de la irradiación con 1064 nm se consideraron los niveles de energía 1, 3 y 4, con frecuencias 2, 5 y 10 Hz y tiempo de irradiación de 1 y 3 s. En las gráficas de la Figura 14 se muestran los resultados del monitoreo de temperatura para la longitud de 532 nm y en la Figura 15 se muestran las gráficas obtenidas para la irradiación a 1064 nm.

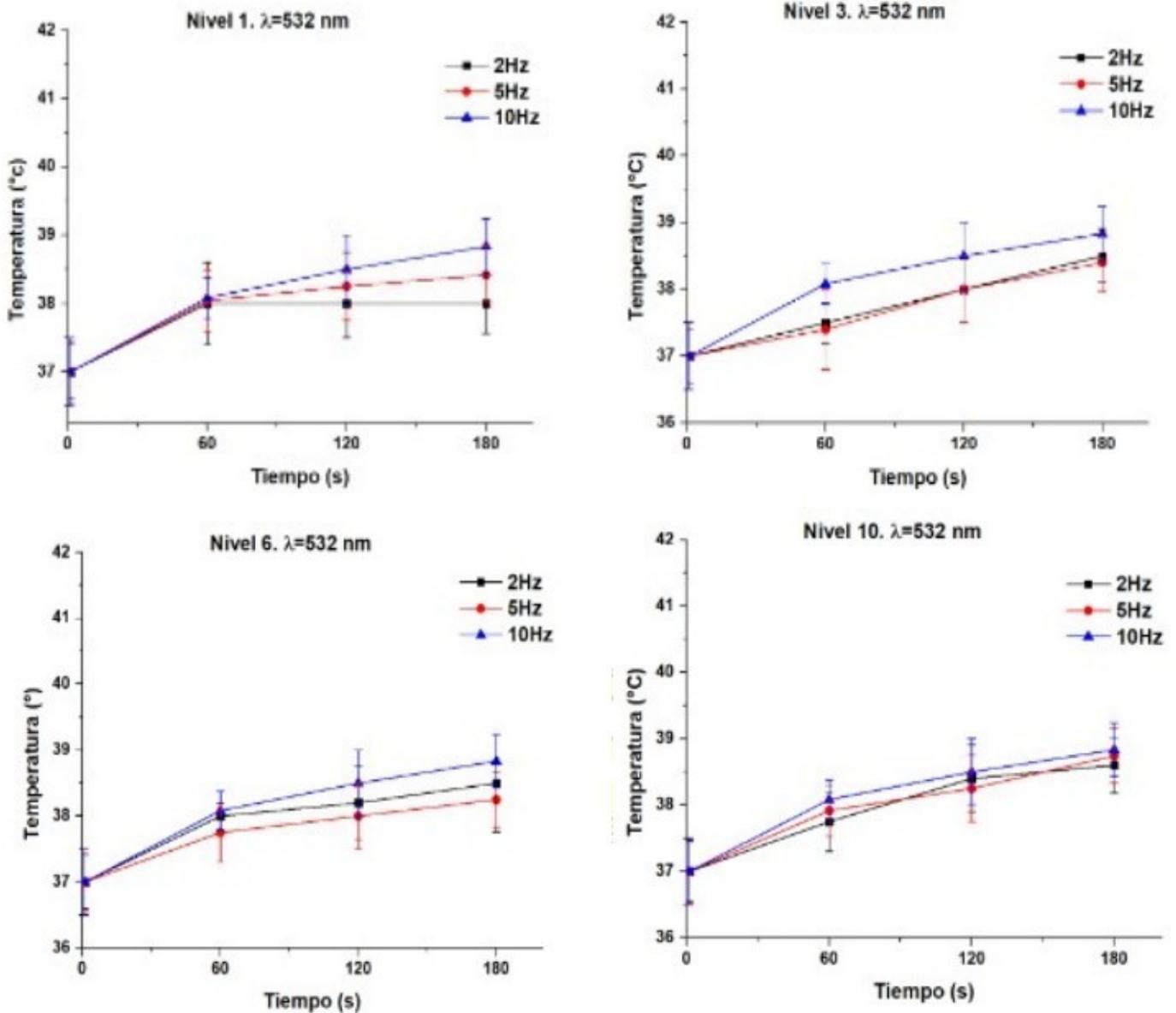


Figura 14. Monitoreo de temperatura en longitud de onda 532nm

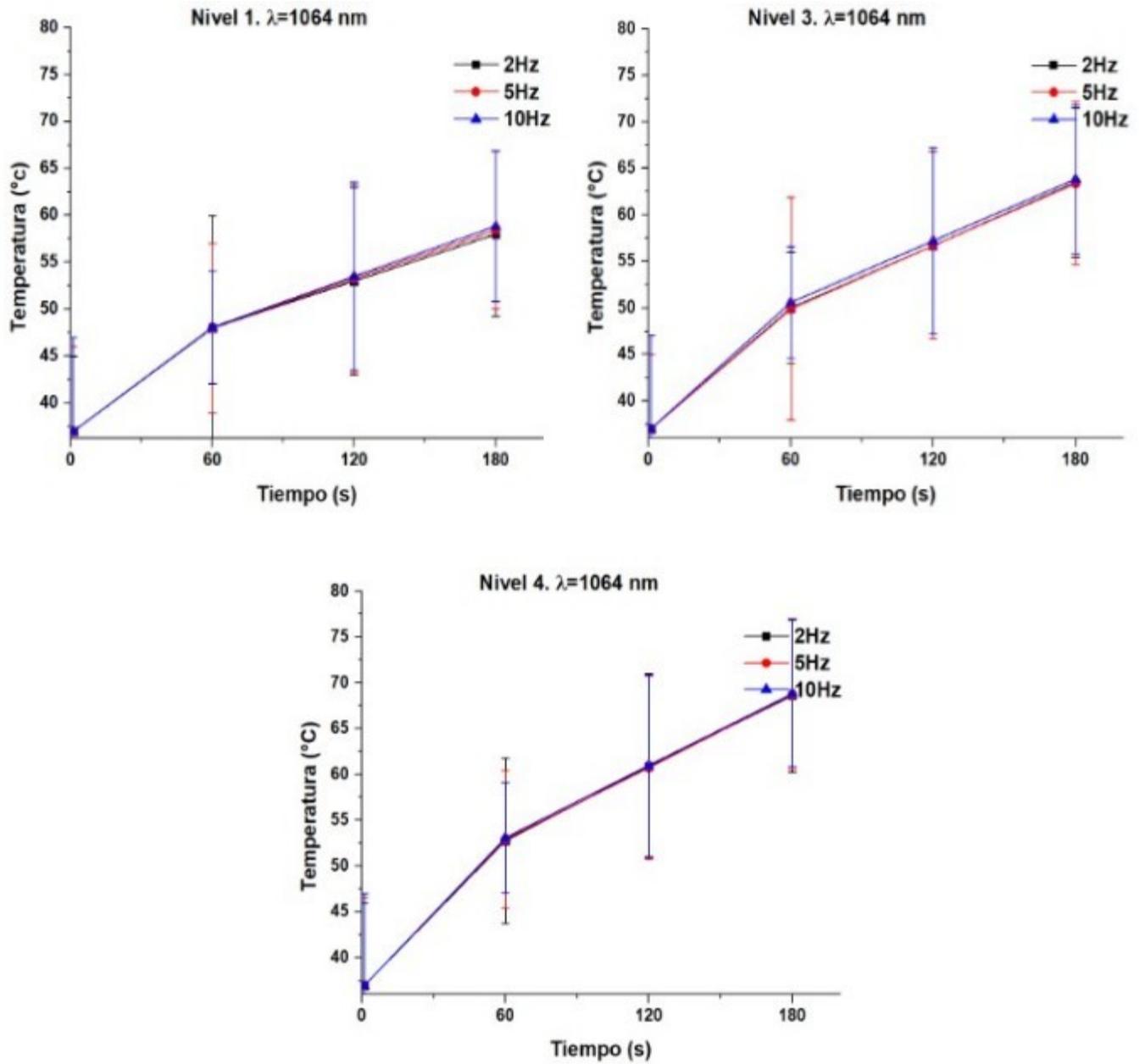
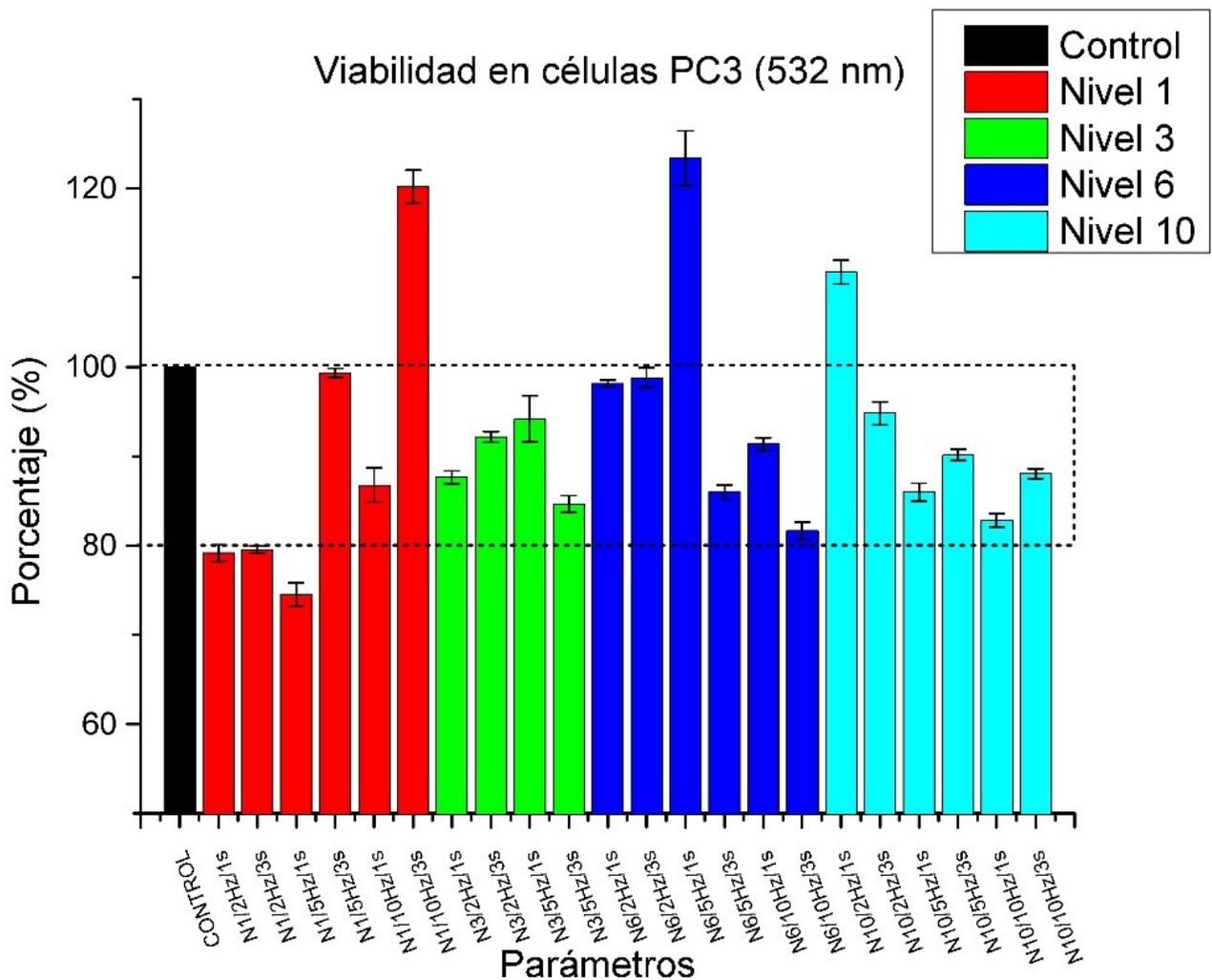


Figura 15. Monitoreo de temperatura en longitud de onda 1064nm

4.3 ENSAYO DE VIABILIDAD

El estudio de viabilidad celular se realizó con el kit colorimétrico XTT, que permite conocer el porcentaje de células vivas de forma directa. La placa experimental que contenía las células irradiadas a los diferentes parámetros del láser, tratada con el Kit XTT, fue medida en el espectrofotómetro a la longitud de 450 nm y 650 nm, por triplicado, los datos obtenidos se analizaron por estadística descriptiva. En la Gráfica 3. Viabilidad de células PC3 en 532 nm, se muestran los porcentajes obtenidos en el estudio de viabilidad. El grupo control es aquel que no fue sometido a irradiación láser, por lo que se considera como el 100% de viabilidad.



Gráfica 3. Viabilidad de células PC3 en 532 nm

En la Gráfica 3 se pueden observar los porcentajes de viabilidad celular obtenidos en las 22 configuraciones de parámetros de irradiación. Estos porcentajes están en un rango de viabilidad que va de los 74 a los 123%. Cabe destacar que se al realizar las mediciones de viabilidad con el XTT el color determina en el porcentaje de viabilidad, por lo que al realizar la medición en los pozos de irradiación se verificó el daño que podía causar el haz de luz al interactuar con el material del pozo. De esta verificación se observó que los parámetros que alcanzaron una viabilidad mayor al 100% contenían fragmentos del material del pozo, lo que produjo un cambio en la coloración y por ende un error en la lectura de la viabilidad, razón por la que fueron descartados como posibles parámetros de irradiación.

Por otro lado, recordemos que se busca mantener un porcentaje de viabilidad mayor al 80%, por lo que, los valores de viabilidad aceptados para el nivel 1 fueron el de 99% y 81%. En el Nivel de energía 3 los valores de viabilidad obtenidos con las diferentes configuraciones mostraron un rango del 84% al 94%, es decir todos quedaron dentro del nivel de aceptación. En el caso del Nivel de energía 6 los valores de viabilidad se encontraron entre 98% a 81% y finalmente en el Nivel de energía 10 los valores de viabilidad aceptados fueron 82% a 94%. Sin embargo, el valor más alto de viabilidad se encontró en el nivel de energía 1 siendo de 99% con 5Hz y 3 segundos de tiempo de exposición. Reduciendo así a 16 configuraciones de parámetros aceptados de acuerdo con la viabilidad celular deseada (80-100%).

Diversas investigaciones, han considerado que la forma de impartir la energía y el total de energía entregada son los parámetros más importantes en la generación de poros (fotoporación) y que el porcentaje de viabilidad debe mantenerse lo más alto posible. Considerando lo anterior, en la Tabla 3 se presentan algunos parámetros utilizados por diversos autores en sus investigaciones para llevar a cabo el proceso de fotoporación con láser Nd:YAG.

Como podemos observar en la Tabla 3 los tiempos de exposición correspondientes a las densidades registradas para la fotoporación fueron de 40 segundos a 1 minuto en los cuales se obtuvo fotoporación significativa. En sesiones con tiempos de exposición de 3 a 5 minutos la pérdida de viabilidad aumentaba y la fotoporación resultaba insignificante. Por otro lado, la longitud de onda de 1064 nm y frecuencia constante de 10 Hz son parámetros que influyen en la densidad de energía y el número de pulsos aplicados en las muestras celulares.

El uso de NP en estas investigaciones permitió que la temperatura aumentará de forma más rápida al igual que los efectos formadores de poros y el aporte de energía. Sin embargo, en la presente investigación se omitió el uso de NP.

Tabla 3. Parámetro utilizados en diversas investigaciones

Tipo de NP	Línea celular	Fluencia del láser (mJ/cm ²)					Descripción
		Pulso (ns)	Frecuencia (Hz)	Tiempo	Mínima	Máxima	
de Carbón-sólida	DU145 (Cáncer de próstata)	5-9	10	1 min	25		Sin efectos biológicos.
					25	44	Aumenta la fotoporación
					44	100	Disminución de la fotoporación
					44	63	Aumento de la pérdida de viabilidad
					44	75	Fotoporación significativa
De Carbón/pared múltiple				63	100	Absorción y fragmetación	
Carbón de pared simple				3 min	44	75	Fotoporación insignificante con poca perdida de viabilidad.
				5 min	63	75	Pérdida significativa de la viabilidad
				1 min	50		Efecto fotoacústico
Carbón	CHO (Chinese Hamster Ovary)	6	10	40 s	60	70	Aumenta la fotoporación (viabilidad disminuye).
					63	88	Fotoporación máxima y pérdida máxima de viabilidad.
Carbón negro	DU145 (Cáncer de próstata)	5 a 9	10	1 min	19	25	Baja Fotoporación.
					25	44	Aumento de la fotoporación
					63	88	Fotoporación máxima y pérdida total de viabilidad.

Los valores empleados para la fotoporación en rangos desde 25mJ/cm² a 100 mJ/cm² y tiempo de exposición de 1 a 5 minutos mostraron que, al aumentar el tiempo de exposición la pérdida de viabilidad era significativa y en densidades de energía entre 44mJ/cm² y 75mJ/cm² con tiempos de exposición cercanos a 3 minutos la pérdida de viabilidad era baja y la fotoporación insignificante, pero en tiempos de exposición alrededor de 1 minuto, la fotoporación resultaba significativa, además, a la densidad de energía de 50mJ/cm² se obtenía un efecto fotoacústico en las células, lo que promovía el incremento de formación de poros. (21)

En rangos altos de densidad de energía como 60 mJ/cm² a 88mJ/cm² con tiempos de exposición de 40 segundos mostraban que en un punto medio de fluencia de 70mJ/cm² la viabilidad disminuía y conforme aumentaba la densidad de energía a 88mJ/cm² la pérdida de viabilidad era evidente al igual que la fotoporación. Por otro lado, en rangos de densidad de energía más bajos como 19mJ/cm² y manteniendo 1 minuto de exposición aumentaba la fotoporación y solo hasta 63mJ/cm² la viabilidad era significativa ya que al llegar a 88mJ/cm² existía pérdida total de viabilidad. (11,44)

De los análisis realizados por los diferentes autores y de los resultados obtenidos en los estudios de viabilidad, podemos resaltar que existe una correlación entre el aporte total de energía y los efectos biológicos en las células, donde el aumentar el aporte total de energía conduce a una pérdida de viabilidad. Así, tomado como base lo anterior es posible establecer los rangos de densidades de energía y viabilidad celular obtenida para la selección de parámetros apropiados de operación del láser. Estos parámetros consideran como valores altos, valores entre 88 y 100 mJ/cm² y como valores bajos las fluencias entre 19 y 25 mJ/cm².

En la Tabla 4 y Tabla 5 pueden observarse los cálculos de la potencia media, densidad de potencia (considerando el diámetro del pozo como la superficie a irradiar) y de la densidad de energía obtenidos con variación de la frecuencia (2Hz, 5Hz y 10 Hz) y tiempo de irradiación (1 y 3 segundos) para las longitudes de onda de 532 nm y 1064 nm respectivamente.

Así también en la Tabla 4, se tiene que 9 valores (*) de densidades de energía en la longitud de onda de 532 nm cumplen con los requisitos deseados entre densidad de energía viabilidad.

Por otro lado, a la longitud de onda de 1064 nm no se identificaron valores que cumplan con los requisitos establecidos.

Tabla 4. Densidad de energía con longitud de onda 532 nm

Parámetros			Potencia media (mJ/s)	Densidad de Potencia (W/cm ²)	Densidad de energía (mJ/cm ²)
Energía (mJ)	Frecuencia (Hz)	Tiempo (s)	$P_m = E_p \cdot f$	$D_p = P_m / S$	$DE = D_p \cdot t$
3.08	2	1	6.16	16.0083	16.0083*
		3			48.0249*
	5	1	15.4	40.0208	40.0208*
		3			120.0624*
	10	1	30.8	80.0416	80.0416*
		3			240.1247
6	2	1	12	31.1850	31.1850*
		3			93.5551*
	5	1	30	77.9626	77.9626*
		3			233.8877
17	2	1	34	88.3576	88.3576*
		3			265.0728
	5	1	85	220.8940	220.8940
		3			662.6819
	10	1	170	441.7879	441.7879
		3			1325.3638
41.08	2	1	82	213.5135	213.5135
		3			640.5405
	5	1	205.4	533.7838	533.7838
		3			1601.3514
	10	1	410.8	1067.5676	1067.5676
		3			3202.7027

Tabla 5. Densidad de energía con longitud de onda 1064 nm

Parámetros			Potencia media (mJ/s)	Densidad de Potencia (W/cm ²)	Densidad de energía (mJ/cm ²)
Energía (mJ)	Frecuencia (Hz)	Tiempo (s)	$P_m = E_p * f$	$D_p = P_m / S$	$DE = D_p * t$
15.5	2	1	31	80.5613	80.5613
		3			241.6840
	5	1	77.5	201.4033	201.4033
		3			604.2100
	10	1	155	402.8067	402.8067
		3			1208.4200
38	2	1	76	197.5052	197.5052
		3			592.5156
	5	1	190	493.7630	493.7630
		3			1481.2890
	10	1	380	987.5260	987.5260
		3			2962.5780
49	2	1	98	254.6778	254.6778
		3			764.0333
	5	1	245	636.6944	636.6944
		3			1910.0832
	10	1	490	1273.3888	1273.3888
		3			3820.1663

En la Figura 16 se puede observar la relación de los valores obtenidos en el estudio de viabilidad por XTT y los valores calculados de densidad de energía de cada uno de los niveles de energía empleados. En cada una de las gráficas que componen la figura 16 podemos ver que, la relación entre viabilidad y densidad de energía no se comporta linealmente; por ejemplo, el Nivel de energía 1 comienza con un aporte de densidad de energía baja de 16 mJ/cm² hasta una densidad de energía alta de ~240 mJ/cm², en el punto intermedio de densidad de energía de 120mJ/cm² la viabilidad resultó de 99%. En el Nivel de energía 3 se comienza con una densidad de 31 mJ/cm² hasta subir a ~233mJ/cm² y la viabilidad en estos rangos de densidad de energía se mantuvo entre 80% al 100%. En el Nivel de energía 6 el aporte de densidad de energía comenzó en 88 mJ/cm² hasta llegar a 1325 mJ/cm² y la viabilidad se mantuvo en los rangos deseados. Para el Nivel de energía 10 las densidades aumentaron de 213 mJ/cm² a 3202 mJ/cm² mostrando inicialmente una pérdida en la viabilidad.

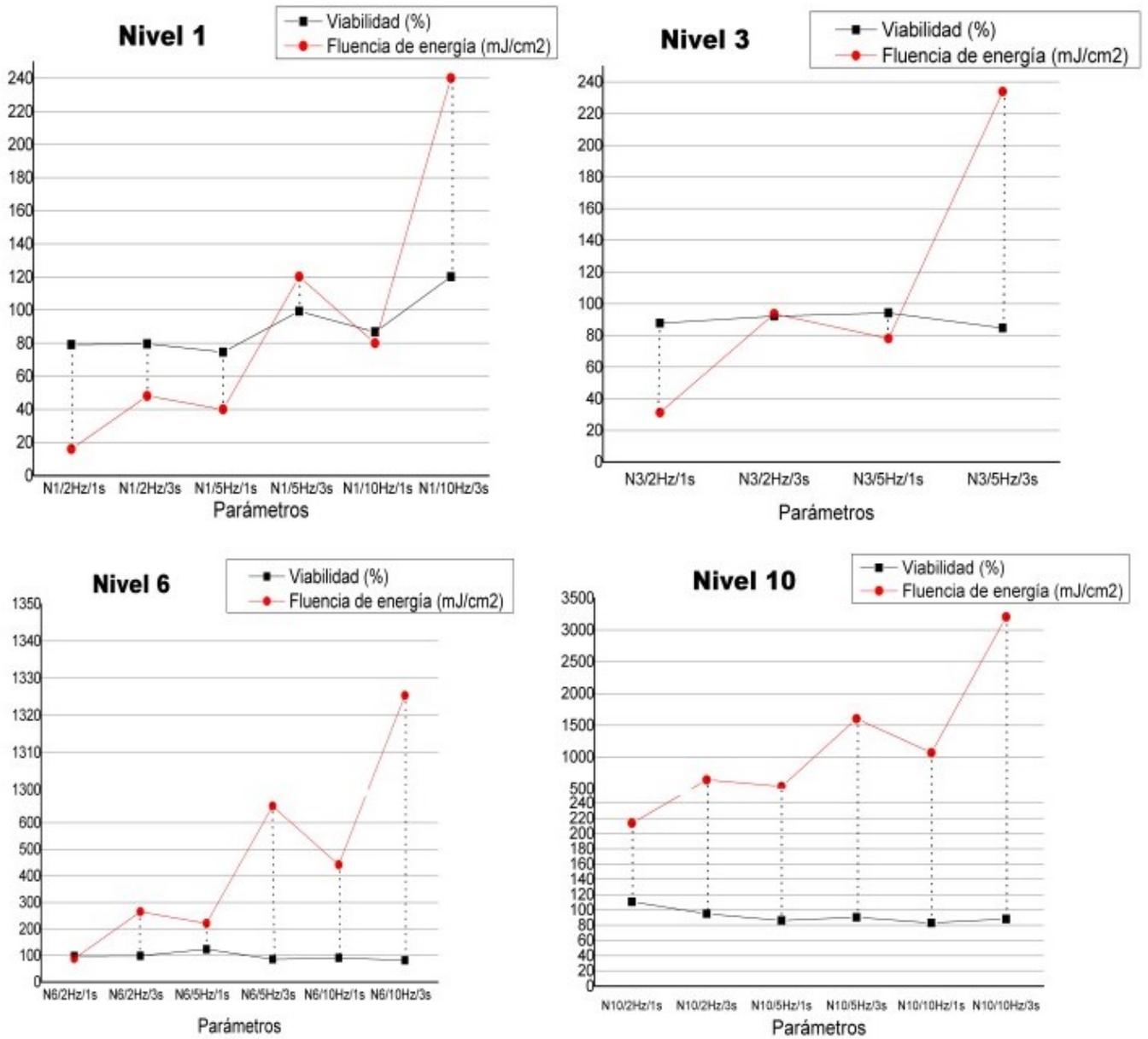
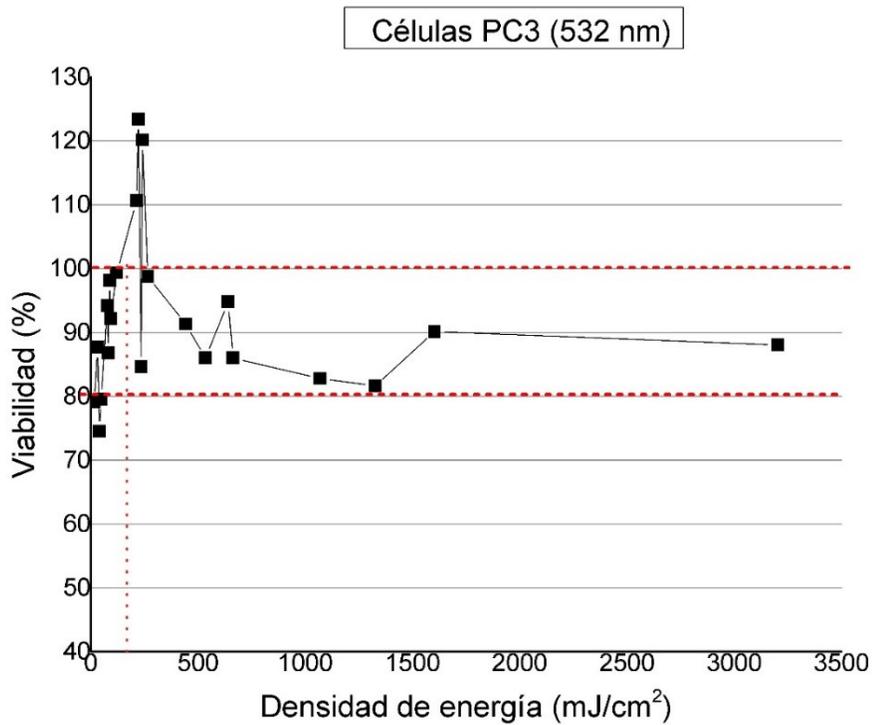


Figura 16. Correlación de densidad de energía y viabilidad celular por nivel de energía

Con el fin de visualizar los parámetros que resultaron apropiados para causar fotoporación manteniendo viabilidad y considerando valores citados de densidad de energía, se realizó la Gráfica 4 y Tabla 6 donde se agrupan dichos valores individualmente.



Gráfica 4. Correlación de viabilidad y densidad de energía

Tabla 6. Correlación de densidad de energía y viabilidad celular

Parámetros Nivel de energía/Frecuencia/Tiempo	Densidad de Energía (mJ/cm ²)	Viabilidad (%)
		PC3 ($\lambda=532$ nm)
N3 / 2Hz / 1s	31.18	87.63
N3 / 5Hz / 1s	77.96	94.17
N1 / 10 Hz / 1s	80.04	86.77
N6 / 2 Hz / 1s	88.35	98.13
N3 / 2Hz / 3 s	93.55	92.14
N1 / 5 Hz / 3 s	120.12	99.33

4.5 ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA

Las imágenes en el estudio de inmunofluorescencia fueron obtenidas en un microscopio de fluorescencia utilizando marcadores colorimétricos como DAPI que se emplea como un marcador altamente fluorescente al ADN que en su mayoría se encuentra en el núcleo celular, su tinción se torna a azul fluorescente. (Ver Figura 17). Otro colorante empleado, fue el Yoduro de propio (PI) ya que actúa como marcador fluorescente mediante la apreciación de la integridad de la membrana plasmática. Las células con membranas dañadas son las únicas que pueden captar el IP, ya que las membranas intactas no pueden penetrarlo y una vez unido se internaliza, su fluorescencia hace que la célula adquiera una tinción roja. (Ver Figura 18).

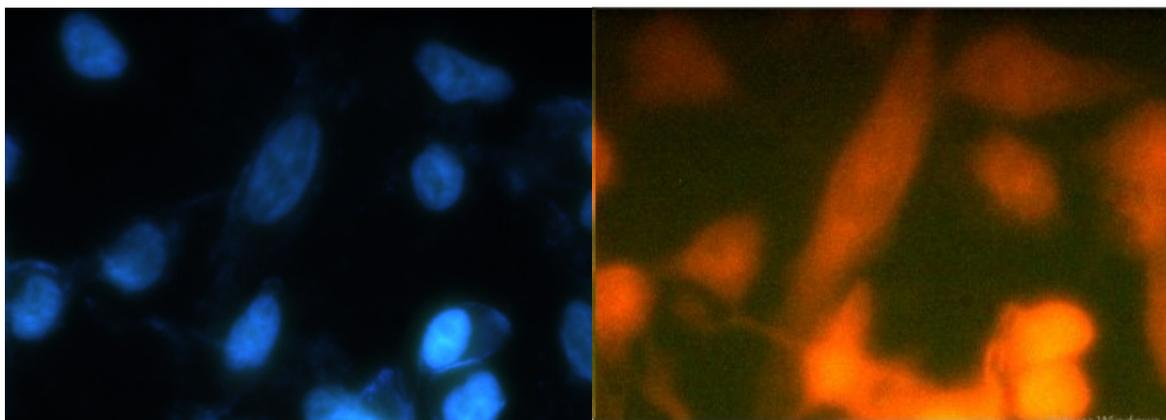


Figura 17. imagen DAPI

Figura 18. Imagen IP

Este estudio, permitió evaluar si se presentó el efecto de fotoporación en las células con base a la internalización del PI en las células y si la selección de parámetros en el análisis de viabilidad celular y densidades de energía fue correcta, con lo que también nos permitió corroborar los rangos para una fotoporación efectiva manteniendo una pérdida mínima de viabilidad celular. Dicha evaluación de las imágenes de fluorescencia se realizó mediante, un análisis cuantitativo de la imagen utilizando el software ImageJ (*Anexo 4*).

El análisis cuantitativo de las imágenes adquiridas en el microscopio de fluorescencia consistió primeramente en generar una máscara binaria de la imagen de los núcleos celulares teñidos con DAPI. En la Figura 19 se puede observar un ejemplo de la máscara binaria, en la que los núcleos celulares los cuales fueron considerados como las regiones de interés (ROI) Seguido del procedimiento anterior, en la Figura 20, se muestra una imagen de fluorescencia del PI con la sustracción de los núcleos teñidos con DAPI, realizada mediante una operación de

sustracción, quedando la imagen de IP. En la Figura 21 se muestran un grupo de imágenes obtenidas después de la eliminación de núcleos. Posteriormente cada imagen fue medida para registrar su intensidad de color.



Figura 19. Máscara binaria

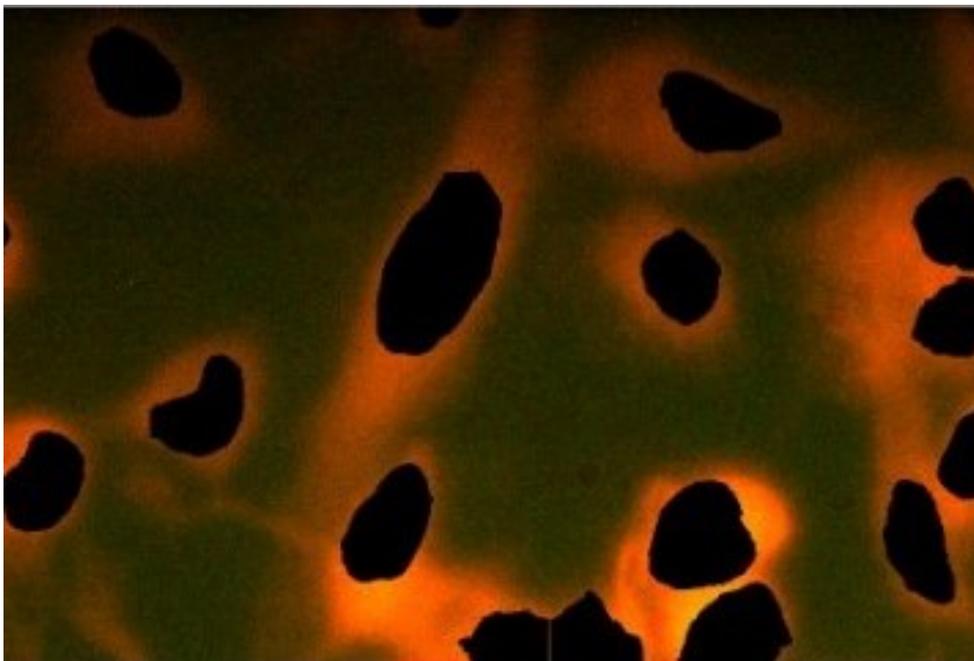


Figura 20. Sustracción de núcleos

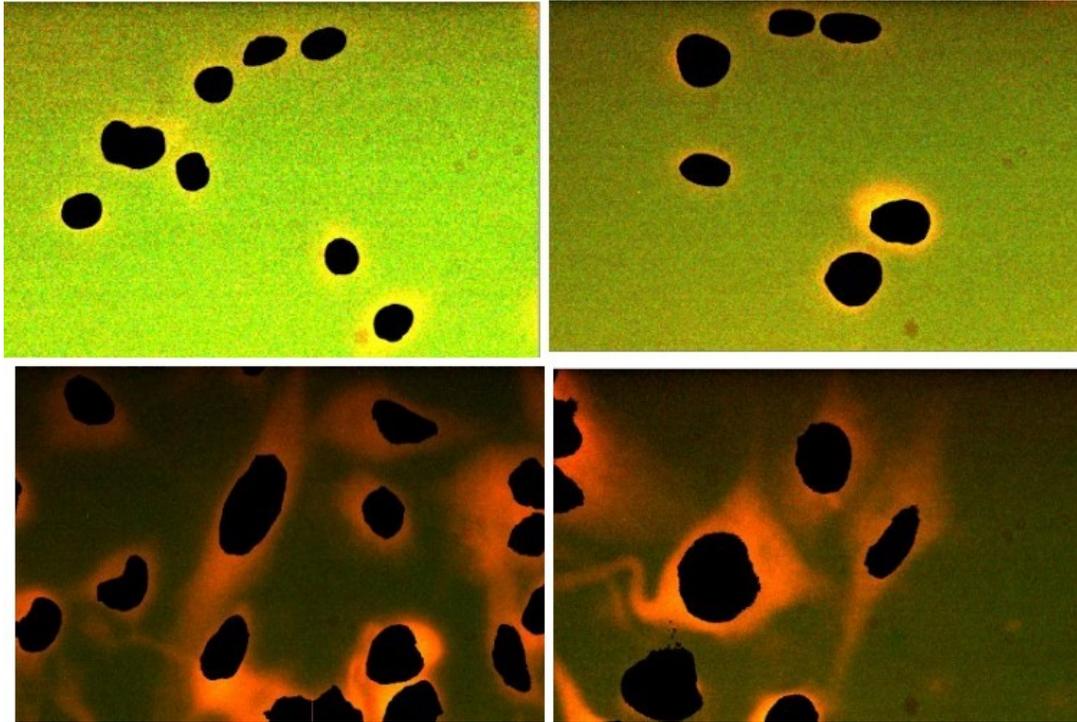
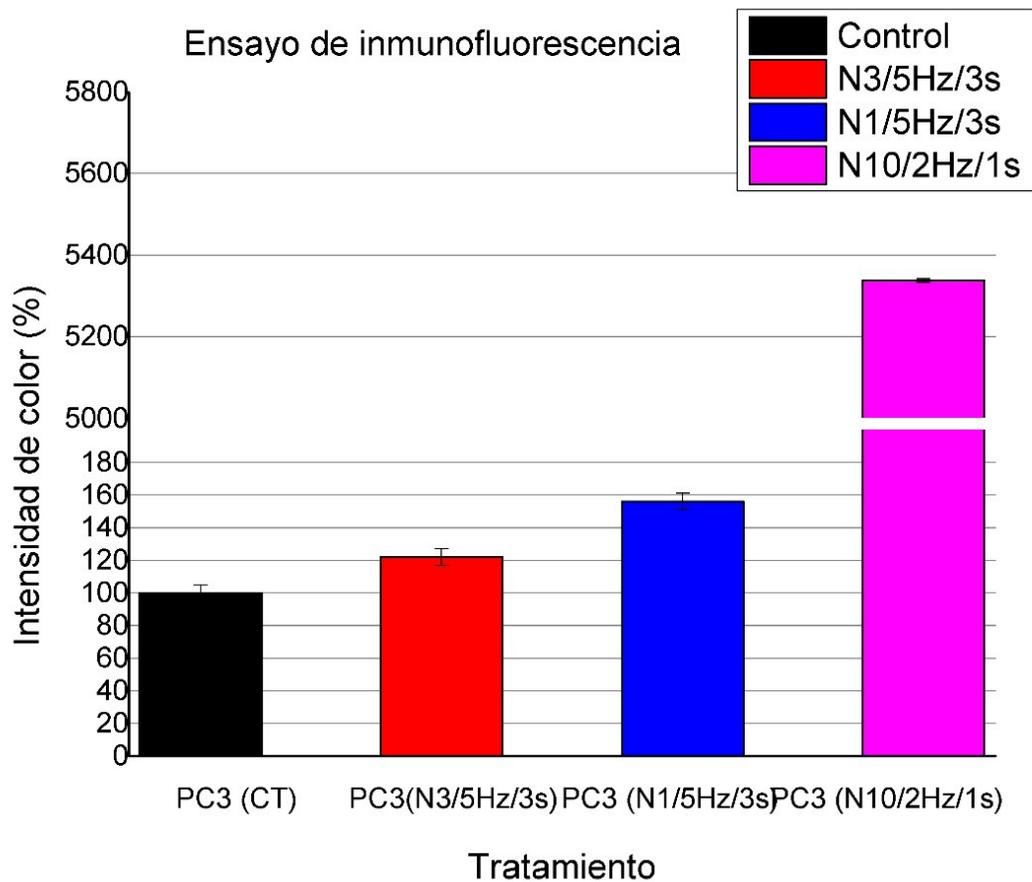


Figura 21. Tratamiento de imágenes de inmunofluorescencia PC3

Las imágenes de fluorescencia adquiridas y analizadas fueron: células PC3 sin irradiación (grupo control), células irradiadas con el nivel 3 de energía a 5Hz durante 3 s, células irradiadas con el nivel 1 de energía a 5Hz durante 3 s y células irradiadas con el nivel 10 de energía a 2Hz durante 1 s. Cabe destacar que las condiciones de la última irradiación realizada no cumplen con lo establecido anteriormente, entre la densidad de energía y el porcentaje de viabilidad.

En la Gráfica 5 , se muestra gráficamente la intensidad de color cuantificada en cada una de las configuraciones de los parámetros de irradiación seleccionados. La intensidad de color se obtuvo mediante la densidad óptica (cantidad de luz absorbida) que mostraron las imágenes de las células pos-irradiadas. Estos valores se midieron con respecto a las células de control (no irradiadas). En dicha gráfica, podemos observar el porcentaje de color obtenido para la configuración con baja densidad de energía (31 mJ/cm^2), con densidad de energía media (120 mJ/cm^2) y con alta densidad de energía (1601 mJ/cm^2), así como la del grupo control. Recordando que las 2 configuraciones primeras son las que cumplieron los criterios de viabilidad y rangos de densidad de energía y la última configuración se tomó fue realizada fuera de los rangos establecidos de densidad de energía, esto para

visualizar el aumento de fotoración en las células o proceso de destrucción celular.



Gráfica 5. Análisis de la intensidad de color en las imágenes de inmunofluorescencia de células PC3

Los parámetros con densidad de energía de 31 mJ/cm² obtuvo un porcentaje de intensidad con respecto al control fue del 22 ± 8 %, indicando ese porcentaje de fotoración en las células, pero manteniendo una viabilidad de 84 ± 2%. Por otro lado, la configuración de parámetros con densidad máxima de energía (1601 mJ/cm²) mostro un resultando 5 veces mayor al control, además de una viabilidad de 110 ± 2% valor que ya había sido descartando. En el caso de la densidad media de 120 mJ/cm² la intensidad de color fue del 56% mayor que el grupo control, además, estos parámetros de irradiación obtuvieron un valor de viabilidad de 99%.

Capítulo 5. CONCLUSIONES

Los métodos de administración intracelular generan un alto estrés sobre la membrana celular provocando alteraciones que eventualmente pueden comprometer la viabilidad y supervivencia celular. Por lo cual, para lograr una buena fotoporación sin comprometer la viabilidad celular es necesario establecer las condiciones experimentales adecuadas como el tipo de láser y los parámetros físicos de este.

En este proyecto, se utilizó un láser Nd:YAG (Quantel, Q-smart 100), los parámetros de variación fueron longitud de onda, energía, frecuencia y tiempo. La energía por pulso entregada en las dos longitudes de onda (1064 nm y 532 nm) en el láser utilizado, está distribuida en 10 niveles, donde el valor de la energía máxima cantidad de energía en la longitud de onda de 532 nm es de 41.08mJ, mientras que en la longitud de onda de 1064 nm es de 115.5 mJ valor que se encontró fuera de rangos de aplicabilidad para fotoporación, según lo recomendado por diversos autores y corroborado con los resultados obtenidos de temperatura, ya que bajo esta irradiación la temperatura se incrementaba 30°C sobre la temperatura basal.

Los parámetros de irradiación como la frecuencia (número de pulsos por segundo), utilizados fueron 2 Hz, 5Hz y 10Hz con tiempos de irradiación de 1 y 3 segundos. Las diversas configuraciones de estos parámetros permitieron determinar la cantidad mínima y máxima de densidad de energía a entregar y compararla con los resultados de viabilidad y fotoporación.

El aumento de la energía del láser y el número de pulsos aumenta directamente la densidad de energía proporcionada a la muestra. Los rangos de densidad de energía de 31.18 mJ/cm² a 120 mJ/cm² mostraron formación de poros en la membrana celular, mientras que con valores más bajos la fotoporación podría no efectuarse. En rangos más altos de densidad de energía la viabilidad se ve comprometida por efectos térmicos en el medio.

Como resultado de este proyecto se determinó que al irradiar con la densidad de energía de 120 mJ/cm² (nivel de energía 1 = 3 mJ/pulso, frecuencia 5Hz y tiempo de irradiación 3 s) la intensidad de color fue del 56% mayor que el grupo control, lo que implica que el 56% de la población celular presento fotoporación, y la viabilidad no se vio comprometida (99%) por lo que, estos parámetros de irradiación resultaron ser los más aceptables para generar fotoporación.

Capítulo 6. REFERENCIAS

1. Du X, Zhao M, Jiang L, Pang L, Wang J, Lv Y, et al. A mini-review on gene delivery technique using nanoparticles-mediated photoporation induced by nanosecond pulsed laser. Vol. 31, Drug Delivery. Taylor and Francis Ltd.; 2024.
2. Tirlapur UK, König K. Targeted transfection by femtosecond laser [Internet]. Vol. 466, J. Chromatogr. Thames & Hudson; 1989. Available from: www.nature.com/nature
3. Stevenson DJ, Gunn-Moore FJ, Campbell P, Dholakia K. Single cell optical transfection. Vol. 7, Journal of the Royal Society Interface. Royal Society; 2010. p. 863–71.
4. Yao C, Rudnitzki F, He Y, Zhang Z, Hüttmann G, Rahmzadeh R. Cancer cell-specific protein delivery by optoporation with laser-irradiated gold nanorods. J Biophotonics. 2020 Jul 1;13(7).
5. Duckert B, Vinkx S, Braeken D, Fauvart M. Single-cell transfection technologies for cell therapies and gene editing. Vol. 330, Journal of Controlled Release. Elsevier B.V.; 2021. p. 963–75.
6. Clark IB, Hanania EG, Stevens J, Gallina M, Fieck A, Brandes R, et al. Optoinjection for efficient targeted delivery of a broad range of compounds and macromolecules into diverse cell types. J Biomed Opt. 2006;11(1):014034.
7. Kumar S, Li A, Thadhani NN, Prausnitz MR. Optimization of intracellular macromolecule delivery by nanoparticle-mediated photoporation. Nanomedicine. 2021 Oct 1;37.
8. Tsukakoshi M, Kurata S, Nomiya Y, Ikawa Y, Kasuya T. A Novel Method of DNA Transfection by Laser Microbeam Cell Surgery. Vol. 35, Appl. Phys. B. 1984.

9. Ginn SL, Alexander IE, Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. *J Gene Med.* 2013 Feb;15(2):65–77.
10. Chisica Avila Angie Vanesa, Sánchez Aguilera Dayan Alejandra. Estudio de los mecanismos de muerte celular inducidos por tres flavonoides de *Chromolaena tacotana* sobre células de cáncer de próstata (PC3) y cérvix (SIHA). [Bogotá]: Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales; 2022.
11. Holguin SY, Thadhani NN, Prausnitz MR. Effect of laser fluence, nanoparticle concentration and total energy input per cell on photoporation of cells. *Nanomedicine.* 2018 Jul 1;14(5):1667–77.
12. Hall JE, Guyton AC. Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica DECIMOTERCERA EDICIÓN. Barcelona; 2016.
13. Garner AL, Neculaes B, Dylov D V. Infrared Laser-Based Single Cell Permeabilization by Plasma Membrane Temperature Gradients. *Membranes (Basel).* 2022 May 31;12(6):574.
14. Szlasa W, Zendran I, Zalesińska A, Tarek M, Kulbacka J. Lipid composition of the cancer cell membrane. *J Bioenerg Biomembr.* 2020 Oct 26;52(5):321–42.
15. Camila Ortega Rozo L. El cáncer: Una mirada biofísica a través de la membrana celular. Colombia; 2021.
16. Pienta KJ, Hammarlund EU, Austin RH, Axelrod R, Brown JS, Amend SR. Cancer cells employ an evolutionarily conserved polyploidization program to resist therapy. *Semin Cancer Biol.* 2022 Jun;81:145–59.
17. Mayora A, Arvelo F. Cáncer de próstata y apoptosis. Vol. 52, Prostate Cancer and Apoptosis. *Invest Clin.* 2011.
18. Jezierska S, Van Bogaert INA. Crossing boundaries: the importance of cellular membranes in industrial biotechnology. Vol. 44, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 2017.

19. MARTÍNEZ L. Dinámica de poros transitorios en membranas modelo. [México]: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2016.
20. Semanat EC. Actividad en Membranas Modelo de Péptidos Apoptóticos. Valencia; 2017 Aug.
21. Holguin SY, Gray MD, Joseph P, Thadhani NN, Prausnitz MR. Photoporation Using Carbon Nanotubes for Intracellular Delivery of Molecules and Its Relationship to Photoacoustic Pressure. *Adv Healthc Mater.* 2018;7(5).
22. Sengupta A, Kelly SC, Dwivedi N, Thadhani N, Prausnitz MR. Efficient intracellular delivery of molecules with high cell viability using nanosecond-pulsed laser-activated carbon nanoparticles. *ACS Nano.* 2014;8(3).
23. Santamaría Holek I, Rojas Rodríguez F. LUCIANO MARTÍNEZ BALBUENA.
24. Ocampo-García B, Cruz-Nova P, Jiménez-Mancilla N, Luna-Gutiérrez M, Oros-Pantoja R, Lara-Almazán N, et al. 225Ac-iPSMA-RGD for Alpha-Therapy Dual Targeting of Stromal/Tumor Cell PSMA and Integrins. *Int J Mol Sci.* 2023 Dec 1;24(23).
25. PC-3 CRL-1435 TM [Internet]. 2022. Available from: www.atcc.org
26. Zhang Q, Helfand BT, Carneiro BA, Qin W, Yang XJ, Lee C, et al. Efficacy Against Human Prostate Cancer by Prostate-specific Membrane Antigen-specific, Transforming Growth Factor- β Insensitive Genetically Targeted CD8⁺ T-cells Derived from Patients with Metastatic Castrate-resistant Disease. *Eur Urol.* 2018 May;73(5):648–52.
27. Xiong R, Samal SK, Demeester J, Skirtach AG, De Smedt SC, Braeckmans K. Laser-assisted photoporation: fundamentals, technological advances and applications. Vol. 1, *Advances in Physics: X.* 2016.
28. Xiong R, Raemdonck K, Peynshaert K, Lentacker I, De Cock I, Demeester J, et al. Comparison of gold nanoparticle mediated photoporation: Vapor nanobubbles outperform direct heating for delivering macromolecules in live cells. *ACS Nano.* 2014 Jun 24;8(6):6288–96.

29. Galisteo-González F, Monasterio BG, Gil D, Valle M, Goñi FM. Photoacoustic effect applied on model membranes and living cells: direct observation with multiphoton excitation microscopy and long-term viability analysis. *Sci Rep.* 2020 Dec 1;10(1).
30. Alonso Fernández B. *El láser, la luz de nuestro tiempo.* [Globalia]; 2010.
31. Peng Q, Juzeniene A, Chen J, Svaasand LO, Warloe T, Giercksky KE, et al. Lasers in medicine. *Reports on Progress in Physics.* 2008;71(5).
32. Renk KF. *Graduate Texts in Physics Basics of Laser Physics* [Internet]. 2017. Available from: <http://www.springer.com/series/8431>
33. Ministry of Science and Education. Ministry of Science and Education <https://clpu.es/divulgacion/bits/que-tipos-de-laseres-hay>. 2013. ¿Qué tipos de Láseres hay?
34. DOF - Diario Oficial de la Federación. DOF. 2019;
35. Alonso-Urquijo Iruarrizaga Zuzendaria D, Ortega Aperribay J. *Fundamentos de los láseres. El láser de Nd:YAG.* 2017.
36. Amador S& GB. *Introduction to Physics in Modern Medicine Third Edition.* 2020.
37. Du X, Zhao M, Jiang L, Pang L, Wang J, Lv Y, et al. A mini-review on gene delivery technique using nanoparticles-mediated photoporation induced by nanosecond pulsed laser. Vol. 31, *Drug Delivery.* Taylor and Francis Ltd.; 2024.
38. España-Tost AJ, Arnabat-Domínguez J, Berini-Aytés L, Gay-Escoda C. *Aplicaciones del láser en Odontología.* RCOE. 2004 Oct;9(5).
39. Luis J, Barcina S, Rico M, Jubera M. *Estudio de Interacción LÁSER con Materiales Biológicos.* Salamanca; 2017 Jun.
40. Francisco Navarro-Reynoso AP, Pérez-Romo A, Green-Schneeweiss L. *Consideraciones sobre el uso del láser Nd:YAG en neumología.*

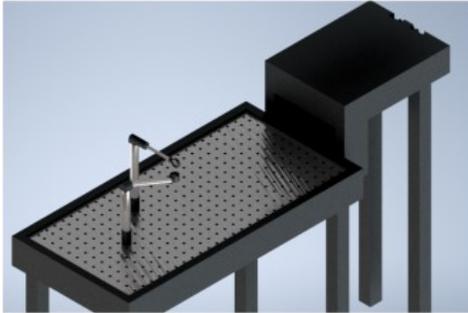
41. Mordon S, Trelles MA. Cirugía plástica Ibero-Latinoamericana: Ventajas de la cicatrización cutánea asistida por láser (LASH). "Advantages of laser assisted scar healing (LASH)". [Internet]. Vol. 37, Cir.plást. iberolatinoam. España; 2011 Dec. Available from: www.ekkyo.com
42. Banavath HN, Allam SR, Valathati SS, Sharan A, Rajasekaran B. Femtosecond laser pulse assisted photoporation for drug delivery in Chronic myelogenous leukemia cells. *J Photochem Photobiol B*. 2018;187.
43. Taroni P, Paganoni AM, Ieva F, Pifferi A, Quarto G, Abbate F, et al. Non-invasive optical estimate of tissue composition to differentiate malignant from benign breast lesions: A pilot study. *Sci Rep*. 2017;7.
44. Galisteo-González F, Monasterio BG, Gil D, Valle M, Goñi FM. Photoacoustic effect applied on model membranes and living cells: direct observation with multiphoton excitation microscopy and long-term viability analysis. *Sci Rep*. 2020 Jan 15;10(1):299.

Capítulo 7. ANEXOS

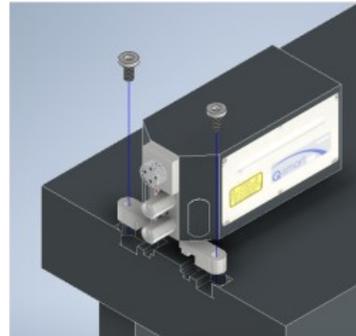
Anexo 1. Manual del laser Nd:YAG

Detalles de operación del Láser Nd:YAG

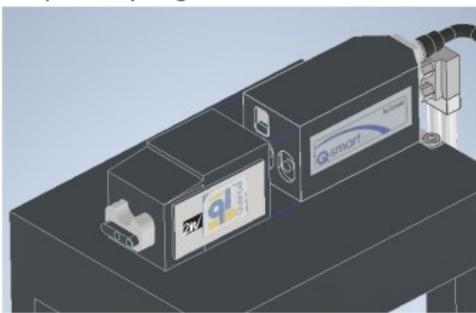
- Establecer una mesa de trabajo para montar los cabezales del láser



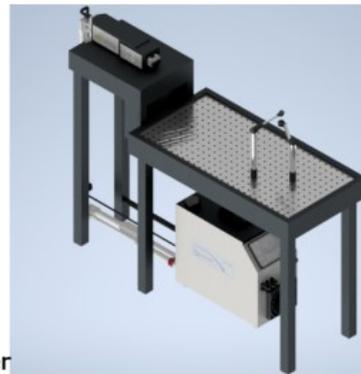
- Usar tornillos para los sujetadores de la cabeza del láser



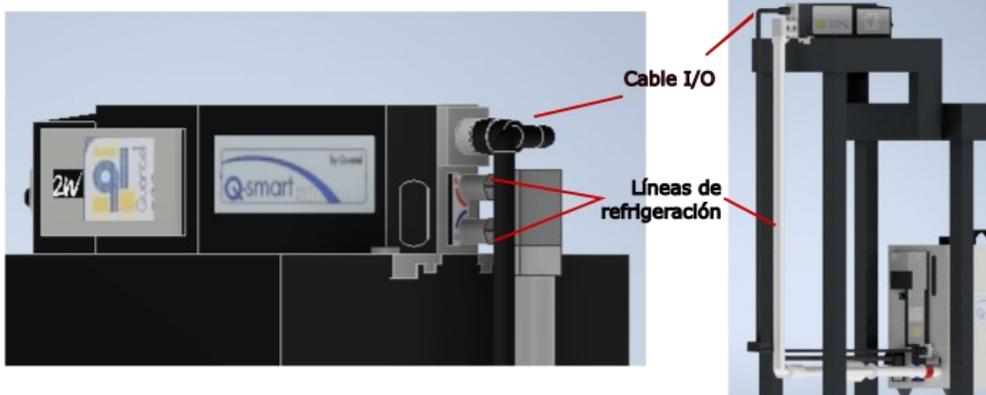
- Usar tornillos para ensamblar los cabezales del primer y segundo armónico del láser



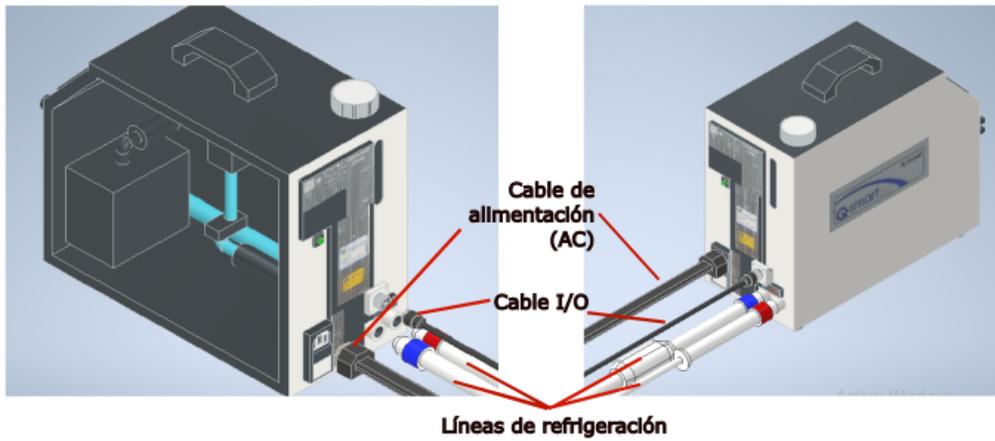
- Organizar los cabezales del láser y el módulo de operación en la mesa de trabajo



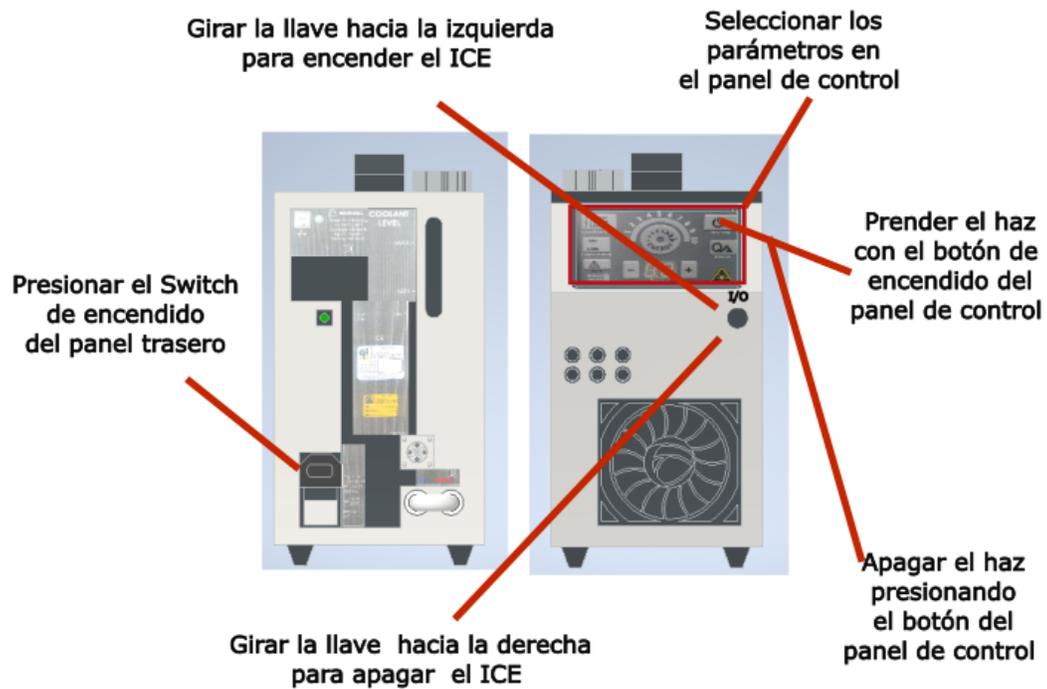
- Conectar las líneas de refrigerante (Rojo/Azul) y el cable I/O del ICE (Módulo de operación) del láser



- Conectar las líneas de refrigerante (Rojo/Azul), el cable I/O y el cable de alimentación en el ICE(módulo de operación)

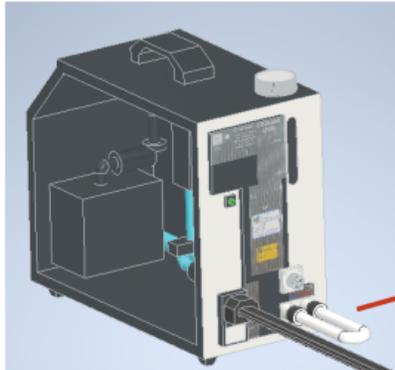


- Encender y apagar el láser



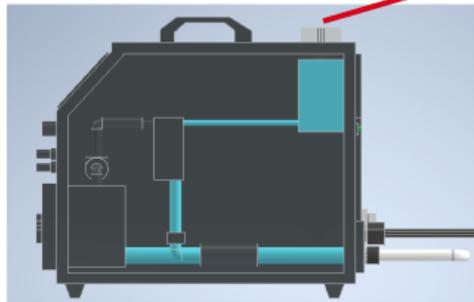
Mantenimiento del láser Nd:YAG

Desconectar las líneas de refrigeración y cable I/O del ICE(módulo de operación) y conectar el tubo para drenar



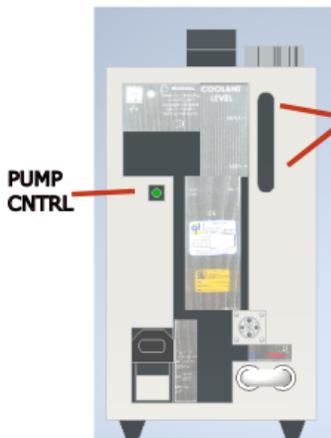
El tubo para drenar permite circular el sistema de enfriamiento del ICE (Módulo de operación)

Llenar el sistema de enfriamiento con agua destilada hasta alcanzar la línea de llenado MAX



Contenedor para llenar el sistema de enfriamiento

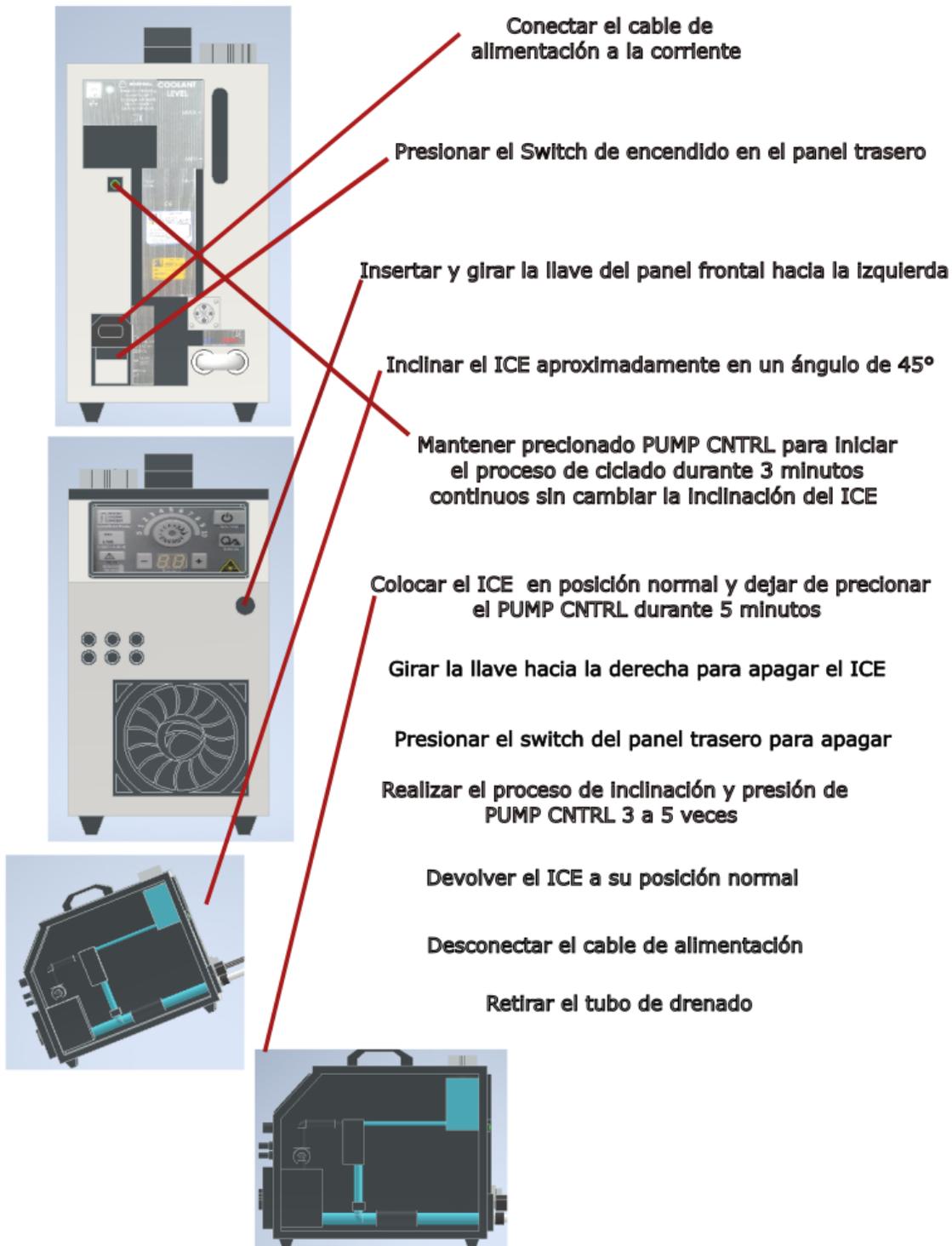
Localizar el PUMP CNTRL el cual permitirá circular en agua destilada en la bomba del ICE



Indicador de llenado

PUMP CNTRL

- **Drenar el sistema de enfriamiento mediante el botón PUMP CNTRL ubicado en el panel trasero, siguiendo los pasos a continuación:**



Anexo 2. Código de Arduino y Termopar

```
// Sample Arduino MAX6675 Arduino Sketch
#include "max6675.h"
#include <avr/sleep.h>
int ktcSO = 11;
int ktcCS = 12;
int ktcCLK = 13;
int i=0;
MAX6675 ktc(ktcCLK, ktcCS, ktcSO);
float temperatura=0.0; // Temperature output variable
float t=0.0; // variable de tiempo
void setup() {
  Serial.begin(9600); // give the MAX a little time to settle
  delay(1000); // DDRD= B11111100;
}
void loop()
{
  if (i<=10) //el 10, indica que son 10 segundos de medición
  {
    temperatura=ktc.readCelsius();
    Serial.print( i+1);
    Serial.print( " Temperatura = ");
    Serial.print(temperatura);
    Serial.println(" C");
    delay(1000);
    i= i+1; } else {
  sleep_enable ();
}
}
```

Anexo 3. Células PC3 y medios de cultivo

Preparación de medios de cultivo

Medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute).

Es único con respecto a otros medios ya que contiene el agente reductor glutatión y altas concentraciones de vitaminas lo cual da pie a una amplia aplicabilidad para el crecimiento de diversos cultivos celulares,

Preparación:

1. Se midió aproximadamente 90% de agua tridestilada (15-20°C).
2. Adicionar:
Medio (10.10 g/L).
Bicarbonato de sodio (NaHCO₃) al 5.6% por litro de medio.
Hepes (4-(2-hydroxyethyl)-1 -piperazineethane sulfuric acid) al 25.7%.
3. El pH debe ser ajustado a 7.4, utilizando HCl 1N (ácido clorhídrico) o NaOH 0.1N(hidróxido de sodio).
4. Se agrega SBF, antibiótico y el medio es aforado con dddH₂O hasta completar el volumen deseado.
5. Se esteriliza mediante filtración por membrana, con presión positiva.

Medio DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium).

Es un medio basal que mantiene el crecimiento de varios tipos de células de mamífero.

Preparación:

1. Se utiliza aproximadamente el 90% de agua destilada (disolvente).
2. Se agrega:
Medio F-12 (10.60 g/L)
Medio DMEM (13.40 g/L)
Glucosa o dextrosa al 14.6%
Bicarbonato de sodio al 15.4%
HEPES al 10.9% por litro de medio.
3. Cuando los elementos están totalmente disueltos, se ajusta el pH a 7.4.
4. El medio es aforado al volumen requerido, se retira un poco de medio y se adiciona SBF (10%) y antibiótico (1%).
5. Se completa la cantidad de medio esperado con el medio que se retiró y se culmina, con el proceso de esterilización.

Medio PBS (Phosphate Buffered Saline)

Solución Salina Amortiguada por Fosfatos constituye una solución amortiguadora de pH, su osmolaridad y concentración de iones es muy semejante a la del líquido extracelular, además de ser isotónica y no tóxica.

Es una solución empleada comúnmente para lavar células a través de centrifugación.

Preparación:

1. Cada pastilla de PBS se debe disolver en 100 ml de agua destilada. Este tampón contiene 10 mM de fosfato y 150 Mm de cloruro sódico con un pH de 7,3 a 7,5.
2. Las pastillas al no ser estériles deben ser filtradas por un filtro de 0,2 μ M.

Cultivo de las células PC3 y HCT

Estos procedimientos se llevaron a cabo bajo condiciones de asepsia y en la cabina de flujo laminar en el laboratorio de cultivos celulares. De acuerdo con las hojas de producto de las células a cultivar (PC3 y HCT) (*Anexo 3*) y los medios de cultivo listos, el procedimiento fué el siguiente:

1. Descongelar el vial de las líneas celulares* (PC3 y HCT) agitándolo suavemente en un baño de agua a 37°C manteniendo la tapa fuera del agua. (La descongelación debe ser rápida, aproximadamente 2 minutos).
2. Los medios celulares, PBS y tripsina fueron calentados a 36.5°C (temperatura fisiológica) **
3. Retirar el vial del baño de agua tan pronto se descongele el contenido.
4. Descontaminar el vial rociándolo con etanol al 70%.
(Nota: Todas las operaciones a partir de este momento deben realizarse bajo estrictas condiciones de asepsia).
5. Con una pipeta Pasteur transferir el contenido del vial en un tubo de 15 ml y adicionar PBS 1X estéril a 37°C.
6. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos.
7. Agregar medio de cultivo RPMI
8. Resuspender con vórtex***
9. Colocar en placa de cultivo e incubar en un ambiente humidificado con 5% de CO₂ A 36.5°C hasta que ocupe toda la superficie disponible alcanzando confluencia de un 90% (10⁶ células por caja).

* Condiciones de crecimiento (temperatura 37°C, atmósfera 95% aire, 5% CO₂) Para asegurar el nivel más alto de viabilidad debe almacenarse en fase de vapor de nitrógeno líquido ya que el almacenamiento a -70°C provocará la pérdida de viabilidad.

** las células en cultivo son capaces de soportar sin daños importantes variaciones de temperatura siempre que sean por debajo de la temperatura corporal de origen. Las células humanas soportan incubaciones a 4°C durante días y pueden ser congeladas a -196°C durante años. Sin embargo, no sobreviven más de unas pocas horas a variaciones de 2°C por encima de 37°C.

***Un agitador vórtex sirve para mezclar y revolver sustancias líquidas.

Mantenimiento de los cultivos celulares

Los cultivos celulares al igual que los medios de cultivo fueron etiquetados con su fecha, nombre y tipo celular. Se mantuvieron en un incubador el cual mantenía la temperatura es una atmósfera con una tensión controlada de CO₂.

La humedad ambiente elevada se requirió a fin de reducir la evaporación de agua del medio y mantener los cultivos.

De igual forma fue importante la recirculación del aire en el interior del incubador, a fin de homogeneizar la temperatura en su interior.

Cada dos días se llevó a cabo un cambio de medio y monitoreo con el microscopio, cuidando el nivel de CO₂, los cambios de temperatura, la humedad y la conservación del pH fisiológico.

El cultivo de líneas celulares debía proliferar y crecer notablemente. Cuando las células ocuparan toda la superficie disponible se identificaba que habían alcanzado la *confluencia*, etapa en la que las células inhiben su proliferación y el crecimiento se detiene.

Mediante la monitorización al microscopio se evaluaba la confluencia y si esta era superior al 80% se debe realizar subcultivo (*tripsinización*).

Subcultivo celular (tripsinización).

Este procedimiento al igual que los procedimientos de preparación de medios de cultivo y cultivos celulares se lleva a cabo bajo condiciones de asepsia y en la cabina de flujo laminar.

1. Con una pipeta Pasteur debemos remover el medio y desecharlo en un vaso con *lejía*.
2. Lavar el bote de cultivo sin el medio con 1 ml de PBS para limpiar el medio que haya podido quedar y quitar el calcio.
3. Una vez lavado, debemos despegar las células adherentes del sustrato y agregar 2-3 ml *tripsina-EDTA*

4. Incubar a 37°C (5 a 15 minutos) con el propósito de activar la tripsina y que esta degrade las proteínas que mantiene a las células adheridas.
5. Observar en el microscopio que las células se despeguen en dado caso que no se despeguen del sustrato, volver a incubar 30 minutos.
6. Inactivar la tripsina con suero o medio suplementado (4mL aproximadamente).
7. Recopilar toda la solución y depositar en un tubo Eppendorf.
8. Centrifugar 3000 rpm x 5 minutos para separar las células del medio de cultivo
9. Decantar con pipeta Pasteur para eliminar la mayoría del medio de cultivo.
10. Resuspender suavemente con pipeta Pasteur
11. Cultivar en una nueva caja.

Una vez alcanzada una máxima proliferación de células, lo que se procede hacer es el conteo y distribución celular. Este proceso es importante ya que las células cultivadas se distribuirán en una placa de 96 pozos y por lo tanto es necesario que se distribuyan 5000 células en cada pozo.

Conteo y distribución celular

El conteo celular consistió en un ensayo de exclusión con *azul de tripano**, el cual es un colorante que permite teñir las células que no conservan su integridad membranal (consideradas células muertas).

Para cada suspensión de células individuales (adherentes y flotantes), una muestra de suspensión celular mezclada con *azul de tripano*, proporción 1:1 (20 μ L – 20 μ L) fue recogida con una micropipeta y colocada en una de las ranuras de la cámara de Neubauer.**

El proceso de conteo se realiza de la siguiente forma:

1. Recopilar todo lo que hay en la caja de cultivo con una pipeta Pasteur en un tubo falcom.
2. Recopilar 100 μ l de células con una micropipeta y trasvasarlo a un tubo eppendorf.
3. Añadir 100 μ l de azul tripano.
4. Montar la cámara de Neubauer en un portaobjetos.
5. Con una micropipeta introducir la disolución de tripano y las células (Se colocará en el borde de la cámara y por capilaridad se rellenará).
6. Llevar al microscopio óptico y se contará las células que estén dentro de los cuadrantes de las esquinas.

7. Se cuenta los cuatro cuadrantes y luego se hace la media de los 4 cuadrantes y luego se multiplica por el volumen que puede haber en la cámara y el cubre hay 0,1 mm y que un ml son 1000 mm³

**El azul de tripano tiñe las células muertas de azul, ya que estas al estar muertas su membrana no es capaz de expulsar el tinte, por otro lado, las células que están vivas al estar en su membrana plasmática funcionando no permite que el tinte se introduzca y por eso se ven refrigerantes al microscopio.*

***La cama Neubauer consta de una placa que posee dos cámaras de recuento reticuladas y dos columnas laterales que poseen una altura de 0,1 mm de altura. El retículo posee 9 cuadrantes y cada cuadrante corresponde a una cantidad máxima de células disponibles.*

Anexo 4. Metodología para imágenes de inmunofluorescencia.

En el software ImageJ se seleccionaron las imágenes .tiff con formato DAPI en el cual se generó una máscara binaria para la identificación de los núcleos de las células.

Por otro lado, las imágenes con formato IP muestran el citoplasma celular, el cual representa una zona de interés (ROI) para la cuantificación en porcentaje del color de la imagen.

Para la generación de la máscara binaria del formato DAPI, se aplicó un LUT en escala de grises la cual binarizó la imagen, se invirtió y cambió el brillo y contraste para delimitar los espacios del núcleo (áreas oscuras) y variación del umbral el cual permite dividir una imagen en dos o más clases de píxeles. con el objetivo de separar los núcleos del fondo, si bien algunos núcleos no están superpuestos se están tocando y que es necesario separar para poder segmentarlos.

Finalmente se realiza un proceso binario a la imagen como *Watershed*, el cual separa los píxeles de la segmentación y *Fill holes* el cual permite rellenar huecos visibles en el núcleo.

Una vez establecida la ROI mediante la máscara binaria obtenida en la imagen DAPI se realiza una operación de sustracción en la imagen IP para eliminar los núcleos.

Con la herramienta *Measure* evaluamos la intensidad de color en la imagen final (sin núcleos) de la IP. En el software ImageJ se seleccionaron las imágenes .tiff con formato DAPI en el cual se generó una máscara binaria para la identificación de los núcleos de las células.

Por otro lado, las imágenes con formato IP muestran el citoplasma celular, el cual representa una zona de interés (ROI) para la cuantificación en porcentaje del color de la imagen.

Para la generación de la máscara binaria del formato DAPI, se aplicó un LUT en escala de grises la cual binarizó la imagen, se invirtió y cambió el brillo y contraste para delimitar los espacios del núcleo (áreas oscuras) y variación del umbral el cual permite dividir una imagen en dos o más clases de píxeles con el objetivo de separar los núcleos del fondo, si bien algunos núcleos no están superpuestos se están tocando y que es necesario separar para poder segmentarlos.

Finalmente se realiza un proceso binario a la imagen como *Watershed*, el cual separa los píxeles de la segmentación y *Fill holes* el cual permite rellenar huecos visibles en el núcleo.

Una vez establecida la ROI mediante la máscara binaria obtenida en la imagen DAPI se realiza una operación de sustracción en la imagen IP para eliminar los núcleos.

Con la herramienta *Measure* evaluamos la intensidad de color en la imagen final (sin núcleos) de la IP.