



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**UNIDAD IZTAPALAPA**

*Cambios en la intensidad de  
fluorescencia de la molécula NADH  
en células mononucleares de rata por la  
irradiación con láser IR de baja intensidad.*

PRESENTA

Ing. J. Triny Hernández Jaime

**TESIS**

Para obtener el grado de:  
Maestro en Ingeniería Biomédica

**Asesores:**

Dr. Manuel Fernández Guasti.

Dr. José Rafael Godínez Fernández

**Sinodales:**

**Presidente:**

Dr. José Rafael Godínez Fernández

**Secretario:**

Dr. Rubén Ramos García

**Vocal:**

Dr. Francisco Javier Renero Carrillo





# Índice

Índice .....	3
Índice de Figuras.....	9
Índice de tablas .....	15
Resumen.....	16
Introducción .....	17
Descripción del trabajo.....	19
Hipótesis.....	21
Justificación .....	21
Objetivos .....	22
Capítulo 1 .....	24
Fisiología .....	24
1.1 La célula.....	24
1.2 Células Mononucleares de sangre periférica (CMNSP) .....	26
1.3 El metabolismo celular .....	28
1.3.1 Metabolismo .....	28
1.3.2 Anabolismo y catabolismo.....	28
1.3.3 Mitocondrias .....	29
1.3.4 Mitocondrias generadoras de energía.....	29
1.3.5 Respiración celular y la cadena de transporte de electrones (CTE).....	32
1.3.6 El ATP fuente de energía.....	36
1.3.7 Coenzimas .....	36
1.3.8 Factores que condicionan la actividad enzimática .....	37
1.3.9 Algunas coenzimas importantes.....	37
1.3.10 Las coenzimas transportadoras de electrones .....	38
1.3.11 La utilidad del NADH para propósitos analíticos .....	39
1.3.12 Concentración de NADH en las células.....	40
1.4 Inflamación.....	40



1.4.1 El proceso inflamatorio.....	40
1.4.2 Fases de la inflamación.....	41
1.5 Radicales libres, especies reactivas .....	45
1.5.1 Radicales Libres .....	45
1.5.2 Los radicales libres en el organismo.....	46
1.5.2.1 Formación de radicales libres.....	46
1.5.2.2 Exceso de radicales libres .....	47
1.5.3 Especies reactivas del oxígeno (ERO) .....	48
1.5.3.1 Producción de ERO en las mitocondrias.....	49
1.5.3.2 El óxido nítrico (NO•) .....	50
1.5.3.3 El óxido nítrico Sintetasa .....	51
1.5.3.4 El óxido nítrico, la célula y la cadena respiratoria.....	52
1.5.3.5 NADPH y especies reactivas de oxígeno (ERO) .....	53
1.5.3.6 La luz ultravioleta y la generación de especies reactivas .....	55
1.5.3.7 Sistemas antioxidantes.....	56
1.5.3.9 El factor nuclear kappa B sensor del estrés oxidativo .....	57
1.6 Apoptosis .....	58
Capítulo 2 .....	61
Fluorescencia .....	61
2.1 Introducción.....	61
2.2 Luminiscencia, interacción de la radiación electromagnética .....	63
2.3 Estados singulete y triplete .....	70
2.4 Diagrama de Jablonski, corrimiento de Stokes, regla de Kasha.....	71
2.5 Modos de disipación del estado excitado y rendimiento cuántico. ....	72
2.6 Relación entre la IF y la concentración de la muestra .....	74
2.7 Propiedades del fenómeno de fluorescencia.....	77
2.8 Compuestos fluorescentes .....	78
2.8 Aplicaciones médicas de la espectroscopia de fluorescencia.....	79
2.9 Fluorescencia de la molécula NADH .....	81
2.9.1 La función mitocondrial en vivo evaluada por fluorescencia de NADH.....	83



2.10 Influencia de la temperatura en la fluorescencia.....	84
2.10.1 Efectos de la temperatura en la fluorescencia de $\beta$ – NADH.....	84
2.11 Quenching de fluorescencia.....	85
2.12 Fluorescencia del NADH mitocondrial a diferentes niveles de oxigenación.....	86
2.13 Fluorescencia del NADH en la cadena respiratoria celular; influencia de Inhibidores y desacopladores.....	87
2.14 Instrumentación .....	87
2.14.1 Fuentes de espectrofotómetros de fluorescencia .....	88
2.14.2 Fluorescencia inducida por láser (LIF) .....	88
2.14.3 Filtros ópticos .....	90
2.14.4 Fotodetectores.....	92
2.14.5 Cubetas para espectrofotómetro.....	93
2.14.6 Fibra óptica.....	94
Capítulo 3 .....	96
Terapia Láser de Baja Intensidad (TLBI). .....	96
3.1 Introducción.....	96
3.2 Antecedentes de la terapia láser .....	97
3.3 Conceptos básicos sobre la operación del láser.....	98
3.3. 1 Características de la emisión de la radiación .....	100
3.3.2 Resonador óptico .....	101
3.4 Propiedades de la radiación láser .....	103
3.5 Parámetros aplicados a TLBI.....	104
3.6 Dosis de la terapia láser.....	107
3.6.1 Dosis bifásica .....	110
3.7 Formas de aplicación de la TLBI .....	113
3.8 Tecnología del láser utilizado en medicina. ....	114
3.9 Primeras aplicaciones de la Terapia láser de baja intensidad.....	116
3.10 Controversia de la Terapia láser de baja intensidad.....	117
3.11 Aplicaciones médicas con Terapia láser de baja intensidad.....	118
3.12 Mecanismos biofísicos y bioquímicos por los que se explican los efectos de la Terapia láser de baja intensidad. ....	121



3.12.1 Los fotorreceptores y cromóforos celulares.....	121
3.12.2 Fotobiología y Óptica del Tejido en Terapia láser de baja intensidad .....	121
3.12.3 Mitocondrias y Terapia láser de baja intensidad.....	124
3.12.4 Terapia láser de baja intensidad (TLBI) y el COX oxidasa (COX) .....	126
3.12.5 Aumento de ATP por aplicación de radiación IR.....	128
3.12.6 Aumento de ERO y ERN por aplicación de radiación IR.....	128
3.12.7 Radiación IR, ERO y factores de transcripción .....	129
3.12.8 Radiación IR, proliferación celular, factores de crecimiento, migración y adhesión celular .....	130
3.12.9 Radiación IR y anti-apoptosis en cultivo de tejidos .....	130
3.12.12 Radiación IR y los mediadores inflamatorios .....	131
3.12.13 Radiación IR, Síntesis de colágeno y Miofibroblastos.....	131
3.12.15 Radiación IR y Modulación Neuronal .....	132
3.13 Tratamientos láser precauciones y contraindicaciones.....	132
3.14 Seguridad de acuerdo a normas .....	133
Capítulo 4 .....	134
Materiales y métodos. ....	134
4.1 Animales: .....	134
4.2 Obtención de la muestra .....	134
4.2.1 Material para obtención de la muestra .....	135
4.2.2 Técnica para obtención de la muestra.....	136
4.3 Preparación de disoluciones.....	138
4.3.1 Preparación de Coumarina en etanol.....	139
4.3.2 Preparación $\beta$ -NADH .....	141
4.4 Tipos de Láser utilizados:.....	144
4.5 Estructura para medición de fluorescencia .....	146
4.6 Sistema de captura de espectros de fluorescencia .....	148
4.7 Estimulación láser para la obtención de fluorescencia .....	150
4.8 Dosis de exposición .....	152
4.9 Obtención y promediación de espectros .....	153
4.9.1 Programas para la graficación de espectros.....	155



4.10 Gráficas de IF en función del tiempo.....	156
4.11 Prueba del sistema de espectroscopia Avantes .....	157
4.12 Prueba de aumentos de temperatura.....	158
4.12.1 Caracterización del peltier .....	160
4.13 Arreglo experimental para pruebas de estabilidad del láser.....	161
4.13.2 Material y equipo empleado para ver estabilidad del láser .....	164
5.0 Resultados .....	165
5.1 Prueba de adquisición del sistema de espectroscopia.....	165
5.2 Espectros de fluorescencia de NADH en CMNSPR y $\beta$ -NADH en solución 5 $\mu$ M.....	165
5.2.1 Espectros de fluorescencia de NADH en CMNSPR, MFC, con y sin aplicación de radiación láser IR, 2 casos (uno para cada condición). .....	166
5.2.2 Espectros promedio de fluorescencia de NADH en CMNSPR, MFC, con y sin aplicación de radiación láser IR, 2 casos (uno para cada condición). .....	167
5.2.3 Espectros promedio de fluorescencia NADH de CMNSPR, MFC, normalizados con y sin aplicación de radiación láser IR, 10 casos (5 para cada condición).....	168
5.2.4 Espectros promedio de fluorescencia $\beta$ -NADH, MFC, con y sin aplicación de radiación láser IR, 2 casos (1 para cada condición). .....	169
5.2.5 Espectros promedio de fluorescencia NADH de CMNSPR, MFI, normalizados, con y sin aplicación de radiación láser IR, 10casos (5 para cada condición).....	170
5.3 IF en el tiempo de NADH en CMNSPR y de $\beta$ -NADH en solución.....	171
5.3.1 IF en el tiempo de $\beta$ -NADH sin aplicación de aplicación de radiación láser IR. ....	172
5.3. 2 IF en el tiempo de $\beta$ -NADH con aplicación de aplicación de radiación láser IR.....	173
5.3.3 Ajuste logaritmico de curvas de IF en el tiempo de $\beta$ -NADH en solución.....	173
5.3.4 Curvas de IF en el tiempo de NADH en CMNSPR, con y sin aplicación de radiación láser IR. ....	175
5.3.5 Curvas de IF en el tiempo, de NADH en CMNSPR, 10 casos, con y sin TLBI, 440 nm. ....	176
5.3.6 Curvas de IF en el tiempo, de NADH en CMNSPR, 10 casos, con y sin aplicación de radiación láser IR, 460 nm. ....	176
5.4.0 Ajuste logaritmico de las curvas de IF en el tiempo de NADH en CMNSPR, en solución fosfato 5 $\mu$ M, 10 casos. ....	177
5.5 Graficas de la media y desviación estandar de IF en el tiempo, NADH de CMNSPR, con y sin aplicación de radiación láser IR.....	178
5.5.1 Graficas de la media y desviación estandar de IF en el tiempo, NADH de CMNSPR, con y sin aplicación de radiación láser IR, 440 nm, MFC.....	179



5.5.2 Graficas de la media y desviación estandar de IF en el tiempo a 460 nm, NADH de CMNSPR, con y sin aplicación de radiación láser IR, MFC. ....	179
5.5.3 Graficas de la media y desviación estandar de IF a 440 nm , en el tiempo, NADH de CMNSPR, con y sin aplicación de radiación láser IR, MFI. ....	180
5.5.4 Graficas de la media y desviación estandar de IF en el tiempo, NADH de CMNSPR, con y sin aplicación de radiación láser IR, 460 nm, MFI. ....	181
5.6 Comparación de Medias y desviaciones estándar de IF de NADH en CMNSPR con y sin aplicación de radiación láser IR, MFC y MFI. ....	182
5.6.1 Grafica comparativa de la media estadística de la IF a 440 y 460 nm de NADH en CMNSPR en MFC, con y sin TLBI. ....	183
5.6.2 Grafica comparativa de la media estadística de la IF a 440 y 460 nm de NADH en CMNSPR en modo de fluorescencia intermitente, con y sin aplicación de radiación láser IR.....	184
5.6.3 Grafica comparativa de la media estadística de la IF de NADH en CMNSPR en modo de fluorescencia continua e intermitente, con y sin radiación láser IR 440 y 460 nm.....	184
5.6.4 Grafica comparativa de variaciones en la IF a 440 y 460 nm de NADH en CMNSPR en MFC y MFI, con y sin radiación láser IR.....	185
5.7 Prueba estadistica t-test para 2 casos, comparación de IF de CMNSPR con y sin aplicación de radiación láser IR. ....	187
5.8 Caracterización del peltier .....	188
5.9 Decaimiento de IF por aplicación de temperatura en Cumarina 460, 50 $\mu$ M. ....	188
5.10 Decaimiento de IF por aplicación de temperatura en solución $\beta$ -NADH, 5 $\mu$ M. ....	189
5.11 Decaimiento de IF por aplicación de temperatura en solución NADH de CMNSPR 5 $\mu$ M....	190
5.12 Intensidad fluorescente de Cumarina 460, 50 $\mu$ M por aplicación de radiación láser IR. ....	190
5.13 Estabilidad del láser Nd-Yag.....	191
5.14 Tablas comparativas del MFC y MFI .....	192
6 Analisis de resultados.....	194
6.1 Efectos térmicos en la intensidad de fluorescencia en soluciones NADH de CMNSPR, Cumarina 460 y $\beta$ -NADH.....	194
6.2 Variaciones en la Intensidad de fluorescencia en MFC. ....	194
6.3 Variaciones en MFI.....	195
6.4 Ajuste logaritmico de la IF .....	195
6.5 Decaimiento de la IF. ....	196
6.6 Recuperación de la IF.....	196
6.7 Prueba t de student. ....	197





6.8 Picos maximos de intensidad de fluorescencia. ....	197
6.9 Discusión de resultados. ....	197
6.9.1 Picos de fluorescencia en 440 y 460 nm.....	197
6.9.2 Decaimiento logarítmico: .....	198
6.9.3 Mayor variación de IF de NADH en CMNSPR por radiación láser IR .....	199
6.9.4 Decaimiento de $\beta$ -NADH .....	202
7 Conclusiones.....	206
7.1 Perspectivas.....	207
Bibliografía .....	209
Anexo técnico: .....	232
Programa para adquisición de datos con la tarjeta PicoLog ADC24.....	232

## Índice de Figuras

Figura 1. 1 Dos tipos de células: Eucariota y Procariota [38]. ....	25
Figura 1. 2 Las células mononucleares son fáciles de obtener y purificar, lo cual las hace ideales para estudios de espectroscopia láser [42] [43]. ....	27
Figura 1. 3 La inmunidad adquirida se induce como respuesta a un antígeno (Ag) específico, tras la colaboración de células fagocíticas (M), linfocitos (T) y (B) [44]. ....	27
Figura 1. 4 Receptores de los linfocitos T y B.....	28
Figura 1. 5 Célula animal y su mitocondria: modificada de [37] .....	30
Figura 1. 6 Mitocondria, catabolismo y generación de ATP [49]. ....	30
Figura 1. 7 Fosforilación oxidativa formada por 5 complejos [48].....	31
Figura 1. 8 Glucólisis; modificada de [48]. ....	32
Figura 1. 9 Respiración celular: Oxidación de moléculas orgánicas para la obtención de energía [51]. ....	33
Figura 1. 10 Ciclo de Krebs [53]. ....	33
Figura 1. 11 Flujo metabólico de la glucosa: la vía glucolítica, la entrada de Piruvato a la mitocondria y al ciclo de Krebs, y la entrega de compuestos reductores NADH, FADH, a la cadena de fosforilación oxidativa [55]. ....	35
Figura 1. 12 Esquema del metabolismo redox $\text{NAD}^+$ , NADH [58]. ....	38
Figura 1. 13 La inflamación, es encaminada a restaurar la homeostasis, pero, puede derivar en diferentes escenarios [70]. ....	41
Figura 1. 14 Una molécula estable al perder un electrón se vuelve inestable, si se da a nivel celular se le llama radical libre, modificado de [82]. ....	47



Figura 1. 15 Generación de ERO, a partir de oxígeno, mediante redistribución electrónica o por reducción secuencial con un electrón [89] .....	49
Figura 1. 16 Reacción general para la formación de Óxido nítrico, catalizada por las Óxido nítrico sintasas (NOS) [90].....	50
Figura 1. 17 Interacción del óxido Nítrico con la NADPH oxidasa, precursora de especies reactivas de nitrógeno, las cuales en una alta concentración inhiben a la misma NADPH [65].....	53
Figura 1. 18 El proceso de fagocitosis promueve la translocación de los componentes citosólicos a la membrana de los fagocitos donde se ensambla el sistema NADPH oxidasa. ....	54
Figura 1. 19 Factor NF-KB sensor del estrés oxidativo, que controla la transcripción del ADN [102]. .....	58
Figura 1. 20 Apoptosis y Necrosis [106] .....	60
Figura 2. 1 Representación del espectro electromagnético en función de la longitud de onda en metros y nanómetros [125].....	63
Figura 2. 2 A) Representación del modelo de Bohr y B) representa la distribución de probabilidad de encontrar al electrón en cierta región del espacio, del átomo de hidrogeno [131].....	66
Figura 2. 3 Número cuántico principal (n) [131]. ....	67
Figura 2. 4 El Número cuántico azimutal "l", describe el momento angular orbital [134]. ....	68
Figura 2. 5 Orientación espacial para un nivel cuántico principal n=3 [135].....	69
Figura 2. 6 Espín de un electrón [136]. ....	69
Figura 2. 7 Estado fundamental y excitado de una molécula [113]. ....	70
Figura 2. 8 Estado fundamental singlete ( $S_0$ ) de una molécula y estados excitados singlete ( $S_1$ ) y triplete ( $T_1$ ). Los símbolos ( $\uparrow\downarrow$ ) y ( $\uparrow\uparrow$ ) representan pares de electrones con espín antiparalelo y paralelo, respectivamente. ....	71
Figura 2. 9 Mecanismos de excitación y emisión de la fluorescencia [141] .....	72
Figura 2. 10 Diagrama de energía de Jablonski, representando los niveles de energía electrónicos en una molécula, la estructura, y sus posibles transiciones: a) Transiciones del estado base al estado excitado, b) Pérdida de energía no radiativa, c) Transición radiativa a un estado más bajo. Modificado de [113]......	73
Figura 2. 11 Fenómenos ópticos que suceden en el interior de una celda con una solución en su interior [144] .....	75
Figura 2. 12 La IF dependiente de la concentración donde <b>QO</b> es la eficiencia cuántica del proceso de fluorescencia, modificada de [146]......	77
Figura 2. 13 Estructura química de sustancias fluorescentes. Estas cinco sustancias tienen una base de solvente y se preparan en el laboratorio para producir las soluciones resplandecientes [147]. ....	78
Figura 2. 14 Características ópticas del tejido [149].....	79
Figura 2. 15 Espectros de absorción de fluoróforos, presentes en los tejidos [150].....	80
Figura 2. 16 Espectros de fluorescencia de fluoróforos, presentes en los tejidos [150] .....	80
Figura 2. 17 NAD <sup>+</sup> , NADH y NADPH compuestos dinucleótidos, constan de dos nucleótidos unidos a través de sus grupos fosfato; con un nucleótido que contiene adenina y el otro que contiene nicotinamida [155]. ....	82



Figura 2. 18 Espectros de absorción del $\text{NAD}^+$ y $\text{NADH}$ [134].....	83
Figura 2. 19 Espectro de absorción del lado izquierdo y de fluorescencia lado derecho concentración $10^{-4}\text{M}$ [60] .....	83
Figura 2. 20 Incremento de la emisión de fluorescencia de $\beta\text{-NADH}$ en glicerol / agua por disminución de temperatura de 290 a 12 $^{\circ}\text{K}$ (16.8 a $-261.1^{\circ}\text{C}$ ), las cuales son indicadas [162]. ....	85
Figura 2. 21 En situaciones de hipoxia, anoxia, isquemia, se ve un incremento en la fluorescencia del $\text{NADH}$ , comparados con estados de Normoxia [156]. .....	86
Figura 2. 22 Configuración de la instrumentación de un fotómetro para la medida de fluorescencia, modificado de [113]. .....	88
Figura 2. 23 Diagrama básico de un medidor de fluorescencia con fuente de luz láser, modificado de [113]. .....	90
Figura 2. 24 Filtro pasa banda solo deja pasar el infrarrojo entre 950 a 1000 nm [171]. .....	91
Figura 2. 25 Monocromador Czerny- Turner: Dispositivo óptico que permite, seleccionar y transmitir una estrecha banda de longitudes de onda a partir de una fuente emisora, modificado de [113]. .....	92
Figura 2. 26 El CCD es un chip de silicio sensible a la luz, eléctricamente dividido pixeles independientes; convirtiendo luz (fotones) en un arreglo de cargas electrónicas [172]. .....	93
Figura 2. 27 Diferentes tamaños y formas de celda pudiendo ser de vidrio, plástico o cuarzo [176]. .....	94
Figura 2. 28 Fibra Multimodo y Monomodo [177]. .....	95
Figura 3. 1 A) Absorción; B) Emisión; C) Emisión del estado excitado estimulado. ....	99
Figura 3. 2 Sistema resonador básico para la generación de luz láser [188] . .....	100
Figura 3. 3 Diferencia entre a) emisión Incoherente (emisión espontanea) y b) coherente (emisión estimulada) [186]. .....	101
Figura 3. 4 Resonador óptico [186]. .....	102
Figura 3. 5 La Coherencia del láser [189]. .....	104
Figura 3. 6 Los parámetros de calibración de cualquier movimiento ondulatorio comunes a la emisión o producción de cualquier fenómeno ondulatorio electromagnético son: Amplitud, Periodo, Frecuencia y Longitud de onda [190]. .....	106
Figura 3. 7 Parámetros del láser pulsado .....	108
Figura 3. 8 Microfotografía electrónica de hepatocito de rata estimulado con dosis de láser infrarrojo correspondiente a $8 \text{ J/cm}^2$ , $8500 \times$ [195]. .....	112
Figura 3. 9 Microfotografía electrónica de hepatocito de rata estimulado con dosis de laser infrarrojo correspondiente a $16 \text{ J/cm}^2$ , $8500 \times$ [195]. .....	112
Figura 3. 10 Coeficientes de absorción de componentes típicos absorbentes de luz, en el tejido del melanoma. [217] .....	122
Figura 3. 11 ventana óptica del tejido donde la penetración eficaz de la luz roja e infrarroja 600 a 1000 nm en el tejido se maximiza ya que la absorción por la melanina, agua y oxihemoglobina es muy pobre, modificada de [149] . .....	123



Figura 3. 12 Cuando una luz láser choca contra la piel hay cuatro posibles interacciones, reflejadas en este diagrama modificada de [149].	124
Figura 3. 13 Mecanismos celulares por la aplicación de radiación roja e infrarroja emitida por los equipos de TLBI [2].	125
Figura 3. 14 Espectros de absorción del citocromo oxidasa en diferentes soluciones para su purificación, la línea punteada representa Cox en disolución, la figura en el tiempo representa que diferentes concentraciones de Cox fueron añadida.	127
Figura 4. 1 Algunos tubos necesarios para centrifugación.	135
Figura 4. 2 (A) Proceso de extracción de sangre en ratas de la cepa Wistar, 4.2 (B) Capa de células mononucleares	137
Figura 4. 3 Células en solución Fosfato 5 $\mu$ M, contenidas en cubeta de cuarzo 3 ml, mientras se radian con láser Nd-Yag.	138
Figura 4. 4 Estructura química y numeración esquemática de la Cumarina, a) Molécula de la cumarina padre, b) Molécula de la cumarina 460 C1.	139
Figura 4. 5 Láser Nd-YAG (Estructura interna).	144
Figura 4. 6 Modo de emisión pulsada del láser Nd-YAG.	145
Figura 4. 7 Láser terapéutico infrarrojo 790 nm	146
Figura 4. 8 Modo continuo de aplicación del láser durante 40 minutos del tratamiento	146
Figura 4. 9 Amplificación de fluorescencia mediante un arreglo focal cercano al 2F	147
Figura 4. 10 tubo de lente apilable para obtener un arreglo 2F	147
Figura 4. 11 espectrómetro AvaSpec-2048-USB2-UA-50.	148
Figura 4. 12 Arreglo experimental a bloques para obtener fluorescencia de la molécula NADH intracelular, las flechas indican el camino del haz láser, en morado 355 nm longitud de onda necesaria para provocar fluorescencia en la molécula NADH, en azul turquesa 350-600 nm longitud donde se encuentra el espectro del NADH, en rojo láser a 790 nm longitud de onda para estimular el metabolismo celular.	149
Figura 4. 13 Fluorescencia de color azul del NADH de CMNSPR	150
Figura 4. 14 Representación en el tiempo de la exposición de la muestra a la luz UV continua e infrarroja continua con y sin aplicación de radiación IR.	151
Figura 4. 15 Representación en el tiempo de la exposición de la muestra a la luz UV pulsada, con y sin radiación infrarroja continua.	152
Figura 4. 16 Arreglo para la obtención del espectro de la luz emitida por una lámpara incandescente.	158
Figura 4. 17 Efecto Peltier: Diferencia de temperatura creado por la aplicación de un voltaje (V) entre 2 electrodos conectados a material semiconductor tipo (n-p).	160
Figura 4. 18 Diagrama a bloques y elementos necesarios para la caracterización del peltier.	161
Figura 4. 19 Circuito en configuración ultra rápida para captación de luz S1721 Hamamatsu especificaciones de fotodiodos	161
Figura 4. 20 Arreglo experimental para analizar la estabilidad del láser	163
Figura 4. 21 Interfase del programa para ver IF con un fotodiodo y tarjeta A/D	163



Figura 5. 1 Espectro de emisión continuo, generado por la luz de una lámpara incandescente. ....165

Figura 5. 2 Espectros de fluorescencia a un espectro por segundo, NADH en CMNSPR, solución fosfato 5µM, 40 minutos, 2 casos: uno para cada condición, con y sin aplicación de aplicación de radiación láser IR, modo de fluorescencia continua (2400 espectros para cada condición). .....167

Figura 5. 3 Espectros de fluorescencia promedio de NADH en CMNSPR solución fosfato 5µM, 2 casos: uno para cada condición, con y sin TLBI, 40 minutos, modo de fluorescencia continua. ....168

Figura 5. 4 Espectros promedio de fluorescencia de NADH en CMNSPR, solución fosfato 5µM, con y sin aplicación de radiación láser IR, 10 muestras 5 para cada condición , 30 minutos, modo de fluorescencia continua. ....169

Figura 5. 5 Espectros promedio de la fluorescencia de β-NADH en solución (5 µM), modo de fluorescencia continua, con y sin aplicación de radiación láser IR (derecha e izquierda respectivamente). ....170

Figura 5. 6 Espectros promedio, normalizados de NADH de CMNSPR 5µM, 10 muestras con y sin aplicación de radiación láser IR, 30 minutos, 5 casos para cada condición, modo fluorescencia intermitente. ....171

Figura 5. 7 IF de β-NADH en el tiempo, Solución 5 µM en solución Buffer Trizma y SEM, de la empresa Sigma-Aldrich, sin aplicación de radiación láser IR.....172

Figura 5. 8 IF de β-NADH en el tiempo, Solución 5 µM en solución Buffer Trizma y SEM, de la empresa Sigma-Aldrich, con aplicación de radiación láser IR. ....173

Figura 5. 9 Ajuste logaritmico de la IF en el tiempo de solución β-NADH 5 µM , con y sin aplicación de radiación láser IR (1 caso para cada condición), modo de obtención fluorescencia continua, 460 nm. ....174

Figura 5. 10 Curvas de IF vs tiempo de NADH (5 µM) de CMNSPR, con y sin aplicación de radiación láser IR (1 caso para cada condición), modo de fluorescencia continua, 440 nm, 460 nm y 470 nm. ....175

Figura 5. 11 Curvas de IF promedio de NADH en el tiempo, para 10 diferentes casos de CMNSPR 5µM en solución fosfato, con y sin aplicación de radiación láser IR (5 casos para cada condición), 440 nm.....176

Figura 5. 12 Curvas de IF promedio de NADH en el tiempo, para 10diferentes casos de CMNSPR en solución fosfato 5µM, 5 casos para cada condición, 460 nm. ....177

Figura 5. 13 Curvas de las medias y desviación estándar de la IF de NADH en CMNSPR, solución fosfato 5µM, con y sin aplicación de radiación láser IR, 440 nm, MFC. ....179

Figura 5. 14 Curvas de IF promedio de NADH en CMNSPR, solución fosfato 5µM, con y sin aplicación de aplicación de radiación láser IR, 460 nm, MFC.....180

Figura 5. 15 Curvas de IF promedio de NADH en CMNSPR, solución fosfato 5µM, con y sin aplicación de aplicación de radiación láser IR, 440 nm, MFI. ....181

Figura 5. 16 Curvas de IF a 460 nm, promedio de NADH en CMNSPR, solución fosfato 5µM, con y sin aplicación de radiación láser IR, MFI. ....182

Figura 5. 17 Comparativa de las medias de IF a 440 y 460 nm de NADH en CMNSPR, 5 µM, MFC, con y sin aplicación de radiación láser IR, 10 casos: 5 para cada condición. ....183



Figura 5. 18 Comparativa de las medias de la IF de NADH en CMNSPR, 5  $\mu$ M, modo de fluorescencia intermitente, con y sin radiación láser IR, 10 casos: 5 para cada condición, 440 y 460 nm. ....184

Figura 5. 19 Comparativa de las medias de IF en 2 casos: modo de fluorescencia continua e intermitente de la IF de NADH en CMNSPR, en modo de fluorescencia continua (10 casos) e intermitente (10 casos), con y sin radiación láser IR (5 casos para cada condición), 440 y 460 nm. ....185

Figura 5. 20 Comparación de las variaciones estadísticas en porcentaje (calculadas mediante la desviación estándar) de la IF, en 2 casos: MFC y MFI, normalizadas. ....185

Figura 5. 21 Comparativa de las variaciones en porcentaje calculadas por la desviación estándar, de la IF de NADH en CMNSPR, , en MFC (10 casos) y MFI (10 casos), con y sin aplicación de radiación láser IR (5 casos para cada condición), 440 y 460 nm. ....187

Figura 5. 22 Caracterización de temperatura por aplicación de temperatura en peltier. ....188

Figura 5. 23 Decaimiento de la IF por calentamiento de la muestra Cumarina 460, 50  $\mu$ M. ....189

Figura 5. 24 Decaimiento de la IF por calentamiento de la muestra Cumarina 460, 50  $\mu$ M. ....189

Figura 5. 25 Decaimiento de la IF por calentamiento de la muestra NADH en CMNSPR, solución fosfato 5  $\mu$ M. ....190

Figura 5. 26 Cumarina 460 50  $\mu$ M, con aplicación de radiación láser IR, un espectro por minuto. ....191

Figura 5. 27 Variaciones que pudiesen presentarse en el láser Nd-Yag, 1 hora, medida por la fluorescencia de Cumarina 460  $\mu$ M. ....191

Figura 5. 28 Estabilidad en láser Nd-Yag, 40 minutos, medida por la fluorescencia de Cumarina 460  $\mu$ M. ....192

Figura 6. 1 Relación de la donación de electrones del NADH a la cadena de transporte de electrones y a la formación acelerada de ERO por la exposición a UV; modificada de [99]. ....199

Figura 6. 2 Incremento de óxido nítrico e inhibición de la cadena respiratoria por alta concentración. ....201

Figura 6. 3 La absorción de dos fotones puede excitar un electrón desde el estado fundamental a un estado excitado. ....203

Figura 6. 4 Excitación electrónica de dos fotones en un sistema fluorescente. (a) Diagrama de energía para excitaciones electrónicas de uno (azul= UV) y dos fotones (rojo=IR) [262]. ....204

Figura 6. 5 Emisión de fluorescencia y procesos de relajación no radiativos por la excitación de 2 fotones UV (1) e IR (2). ....205

Figura 6. 6 NAD(P)H en cardio miocitos aislados imagen con luz de excitación (IR) 750 nm, detección de imagen A (410-490 nm), imagen B (510-650 nm) [265]. ....205



## Índice de tablas

Tabla 3. 1 Longitud de onda del espectro visible [191]. .....	106
Tabla 3. 2 Áreas nucleares y nucleolares correspondientes a hepatocitos de rata tanto normales como estimuladas con dosis crecientes de láser infrarrojo [195]. .....	111
Tabla 4. 1 Dosis de exposición a diferentes tiempos Laser Nd- Yag 355 nm, modo de Fluorescencia continuo e intermitente .....	152
Tabla 4. 2 Dosis de exposición a diferentes tiempos Laser terapéutico, continuo infrarrojo .....	153
Tabla 4. 3 Tabla de correspondencia al pico máximo en IF cercana a la longitud de onda deseada (440, 460, 470 nm). .....	156
Tabla 5. 1 Ajuste logarítmico de las curvas de IF promedio de NADH, 10 casos, con y sin aplicación de radiación láser IR, 5 para cada condición. ....	178
Tabla 5. 2 Prueba T para comparación de 2 muestras iguales, suponiendo varianzas desiguales, de IF en CMNSPR, con y sin aplicación de radiación láser IR, MFC. ....	187
Tabla 5. 3 Prueba T para comparación de 2 muestras iguales, suponiendo varianzas desiguales de IF en CMNSPR, con y sin aplicación de radiación láser IR, MFI. ....	188
Tabla 5. 4 Resumen de diferencia entre MFC y MFI de NADH en CMNSPR. ....	192
Tabla 5. 5 Resumen de diferencia entre MFC y MFI de sln. $\beta$ -NADH. ....	193



## Resumen

A la terapia láser se le atribuyen muchas bondades en el área médica por los efectos producidos en diversos padecimientos. Dichos efectos pueden ser anti inflamatorios, anti edematosos y muchas veces ayudan a la reparación de tejido provocadas por enfermedades, heridas y traumatismos. Estos efectos se han explicado de manera poco clara, algunos autores mencionan que estos efectos pueden ser de tipo placebo, otros mencionan que son de tipo térmico, a nivel celular se han explicado por: 1) Aumentar la síntesis de Trifosfato de Adenosina (ATP), 2) Estimular la síntesis de ADN y proteínas, 3) Estimular la actividad enzimática, 4) Generar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Estos mecanismos tienen un requerimiento metabólico energético en forma de ATP y para su síntesis en la llamada fosforilación oxidativa se requiere de la molécula Nicotinamida Adenina Dinucleótido ( $\text{NAD}^+$ ) la cual es portadora de electrones de alta energía a la cadena respiratoria mitocondrial. El  $\text{NAD}^+$  en su forma reducida NADH es una molécula que puede ser analizada mediante técnicas de fluorescencia presentando absorción en 355nm y emisión máxima en 460nm. Mediante técnicas de inducción de fluorescencia sobre la molécula NADH en Células Mono Nucleares de Sangre Periférica de Ratas (CMNSPR) se da seguimiento al metabolismo energético celular, pretendiendo dar explicación a los mecanismos moleculares y celulares por los que la radiación láser IR de 790 nm a 90 mW, trabaja.





# Introducción

El desarrollo de la tecnología láser a mediados de los años 60's, permitió su uso en áreas médicas como una alternativa terapéutica. Los láseres utilizados para este fin manejan longitudes de onda que van de los 600 a los 1000 nm en bajas potencias generalmente menores a 100 mW. Su aplicación consiste en la interacción de la energía electromagnética roja e infrarroja con células y tejido biológico dañado vivo. Entre otros nombres esta interacción es conocida como Terapia Láser de Baja Intensidad (TLBI) y actualmente es usada en un sin fin de padecimientos, [1] en donde, sustancias como la melanina, lípidos, agua y sangre presentan poca absorción, garantizando la penetración de esta energía a las células de los tejidos afectados. La TLBI requiere de una selección adecuada de parámetros, los cuales tienen como finalidad, provocar un efecto curativo o paliativo, mediante la interacción de la energía electromagnética con algún componente biológico, cuya unidad fundamental es la célula. En la actualidad son numerosos los estudios científicos que han respaldado las bondades de TLBI en diversos padecimientos que requieran acelerar procesos de tipo: 1) Anti-inflamatorio, 2) Anti-edematoso, 3) De regeneración de tejidos 4) De analgesia, entre muchos otros. [1] [2] [3] En México, la adquisición de un producto extranjero por parte de una institución gubernamental de salud, requiere el cumplimiento de normas de la FDA (La Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos). Esto dado que un método no aprobado por la FDA es sinónimo de carecer de una base científica. Muchos fabricantes de equipos de TLBI anuncian las bondades de TLBI como "cura milagrosa" para un sin fin de enfermedades, muchas veces sin ninguna base científica, por lo que la incorporación de la TLBI, en los tratamientos médicos en diversas especialidades aun genera controversia. Ante esto la FDA ha tenido hasta ahora una política muy estricta con los equipos de terapia con láser, permitiendo desde 1999 hasta el año 2007, el uso de estos equipos específicamente para [2]: 1) El uso en el tratamiento de alivio al dolor del síndrome del túnel carpiano, 2) El uso de "uso coadyuvante en el alivio temporal de cuello y hombro dolor crónico leve de origen musculoesquelético". 3) El uso en tratamiento de calvicie en hombres y mujeres. Se piensa, en el peor de los casos, que los efectos producidos por la TLBI son de tipo placebo [4] [5] [6] [7], aunque tampoco se descarta un efecto térmico [8] [9] [10] [11], lo cual explicaría muchas de sus bondades curativas o paliativas equiparables a termoterapias [12], no justificando el costo de la tecnología láser. Controversial aún resulta la respuesta bifásica a la dosis de aplicación de TLBI, donde niveles bajos de luz tienen un efecto mucho mejor que niveles altos, repercutiendo de manera positiva o negativa en diversos padecimientos, no quedando claro los mecanismos bioquímicos subyacentes, los cuales siguen siendo poco conocidos, por lo que su uso es en gran medida empírico, un gran número de parámetros tales como la longitud de onda, densidad de potencia, estructura del pulso (continua o pulsada), y la frecuencia de la luz aplicada deben ser elegidos para cada tratamiento. Una elección inadecuada de parámetros puede resultar en una reducción de la eficacia del tratamiento, o incluso un resultado terapéutico negativo [2] [1]. La diversidad de parámetros láser así como la gran variedad de protocolos y metodologías usadas, hacen



que muchos trabajos científicos no se consideren fiables o sean imposibles de comparar. La explotación comercial de equipos de TLBI contribuye a desacreditar aún más el uso de esta terapia [13] [14]. Mientras que se ha demostrado que la irradiación con láser IR (600 a 1000 nm), de baja potencia (menor a 100 mW) rango en el que trabajan la mayoría de los láser terapéuticos, no daña ni afecta a la estructura mitocondrial, si se piensa que influye en la actividad de algunas reacciones mitocondriales in vitro, produciendo cambios de conformación de proteínas, generando un mayor potencial electroquímico mitocondrial, e incrementando la síntesis de Adenosina Trifosfato (del inglés adenosine triphosphate, ATP), por la estimulación de algunos componentes en la cadena respiratoria [15] [16] [17] [18] [19]. En resumen, a nivel celular los efectos de la TLBI se han explicado por: 1) Acelerar el metabolismo, 2) Incrementar la síntesis de ATP “molécula utilizada en los organismos vivos para proporcionar energía a las reacciones químicas”, 3) Estimular la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN), 4) Acelerar la formación de proteínas, 5) acelerar la actividad enzimática, 6) Proponer al Citocromo C oxidasa o complejo IV (COX) de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria como el principal cromóforo (molécula capaz de absorber luz). [20] [21] [22]

¿Será que los efectos de la terapia laser pudieran ser explicados por un efecto térmico o un efecto placebo, más que por una fotoestimulación molecular?

Utilizando un proceso común en las células de los seres vivos llamado metabolismo celular, en donde miles de reacciones químicas generan y gastan moléculas de ATP como principal fuente de energía y el cual se reporta para verse incrementado por la aplicación de radiación láser R e IR. Se presenta el siguiente trabajo. El cual tiene a bien, evaluar el efecto metabólico celular producido por un láser terapéutico de longitud de onda 790 nm, continuo, con potencia de 90 mW, ocupado en áreas médicas como rehabilitación y fisioterapia, en Células Mononucleares de Sangre Periférica de Rata (CMNSPR). La evaluación se realiza utilizando técnicas de fluorescencia inducida con láser emitiendo en el Ultra Violeta (LUV, 355 nm), sobre la molécula intracelular Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina, en su forma reducida (NADH). La molécula NADH tiene una alta repercusión en el metabolismo celular ya que es necesaria para la formación de moléculas de ATP. Incrementos o decrementos de esta molécula ATP se verán reflejados proporcionalmente en la molécula NADH, en condiciones no patológicas. La fluorescencia del NADH en CMNSPR, permitió ver diferencias en la Intensidad de Fluorescencia (IF) detectadas en células tratadas con radiación IR comparadas con las no tratadas con IR. Estas diferencias podrían ayudar a confirmar lo que se dice en la literatura donde los efectos producidos en el organismo por la aplicación de TLBI se relaciona principalmente con procesos fuertemente ligados como, la generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) y Nitrógeno (ERN), así como el proceso de inflamación [1] [2]. Aunque la luz ultravioleta esta reportada para generar especies reactivas de oxígeno esta se manejo en bajas dosis, aun así pensando que si hubiese toxicidad celular por la exposición a LUV esta



sería menor o diferente que la suma de las 2 radiaciones LUV e IR, lo cual se vería reflejado en el metabolismo celular [23] [24] [25] [26] [27].

## Descripción del trabajo

Este trabajo interrelaciona una serie de conocimientos, principalmente: Fisiológicos, Bioquímicos y Físicos, por lo que se ha dividido en 6 capítulos.

- Capítulo 1: Se explicaran diversos procesos fisiológicos a nivel celular relacionados a la respuesta de las células a la radiación láser emitida por los equipos de TLBI y a la exposición de LUV. Estos procesos involucran: El metabolismo, el proceso inflamatorio, la producción de radicales libres: Producción de especies reactivas de Oxígeno (ERO) y Nitrógeno (ERN), así como la inter-relación de la molécula NADH y NADPH con diversos procesos como se menciona a continuación:
  - Formación de moléculas ATP.
  - Fagocitosis
  - Migración celular
  - Adhesión celular
  - Transcripción genética
  - Apoptosis
  - Necrosis
  - Envejecimiento
  - Respuesta celular inflamatoria
- Capítulo 2: Se dedicara a la fluorescencia molecular, principalmente la fluorescencia de la molécula NADH ya que es la herramienta de medición utilizada en este trabajo, indicando que es, como se produce, que factores la afectan.
- Capítulo 3: Tratará de la terapia láser de baja intensidad, su aplicación en diversas áreas médicas, la implicación con el metabolismo celular y los procesos por los que se explican sus efectos a nivel celular, entre ellos la acelerada generación de radicales libres, lo cual explicaría muchas de las bondades de esta terapia.
- Capítulo 4: Describe la metodología empleada en:



- El arreglo experimental armado para la obtención de espectros de fluorescencia.
  - El método para la obtención de las muestras (leucocitos).
  - Los métodos continuo y pulsado para la obtención de fluorescencia
  - Métodos para evaluar los efectos térmicos en los espectros de fluorescencia
  - Método para evaluar la estabilidad del láser Nd-Yag
- Capítulo 5: Se presentan los resultados experimentales obtenidos.
  - Capítulo 6: Discusión de los resultados, tratando de dar una respuesta a las diferencias encontradas en la IF analizada de diversas formas, por la aplicación y no aplicación de radiación IR sobre CMNSPR, Cumarina y solución  $\beta$ -NADH, así como una evaluación de los efectos térmicos encontrados en la IF.
  - Capítulo 7: Se presentan las conclusiones y futuras perspectivas del trabajo



## Hipótesis

Es posible que la terapia láser de baja intensidad este sobrevalorada, dado que el aumento en el metabolismo energético celular provocado por la radiación IR con Láser de baja potencia, se deba simplemente a un incremento de temperatura y no a un efecto fotoquímico específico sobre la enzima Citocromo C (COX) como se ha propuesto en la literatura [8] [9] [10] [11] [28].

## Justificación

En la actualidad y por más de 50 años el uso de la terapia laser de baja intensidad en diversas patologías sigue siendo un tema controversial de investigación, los resultados de estas investigaciones arrojan tanto resultados positivos como negativos para un mismo padecimiento, la mayoría de ellos de tipo doble ciego, son basados en la experiencia clínica [29] [30] [31]. Pocos son los artículos que tratan de entender los mecanismos de esta terapia a nivel molecular intracelular. Uno de los mecanismos que más se destaca en la literatura especializada es el incremento en la síntesis de ATP por estimulación enzimática selectiva en la cadena respiratoria [32] [33] [34], sin embargo, existe la posibilidad de que el incremento de la síntesis de ATP sea debido a un incremento de temperatura en la zona irradiada [8] [9] [10] [11] [28], y no a una inducción molecular específica en la cadena de transporte de electrones. Este dato es importante ya que el incremento de temperatura local podría explicar la estimulación enzimática observada en diferentes vías metabólicas. Una forma de evaluar la síntesis de ATP por estimulación con un láser terapéutico es midiendo la fluorescencia de la molécula NADH cuyas funciones atribuibles en el organismo son ser el sustrato (combustible) para la producción de energía, un papel muy importante en la regeneración celular, la reparación del ADN, y la potenciación del sistema inmune [35]. Los mecanismos bioquímicos que subyacen a los efectos positivos son incompletos y poco entendidos. Este trabajo pretende estudiar los mecanismos moleculares y celulares por los que la radiación láser IR de 790nm ejerce su efecto terapeutico, proporcionando resultados que expliquen los procesos metabólicos intracelulares en donde intervienen las reacciones redox catalizadas por oxidoreductasas vitales en el metabolismo, en una esfera particularmente importante que es la producción de energía.



# Objetivos

## Objetivo general

Mediante técnicas de inducción de fluorescencia láser en la molécula intracelular NADH, evaluar los efectos metabólicos producidos por un láser terapéutico con emisión de radiación continua 790 nm, 90 mW, en células mono nucleares de sangre periférica de rata (CMNSPR), verificando que estos efectos no sean de tipo térmico.

## Objetivos específicos

- 1) Diseñar mediante los recursos tecnológicos existentes en el laboratorio de Óptica Cuántica, del departamento de Física, Laboratorio de Biofísica del departamento de Ingeniería Eléctrica, de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa (UAMI) un sistema de detección y registro continuo de fluorescencia inducida por láser para la molécula NADH en concentraciones similares a las reportadas dentro de una célula 5 y 50  $\mu\text{M}$  [36].
- 2) Diseñar mediante técnicas de inducción de fluorescencia láser, un método de análisis de registros para la evaluación de los efectos metabólicos celulares de la radiación láser IR continua 790 nm, 90 mW, en CMNSPR.
- 3) Mediante técnicas de inducción de fluorescencia, verificar que algún efecto en el metabolismo energético sea generado por la aplicación de emisión IR continua 790 nm, 90 mW (TLBI), en células mono nucleares de sangre periférica de rata.

Por comparación de la fluorescencia inducida en soluciones de referencia:

- a) Solución de Cumarina 460, 5 y 50  $\mu\text{M}$  con y sin TLBI
- b) Solución de  $\beta$ -NADH, 5  $\mu\text{M}$  con y sin TLBI
- c) Solución de NADH en CMNSPR, 5  $\mu\text{M}$  sin TLBI



- 4) Descartar efectos térmicos en el metabolismo energético celular producidos por el láser terapéutico de baja intensidad con emisión de radiación continua 790 nm, 90 mW (TLBI), en células mononucleares de sangre periférica de rata.

Por comparación de la fluorescencia inducida en soluciones de referencia

- a) Solución de Cumarina 460, 5 y 50  $\mu\text{M}$  con y sin aplicación de temperatura
- b) Solución de  $\beta\text{-NADH}$ , 5  $\mu\text{M}$  con y sin aplicación de temperatura
- c) Solución de NADH en CMNSPR, 5  $\mu\text{M}$  con y sin aplicación de temperatura



# Capítulo 1

## Fisiología

### 1.1 La célula

La célula es el nivel de organización más pequeño que tiene la capacidad de auto perpetuarse y es la responsable de dar características a los seres vivos. En ella tienen lugar todas las reacciones químicas que hacen posible la fabricación de nuevos materiales, necesarios para crecer, reproducirse, repararse, autorregularse y producir la energía necesaria para subsistir. Según la Teoría Celular Moderna formulada, entre otros, por Robert Hooke, Theodor Schwann, Rudolph Virchow, entre otros, es la unidad morfológica, fisiológica y genética de todo ser vivo [37]. Entre las cualidades que caracterizan a las células podemos destacar:

- 1) Alto grado de complejidad química, complejas estructuras químicas formadas por más de mil moléculas diferentes.
- 2) Capacidad para auto replicarse y ensamblarse. Una célula bacteriana puesta en condiciones ideales, es capaz de formar mil millones de células idénticas en 24 horas.
- 3) Capacidad de responder a los cambios de su entorno, adaptándose y regulando los cambios químicos que componen su metabolismo.
- 4) Extraer la energía de su entorno y transformarla en energía útil, lo cual permite a las células construir su propia estructura, realizar trabajo químico, osmótico, mecánico y eléctrico.

Según sus características distinguimos dos tipos de células: procariota y eucariota. La procariota está representada por las bacterias (cocos, bacilos, vibrio, espirilos), las eucariotas las encontramos en estructuras celulares más complejas (animales y plantas). La principal diferencia entre estas dos células es que la eucariota tiene un núcleo celular delimitado por una membrana, llamada membrana nuclear. La procariota carece de núcleo



(Figura 1. 1). Las dos pueden tener pared celular, una pared que aísla toda la célula del exterior [38].

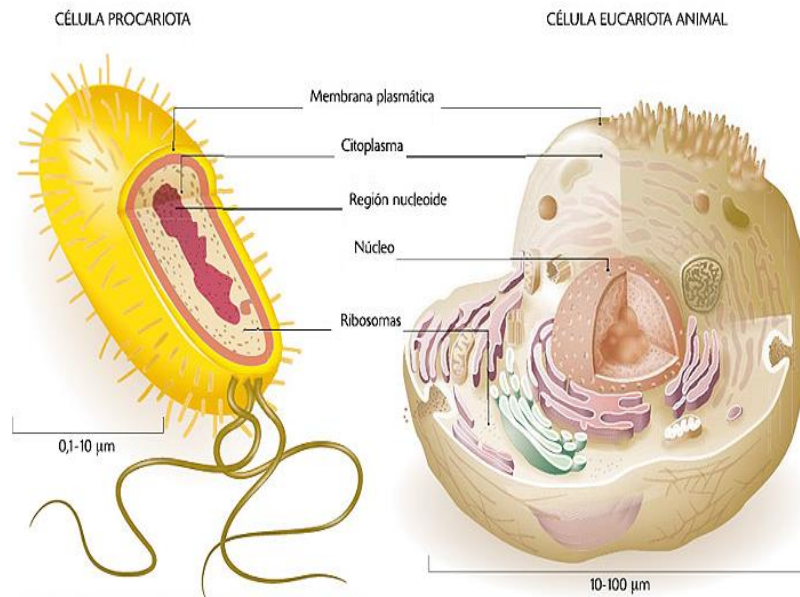


Figura 1. 1 Dos tipos de células: Eucariota y Procariota [38].

Dentro de las células eucariotas hay dos tipos diferentes, las células animales y las vegetales. Tanto la célula vegetal como la animal poseen membrana celular, pero la célula vegetal cuenta, además, con una pared celular de celulosa, que le da rigidez. La célula vegetal contiene cloroplastos: Organos capaces de sintetizar azúcares a partir de dióxido de carbono, agua y luz solar (fotosíntesis) lo cual los hace autótrofos (producen su propio alimento), y la célula animal no los posee, por lo tanto no puede realizar el proceso de fotosíntesis. La célula vegetal tiene una vacuola única llena de líquido, que ocupa casi todo el interior de la célula vegetal, en cambio, la célula animal, tiene varias vacuolas y son más pequeñas. Las células vegetales pueden reproducirse mediante un proceso que da por resultado células iguales a las progenitoras, este tipo de reproducción se llama reproducción asexual. Las células animales pueden realizar un tipo de reproducción llamado reproducción sexual, en el cual, los descendientes presentan características de los progenitores pero no son idénticos a él [37] [39] [40].



## 1.2 Células Mononucleares de sangre periférica (CMNSP)

Los seres superiores defienden constantemente su integridad biológica frente a agresiones, procedentes del exterior así como del propio organismo, de no ser así, morirían como consecuencia de tumores e infecciones de bacterias, virus, hongos, etc. Para que estos fenómenos de defensa se lleven a cabo, los organismos disponen de un conjunto de elementos especiales, conocido como sistema inmune. La capacidad de defensa se adquiere antes de nacer y se madura y consolida en los primeros años de la vida fuera del seno materno. El sistema inmunitario está formado por los glóbulos blancos, células tisulares derivadas de los glóbulos blancos, el timo, los nódulos linfáticos y los vasos linfáticos que protegen el cuerpo de patógenos como bacterias, virus, parásitos y hongos. Proporcionando un mecanismo para que el cuerpo [39] [40]:

- 1) Diferencie sus propias células de las células y sustancias extrañas
- 2) Destruya al invasor por fagocitosis o mediante la producción de linfocitos sensibilizados o proteínas especializadas (p. ej; anticuerpos) que destruyen o neutralizan al invasor

Una Célula Mononuclear de Sangre Periférica (CMNSP) es una célula sanguínea caracterizada por poseer un único núcleo redondo (**Figura 1. 2**), como los linfocitos o los monocitos [41]. Estas células sanguíneas son un componente crítico en el sistema inmune, concretamente para combatir las infecciones. Las CMNSP están compuestas por los siguientes tipos celulares: Monocitos, Linfocitos T y Linfocitos B (**Figura 1. 3**). Los monocitos se transforman en macrófagos para realizar la fagocitosis de agentes invasores, forman parte del sistema inmune inespecífico, el cual es la primera barrera defensiva del organismo y no requiere sensibilización previa. Este tipo de respuesta es mediada por células con capacidad fagocítica. Los linfocitos T y B forman el sistema inmune específico dando respuestas ante un estímulo antigénico (creando sustancias que pueden causar una respuesta inmunitaria). La respuesta específica o adquirida se desarrolla solo frente a la sustancia que indujo su iniciación participando prioritariamente anticuerpos y linfocinas liberados por los mismos linfocitos. Todas las sustancias que se comportan como extrañas a un organismo frente a las cuales éste desarrolla una respuesta inmune específica dada por un anticuerpo, se conoce como antígeno [39] [40]. Los linfocitos T son producidos y modificados en el timo, coordinan la respuesta inmune incluida la respuesta de anticuerpos dependientes de las células B que tienen su origen en el hígado, bazo y médula ósea. Los linfocitos B y T se diferencian en el tipo de receptores que poseen, en el caso de los

Linfocitos B estos presentan 2 sitios de unión con el antígeno, y solo reconocen antígenos intactos, se llaman anticuerpos. Los linfocitos T presentan un solo punto de unión y reconocen trozos de antígenos. Son llamados complejo CD3 Figura (**Figura 1. 4**).

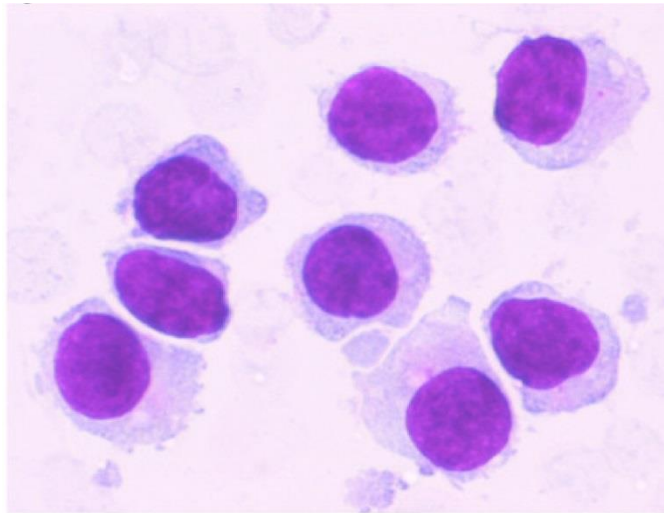


Figura 1. 2 Las células mononucleares son fáciles de obtener y purificar, lo cual las hace ideales para estudios de espectroscopia láser [42] [43].

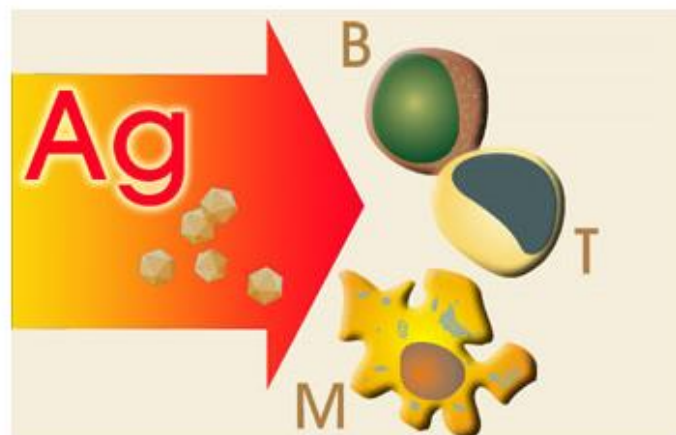


Figura 1. 3 La inmunidad adquirida se induce como respuesta a un antígeno (Ag) específico, tras la colaboración de células fagocíticas (M), linfocitos (T) y (B) [44].

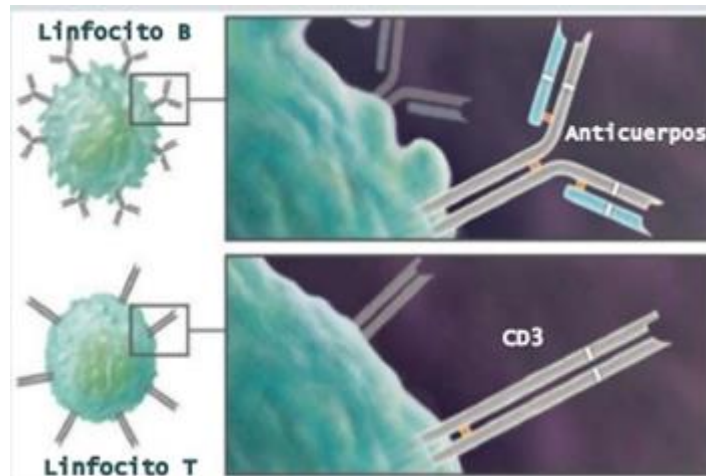


Figura 1. 4 Receptores de los linfocitos T y B

## 1.3 El metabolismo celular

### 1.3.1 Metabolismo

La nutrición de las células supone una serie de complejos procesos químicos catalizados por enzimas que tienen como finalidad la obtención de materiales y/o energía. Este conjunto de procesos recibe el nombre de metabolismo.

### 1.3.2 Anabolismo y catabolismo

El metabolismo va a poder descomponerse en dos series de reacciones:

1. Anabolismo. Son aquellos procesos químicos que se producen en la célula y que tienen como finalidad la obtención de sustancias orgánicas complejas a partir de sustancias más simples con un consumo energía. Son anabólicos, por ejemplo, la síntesis de proteínas o la replicación del ADN.



2. Catabolismo. En estos procesos las moléculas complejas son degradadas formándose moléculas más simples. Se trata de procesos destructivos generadores de energía; como por ejemplo: la glucólisis. [45]

### 1.3.3 Mitocondrias

Las mitocondrias juegan un papel importante en la generación de energía y el metabolismo celular. La investigación actual sobre el mecanismo celular de los efectos de la radiación láser IR implica inevitablemente mitocondrias. Las mitocondrias son orgánulos sub celulares, de forma, longitud y número variable en función del tipo y estado metabólico celular, están presentes en todas las células eucariotas con algunas excepciones, como los eritrocitos maduros y algunos protozoos [46]. Las dimensiones de las mitocondrias de una célula eucariota típica son del tamaño aproximado de una bacteria (0.5 x 1.0  $\mu\text{m}$ ), y hay aproximadamente 2,000 por célula. En ellas se produce la oxidación de los nutrientes para la obtención del 90% de la energía metabólica en forma de ATP, por lo que a menudo se las conoce como “la planta energética celular” [47]. En la matriz mitocondrial se localizan moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN), llamado ADN mitocondrial, las proteínas necesarias para su replicación y transcripción, los ribosomas encargados de la traducción de las proteínas codificadas en el genoma, proteínas que son indispensables para la formación de los complejos que forman la cadena de transporte electrónico mitocondrial, así como el resto de proteínas implicadas en los procesos metabólicos que tienen lugar en el interior de la mitocondria. Los procesos metabólicos que destacan son: el ciclo de Krebs, la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, el ciclo de la urea, la síntesis de los centros sulfo-ferricos (hemoglobina, citocromos, etc...), síntesis de esteroides y la síntesis de pirimidinas [48].

### 1.3.4 Mitocondrias generadoras de energía.

Las mitocondrias son orgánulos bien diferenciadas con dos membranas y se encuentran en forma de bastón, que van en longitudes de 1 a 10  $\mu\text{m}$ , en la (Figura 1. 5) podemos ver la estructura de la mitocondria en una célula animal [47].

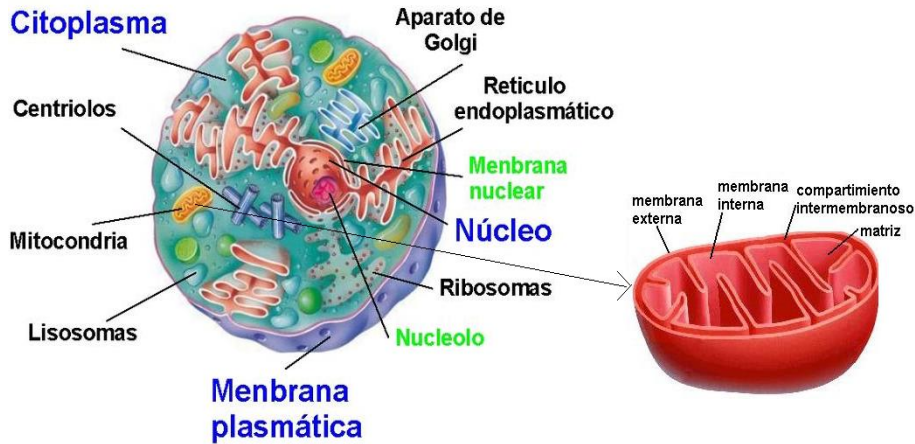


Figura 1. 5 Célula animal y su mitocondria: modificada de [37].

Las mitocondrias se describen a veces como "centrales eléctricas celulares", porque convierten las moléculas de los alimentos en energía. Los alimentos (triglicéridos=grasas, polisacáridos = azúcares, proteínas) para su aprovechamiento primeramente son degradados a moléculas más pequeñas (Ácidos grasos, triglicéridos, ácido pirúvico, aminoácidos), las mitocondrias degradan aún más estas moléculas, usando vías metabólicas (catabolismo), que incluyen a el ciclo de Krebs, la oxidación de ácidos grasos ( $\beta$ -oxidación), y la oxidación de aminoácidos, todo esto con el fin de obtener energía en forma de ATP, a través del proceso llamado fosforilación oxidativa. En la ( **Figura 1. 6** ) se muestran estas rutas metabólicas [49].

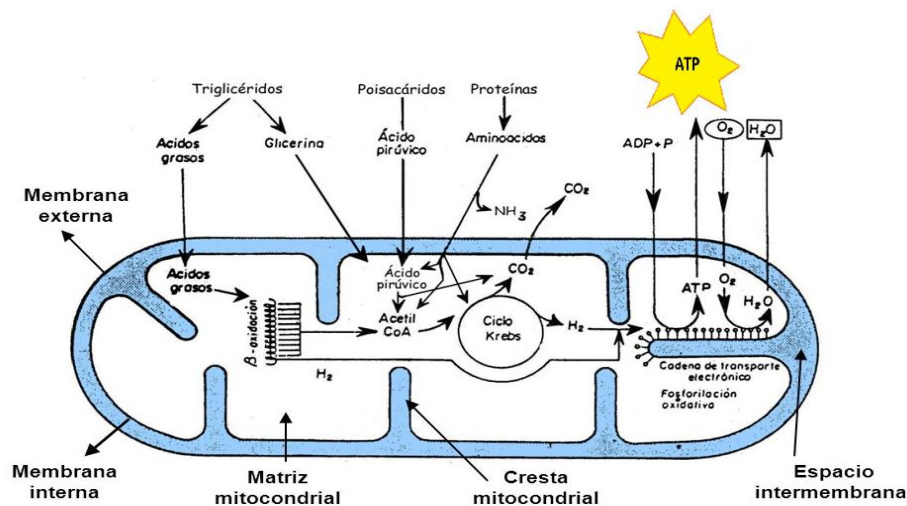


Figura 1. 6 Mitocondria, catabolismo y generación de ATP [50].

La fosforilación oxidativa es un proceso metabólico que utiliza energía liberada por la oxidación de nutrientes para producir ATP. Se le llama así para distinguirla de otras rutas que producen ATP con menor rendimiento, llamadas "a nivel de sustrato". Se calcula que hasta el 90% de la energía celular en forma de ATP es producida de esta manera. La fosforilación oxidativa involucra una serie de metaloproteínas unidas a la membrana interna de las mitocondrias conocidas en conjunto como cadena de transporte de electrones mitocondrial la cual está constituida de cinco complejos de proteínas integrales de membrana [51]:

- 1) NADH deshidrogenasa (Complejo I)
- 2) Succinato deshidrogenasa (complejo II)
- 3) COX reductasa (complejo III)
- 4) Citocromo C oxidasa (COX o complejo IV)
- 5) ATP sintetasa (complejo V)

Además de dos moléculas libremente difusibles, ubiquinona y COX, que traslada electrones de un complejo a otro, provenientes de la oxidación del NADH y FADH (Figura 1. 7).

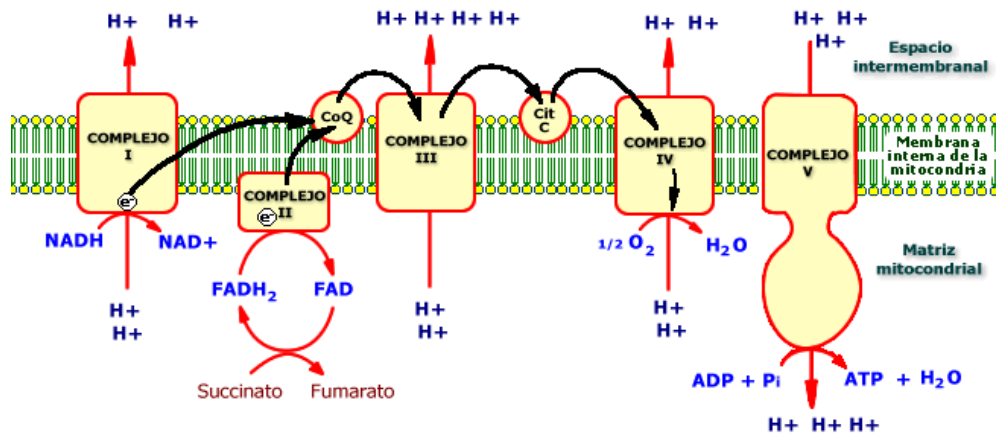


Figura 1. 7 Fosforilación oxidativa formada por 5 complejos [49].

### 1.3.5 Respiración celular y la cadena de transporte de electrones (CTE).

La respiración celular: Es el conjunto de reacciones bioquímicas que ocurre en la mayoría de las células, en estas reacciones determinados compuestos orgánicos son degradados completamente, por oxidación, hasta convertirse en sustancias que proporcionan energía a las células (principalmente en forma de ATP).

Comprende dos fases:

Fase1) Se oxida la glucosa (azúcar), esta fase no depende del oxígeno, por lo que recibe el nombre de respiración anaeróbica, comprende a la glucólisis (vía de degradación de la glucosa, cuya función es la obtención de energía para la célula), se lleva a cabo en el citoplasma de la célula. El oxidante es distinto del oxígeno, es un tipo de metabolismo muy común en muchos microorganismos, especialmente procariontes (**Figura 1. 8**).

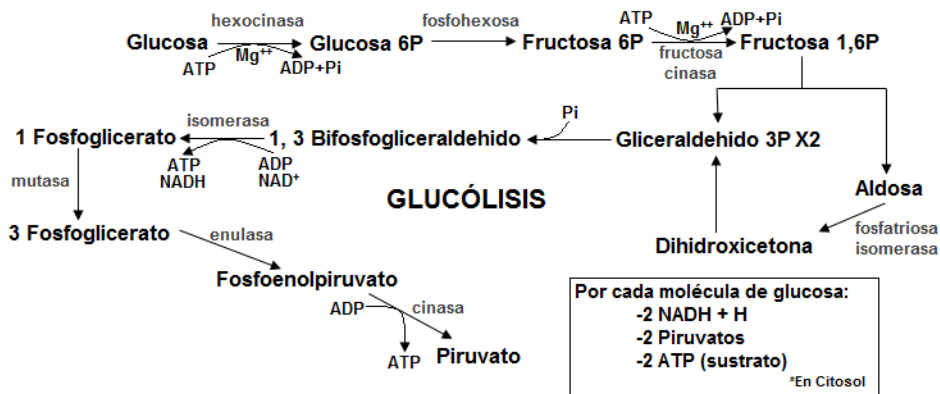


Figura 1. 8 Glucólisis; modificada de [49].

Fase 2) Se realiza con la intervención del oxígeno y recibe el nombre de respiración aeróbica, siendo parte de este proceso el ciclo de Krebs (vía catabólica que realiza la oxidación de glúcidos, ácidos grasos y aminoácidos hasta producir  $CO_2$ , liberando energía en forma utilizable “poder reductor en forma de moléculas de NADH, FADH”), esto se realiza en las mitocondrias.



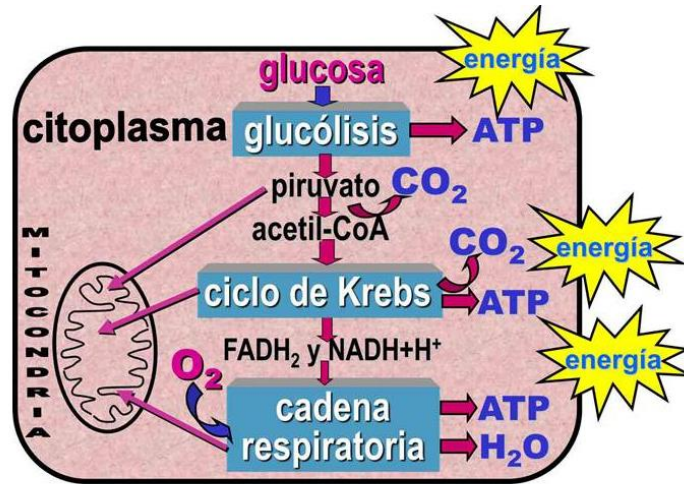


Figura 1. 9 Respiración celular: Oxidación de moléculas orgánicas para la obtención de energía [52].

En el ciclo de Krebs, el ácido pirúvico producto de la glucólisis, se desdobra a dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y agua (H<sub>2</sub>O), durante este proceso se producen 36 moléculas de ATP [25] [49] [53].

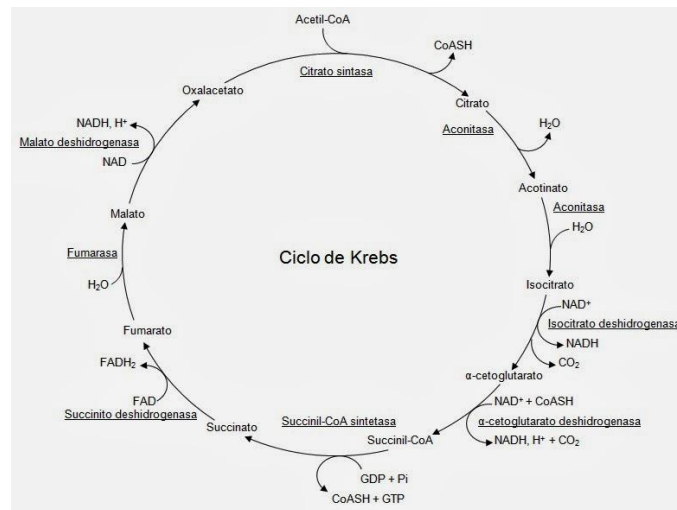


Figura 1. 10 Ciclo de Krebs [54].

Cuando una reacción tiene lugar con liberación de energía libre, se dice que es exergónica y puede transcurrir espontáneamente y se representa con signo negativo. La



cantidad de energía libre que se produce en la oxidación completa de la glucosa hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  (respiración y/o combustión) es de  $-686\text{Kcal}$ . La oxidación completa de glucosa en las células, transcurre en no menos de 20 etapas enzimáticas en las que participan varias rutas metabólicas (glucólisis, ciclo de Krebs y la Cadena de Transporte de Electrones (CTE)), así como varios compartimentos celulares (citoplasma, membranas y matriz mitocondrial). La primera etapa de la oxidación de los alimentos tiene lugar en el citoplasma, donde parte de la energía libre de la glucosa ( $46\text{Kcal}$ ) se conserva en forma de 2 ATP y 2 NADH. En este proceso, la glucosa que tiene todos sus carbonos en un estadio intermedio de oxidación ( $\text{COH-CHOH-CHOH-CHOH-CHOH.CH}_2\text{OH}$ ), se transforma en una secuencia de 10 reacciones catalizadas enzimáticamente que se conoce como glucólisis anaerobia, en dos moléculas de tres átomos de carbono ( $\text{COOH-CO-CH}_3$ ) Piruvato, donde sus carbonos están: dos en estado total de oxidación y el tercero en estado reducido. Esta reorganización interna de los átomos de oxígeno (Oxidoreducción intramolecular) más la rotura del enlace C-C produce una liberación de energía libre de aproximadamente de  $-46\text{Kcal}$ . Si se tiene en cuenta que la síntesis de una molécula de ATP necesita  $+7.3\text{Kcal}$  y se recuperan 2 ATP, se puede fácilmente calcular que el rendimiento es aproximadamente del 31% ( $(14.3/46) \times 100$ ). Si consideramos que el resto de la energía se disipa en forma de calor que sirve para mantener la temperatura corporal, tendríamos un rendimiento por encima del 70%. Estas mismas consideraciones energéticas son válidas para el proceso que tiene lugar en la mitocondria en donde se produce la oxidación completa de la glucosa. El Piruvato formado, que lleva la mayor parte de la energía libre de la glucosa, penetra en la mitocondria por un transportador específico, y se transforma en AcetilCoA. Los electrones del NADH también penetran en la mitocondria por medio de un sistema de lanzaderas, que junto con los producidos en el Ciclo de Krebs, alimentaran a la cadena de transporte de electrones. La oxidación del acetilCoA, proveniente de la oxidación del piruvato generado en la glucólisis, del metabolismo de aminoácidos y de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, en el ciclo de Krebs, genera los equivalentes de reducción NADH y Flavina Adenina Dinucleótido, en su forma reducida (FADH) que son el sustrato de la cadena de transporte de electrones y serán utilizados como donadores de electrones, para la obtención de energía, en el proceso conocido como fosforilación oxidativa, que es muy rentable energéticamente para la célula, ya que la oxidación completa de una molécula de glucosa conlleva la producción de 32-34 moléculas de ATP frente a las 2 moléculas de ATP producidas por la glucólisis anaerobia. Los electrones procedentes del NADH son transportados secuencialmente mediante una serie de reacciones redox a través del complejo I, la ubiquinona, el complejo III, el COX, para llegar finalmente al complejo IV, donde se los cederá al oxígeno molecular generando  $\text{H}_2\text{O}$  [54]. De forma alternativa, los electrones del FADH, producto final de la succinato deshidrogenasa o complejo II, y de otras enzimas como la glicerol-3-P deshidrogenasa, la ETF-ubiquinona oxidoreductasa (primera enzima de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos) o la dihidroorotato deshidrogenasa (enzima implicada en la biosíntesis de pirimidinas), pasan a la ubiquinona y son

canalizados mediante el complejo III, COX y complejo IV para que lleguen hasta la reducción del oxígeno molecular. Acoplado al transporte de electrones, los complejos I, III y IV de la cadena bombean protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, generando un potencial de membrana que es aprovechado por la ATP sintasa o complejo V para impulsar la síntesis de ATP a partir de Adenosina Difosfato (ADP) y fosfato inorgánico, cuando los protones reingresan a la matriz mitocondrial a través del complejo V (**Figura 1. 11**), completándose el proceso de fosforilación oxidativa. El potencial de membrana también es utilizado como fuente de energía para el importe de proteínas y otras moléculas, además de producir calor para mantener la temperatura corporal, en el caso de que los protones reingresen a la matriz mitocondrial a través de las proteínas desacoplantes UCP (Termogénesis). El ATP generado en este proceso, es utilizado en los distintos tejidos para mantener las necesidades energéticas celulares. Así, aquellos tejidos que tengan mayor requerimiento de ATP serán los más afectados en el caso de producirse fallos en su producción [54] [55] .

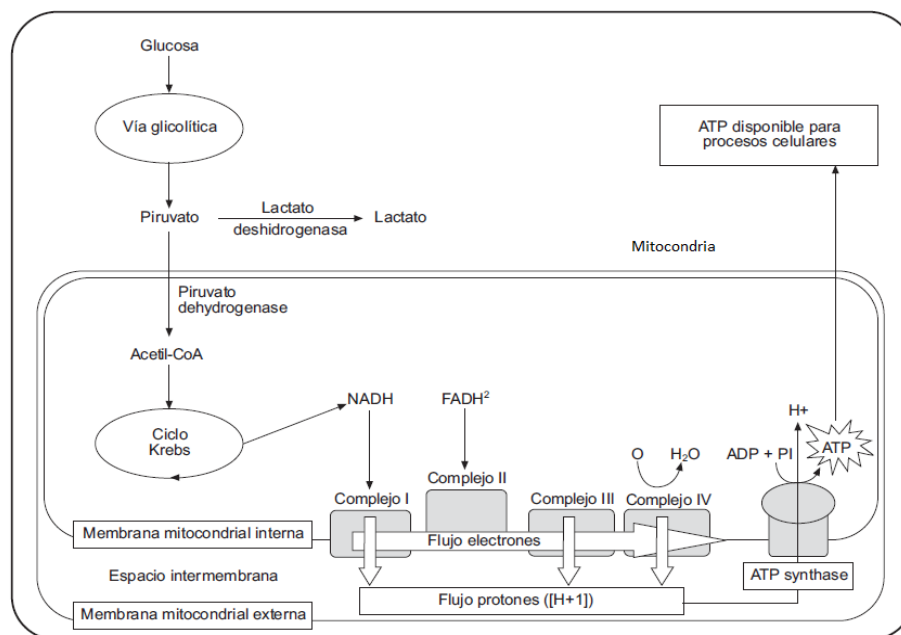


Figura 1. 11 Flujo metabólico de la glucosa: la vía glucolítica, la entrada de Piruvato a la mitocondria y al ciclo de Krebs, y la entrega de compuestos reductores NADH, FADH, a la cadena de fosforilación oxidativa [56].



### 1.3.6 El ATP fuente de energía

El ATP (Adenosina Trifosfato) es una sustancia que existe en todos los seres vivos y tiene una gran importancia porque funciona como fuente directa de energía para muchos procesos. En los procesos metabólicos que se dan en la célula, algunas reacciones son endergónicas: necesitan energía para producirse y en caso contrario no se producen. Otras son exergónicas: producen energía y si ésta no se emplea en realizar un trabajo físico o una reacción química se perderá en forma de calor. Ciertas coenzimas, como el ATP y otras, actúan transportando energía desde los procesos exergónicos a los endergónicos. Pues el ATP se puede transformar en ADP y Pi (fosfato inorgánico) al hidrolizarse el último de sus enlaces éster-fosfato, desprendiéndose más de 7 kcal por mol de ATP. Por el contrario, en aquellas reacciones en las que se produce energía esta es acumulada al sintetizarse ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (Pi) [49] [53].

### 1.3.7 Las enzimas

Las enzimas son proteínas o asociaciones de proteínas y otras moléculas orgánicas o inorgánicas que actúan catalizando los procesos químicos que se dan en los seres vivos. Esto es, actúan facilitando las transformaciones químicas; acelerando considerablemente las reacciones y disminuyendo la energía de activación que muchas reacciones requieren [49] [53].

### 1.3.7 Coenzimas

Muchas enzimas precisan para su actuación la presencia de otras sustancias no proteicas: los cofactores. Químicamente son sustancias muy variadas. En algunos casos se trata de simples iones, cationes en particular, como el  $\text{Cu}^+$  o el  $\text{Zn}^+$ . En otros, son sustancias orgánicas mucho más complejas, en cuyo caso se llaman coenzimas. Muchas vitaminas son coenzimas o forman parte de coenzimas. Las coenzimas son imprescindibles para que la enzima actúe. Así, muchas reacciones de oxidación precisan de la coenzima  $\text{NAD}^+$ , molécula que capta los electrones y sin su presencia la enzima no puede actuar. Otro ejemplo lo tenemos en las reacciones que necesitan energía en las que actúa como coenzima el ATP. Por último, indicar que las enzimas se nombran añadiendo la terminación *asa*, bien al nombre del sustrato sobre el que actúan (sacarasa), al tipo de actuación que realizan (hidrolasas), o ambos (ADN polimerasa). Las coenzimas tienen un papel fundamental en el metabolismo y en la fisiología del organismo y, de hecho, hay muchas enfermedades producidas por defectos en coenzimas [49] [53].



### 1.3.8 Factores que condicionan la actividad enzimática

Las enzimas, como sustancias proteicas que son, van a ver condicionada su actuación por determinados factores físicos y químicos. Algunos de estos factores son: La temperatura. Como toda reacción química, las reacciones catalizadas enzimáticamente siguen la regla de Van t'Hoff. Según la cual, por cada 10 °C de aumento de temperatura, la velocidad de la reacción se duplica. No obstante, las enzimas tienen una temperatura óptima. En los animales homeotermos como el hombre, esta temperatura óptima coincide con la temperatura normal del organismo. Las enzimas, como proteínas que son, se desnaturalizan a elevadas temperaturas. El pH, al influir sobre las cargas eléctricas, altera la estructura del centro activo y por lo tanto también influirá sobre la actividad enzimática [49] [53]. Determinadas sustancias inhibitoras van a poder actuar sobre las enzimas disminuyendo o impidiendo su actuación. Estas sustancias son los inhibidores. Se trata de moléculas que se unen a la enzima impidiendo que ésta actúe sobre el sustrato. [57] [58]

### 1.3.9 Algunas coenzimas importantes

1.- Coenzimas que intervienen en las reacciones en las que hay transferencias de energía:

- a) ATP (adenosina-5'-trifosfato): Adenina-Ribosa-P-P-P
- b) ADP (adenosina-5'-difosfato): Adenina-Ribosa-P-P

2.- Coenzimas que intervienen en las reacciones en las que hay transferencias de electrones [59] [60]:

- a)  $\text{NAD}^+$  (Nicotinamida adenina dinucleótido). Se trata de un dinucleótido formado por Nicotinamida-Ribosa-P-P-Ribosa-Adenina.
- b)  $\text{NADP}^+$  (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato). Similar  $\text{NAD}^+$  pero con un grupo fosfato más esterificando el HO- del carbono 2 de la ribosa unida a la adenina.
- c)  $\text{FAD}^+$  (Flavína adenina dinucleótido). Similar al  $\text{NAD}^+$  pero conteniendo riboflavina (otra de las vitaminas del complejo B2) en lugar de Nicotinamida.

### 1.3.10 Las coenzimas transportadoras de electrones

Muchos procesos químicos celulares de gran importancia como la respiración celular, son de oxidación-reducción. Así, por ejemplo: la respiración celular, en la que la glucosa se oxida al perder electrones, mientras que el oxígeno los capta reduciéndose, involucran al  $\text{NAD}^+$ , nicotinamida adenina dinucleótido también llamada difosfopiridina nucleótido, complejo u coenzima I, esta coenzima se encuentra en todas las células vivas. Las reacciones redox catalizadas por oxidoreductasas son vitales en todo el metabolismo, pero una esfera particularmente importante es la liberación de energía de los nutrientes. Los compuestos reducidos, como la glucosa, se oxidan, liberando así la energía. Esta energía se transfiere al  $\text{NAD}^+$  mediante reducción a  $\text{NADH}$ , como parte de la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico (ciclo de Krebs), ver (**Figura 1. 12**). En eucariotas, los electrones transportados por el  $\text{NADH}$  que se produce en el citoplasma mediante glucólisis son transferidos al interior de la mitocondria por lanzaderas mitocondriales, como la lanzadera malato-aspartato. El  $\text{NADH}$  es oxidado a su vez por la cadena de transporte de electrones, que bombea protones a través de la membrana y genera ATP a través de la fosforilación oxidativa) [59] [60] [61].

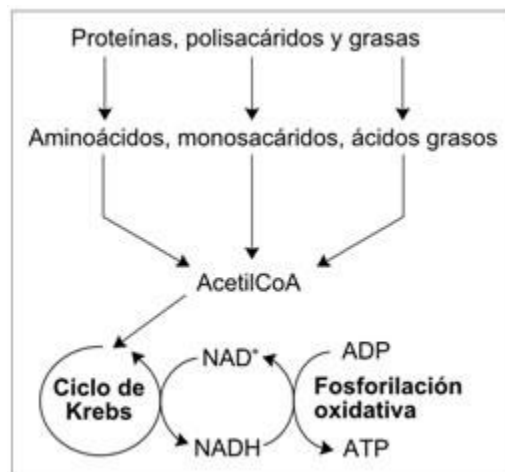


Figura 1. 12 Esquema del metabolismo redox  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADH}$  [59].

Aunque las reacciones de transferencia de electrones son la principal función del  $\text{NAD}^+$ , también es utilizado en otros procesos celulares, en especial como sustrato de las enzimas que añaden o eliminan grupos químicos de las proteínas, en modificaciones post-



traduccionales. Debido a la importancia de estas funciones, las enzimas que intervienen en el metabolismo del  $\text{NAD}^+$  son objetivos para el descubrimiento de medicamentos. En los organismos, el  $\text{NAD}^+$  puede ser sintetizado desde cero (de novo) a partir de los aminoácidos triptófano o ácido aspártico. Alternativamente, los componentes de las coenzimas se obtienen a partir de los alimentos, como la vitamina llamada niacina [62] [63]. Compuestos similares son liberados por las reacciones que descomponen la estructura del  $\text{NAD}^+$ . Estos componentes preformados pasan luego a través de una ruta que los recicla de vuelta a la forma activa. Algunos  $\text{NAD}^+$  también se convierten en nicotinamida adenina dinucleótido fosfato ( $\text{NADP}^+$ ), cuya química es similar a la de la coenzima  $\text{NAD}^+$ , aunque tiene diferentes funciones en el metabolismo. El sistema NADPH oxidasa es un complejo multiproteico, es una coenzima que interviene en numerosas vías anabólicas; el cual actúa como lo hace el NADH. Pero, los electrones del NADPH están destinados mayoritariamente para la biosíntesis reductora, a diferencia del destino de los electrones del NADH. Por lo tanto, en las transformaciones metabólicas de la vía de las pentosas fosfato, parte de la energía de la glucosa-6-fosfato es conservada en la molécula de NADPH, que es utilizada en reacciones que requieren un donador de electrones con un alto potencial de óxido-reducción. El NADPH por ejemplo, es utilizado 1) como fuente de electrones para la biosíntesis de ácidos grasos y esteroides. [64] , 2) ayuda a producir especies reactivas del oxígeno (ERO) en diferentes células y tejidos, lo cual es de gran importancia en las células fagocíticas (principalmente neutrófilos y macrófagos) porque participa en la destrucción de microorganismos patógenos, durante la fagocitosis y la formación de las trampas extracelulares de neutrófilos (NET, por neutrophils extracellular traps), así como en la activación de procesos inflamatorios [65] [66].

### 1.3.11 La utilidad del NADH para propósitos analíticos

- 1) Sirven como agentes naturales de oxidación o reducción en una amplia variedad de sistemas enzimáticos específicos. Con la enzima apropiada como catalizador, ellos pueden oxidar o reducir selectivamente un sustrato particular en presencia de otros muchos compuestos.
- 2) Las formas reducidas de los nucleótidos NADH y NADPH, además de absorber luz en el cercano UV, son fluorescentes, mientras las formas oxidadas no lo son.
- 3) Las formas reducidas pueden ser destruidas completamente en medio ácido sin afectar las formas oxidadas. Las formas oxidadas pueden ser destruidas en medio básico sin afectar las formas reducidas.



- 4) Los espectros de absorción y fluorescencia de NADH han sido bien caracterizado en diferentes niveles de organización, es decir, en solución, mitocondrias y suspensiones de células, cortes de tejido y órganos in vitro e in vivo. NADH tiene una banda de absorción óptica a aproximadamente 300 a 380 nm y una banda de emisión de fluorescencia a 420 nm a 480, existiendo un acuerdo universal de que la intensidad de la fluorescencia es independiente del nivel de organización del medio ambiente, y es proporcional a la concentración de NADH mitocondrial (forma reducida), particularmente cuando se mide in vivo a partir de un tejido. El significado bioquímico y fisiológico de estas cualidades espectrales también es aceptada universalmente, es decir, un aumento en la Intensidad de Fluorescencia (IF) indica un mayor estado reducido de NADH, estando fuertemente ligada a los cambios en el estado redox de la cadena de transporte de electrones y por ende del metabolismo celular [35] [67] [61].

### 1.3.12 Concentración de NADH en las células

Concentraciones en células de NADH in vivo se han encontrado dentro del rango de 20  $\mu\text{M}$ , Durante condiciones de normoxia y 200  $\mu\text{M}$  durante anoxia; así mismo las correspondientes concentraciones in vitro son de 5 y 50  $\mu\text{M}$  respectivamente [36]. Niveles Intracelulares de  $\text{NAD}^+$  son significativamente más altos que  $\text{NADP}^+$  bajo condiciones fisiológicas, los podemos encontrar en el citoplasma y en la mitocondria principalmente, en el citoplasma la relación de  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  es de aproximadamente 700 a 1, mientras que en la mitocondria una relación  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  de 7 a 8 ha sido reportada, en contraste los niveles de NADPH son mucho más altos que los de  $\text{NADP}^+$  [68].

## 1.4 Inflamación

La búsqueda de soluciones terapéuticas ante los efectos provocados por las patologías inflamatorias, abre paso a la TLBI, la cual trata de evitar efectos adversos que causan medicamentos anti-inflamatorios de uso mundial, los cuales son drogas que generan problemas anexos como la toxicidad gastrointestinal [69] [70]. Por lo que estudiar los procesos inflamatorios resulta un hecho imprescindible, necesario y con gran repercusión en el campo de la TLBI.

### 1.4.1 El proceso inflamatorio



Aunque dolorosa, la inflamación es, normalmente, una forma de protección la cual mantiene la homeostasis en un organismo vivo, es la respuesta, del sistema inmunológico de un organismo, al daño causado a sus células y tejidos vascularizados por patógenos bacterianos y por cualquier otro agresor de naturaleza biológica, química, física o mecánica (**Figura 1. 13**). Son múltiples las enfermedades y el número de especies intermediarias cuya fisiopatología y mecanismos se asocian a eventos característicos de la reacción inflamatoria. La respuesta reparadora del proceso inflamatorio involucra: El reclutamiento (instrucción y envío de células a la zona afectada), la eliminación de microbios, cuerpos extraños y de células infectadas y/o dañadas, La creación de barreras para evitar las metástasis microbianas, la reparación del tejido lesionado por la agresión o por la respuesta del huésped [71].

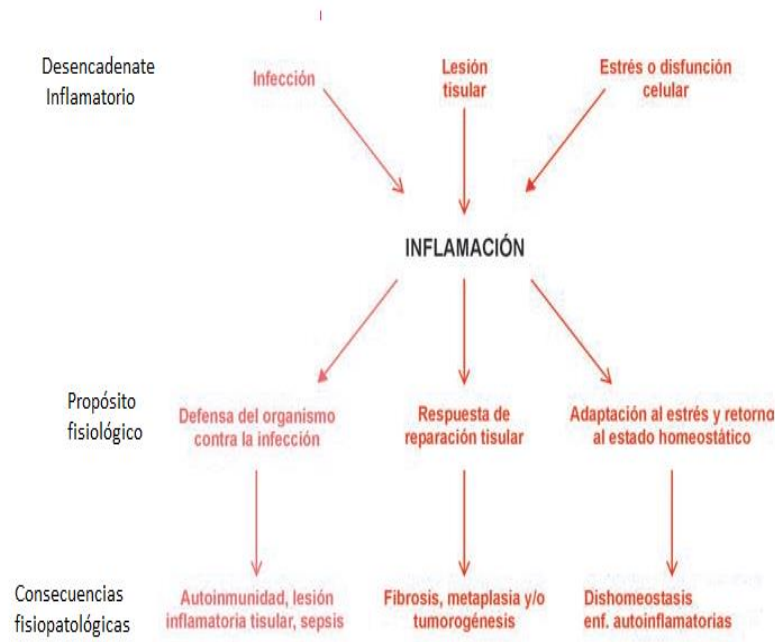


Figura 1. 13 La inflamación, es encaminada a restaurar la homeostasis, pero, puede derivar en diferentes escenarios [71].

### 1.4.2 Fases de la inflamación

Podemos dividir la inflamación en cinco etapas [37]:



- 1 Liberación de mediadores: Son moléculas, la mayor parte de ellas, de estructura elemental que son liberadas o sintetizadas por mastocitos bajo la actuación de determinados estímulos.
- 2 Efecto de los mediadores: Una vez liberadas, estas moléculas producen alteraciones vasculares y efectos quimiotácticos que favorecen la llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio.
- 3 Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio: Proceden en su mayor parte de la sangre, pero también de las zonas circundantes al foco.
- 4 Regulación del proceso inflamatorio: Como la mayor parte de las respuestas inmunes, el fenómeno inflamatorio también integra una serie de mecanismos inhibidores tendentes a finalizar o equilibrar el proceso.
- 5 Reparación: Fase constituida por fenómenos que van a determinar la reparación total o parcial de los tejidos dañados por el agente agresor o por la propia respuesta inflamatoria.

Si diferentes causas alteran o bloquean cualquiera de las etapas del ordenado proceso, la inflamación puede derivar hacia soluciones no deseadas, como la infiltración tisular por agregados de linfocitos y leucocitos (granulomas) que, en ocasiones son embebidos en una masa de fibroblastos sinoviales hiperproliferativos (pannus), o la distorsión tisular mediante la biosíntesis incontrolado de colágeno (fibrosis o cirrosis). La inflamación persistente puede provocar depósitos de proteínas amieloides, en principio protectoras pero que, a la larga, pueden inducir enfermedades crónicas degenerativas, y, también, lesiones oxidativas en el ácido desoxirribonucleico (ADN) que, con el tiempo, favorezcan transformaciones neoplásicas (se produce una masa anormal de tejido, ya que las células se multiplican a un ritmo superior a lo normal) [72] [73] [74]. La inflamación es, ante todo, una respuesta a favor de la supervivencia, tal como queda reflejado por el elevado riesgo de infecciones graves en individuos con deficiencias genéticas de los componentes principales del proceso inflamatorio; por ejemplo, la incapacidad para movilizar leucocitos al foco lesionado en los déficit de adhesión leucocitaria puede conducir a la muerte por infección; la incapacidad de producir diferentes componentes del sistema del complemento sérico predispone a infecciones meningocócicas, o la incompetencia de la maquinaria NADPH oxidasa leucocítica, que incapacita al fagocito para producir especies reactivas de oxígeno bactericidas, conlleva la enfermedad granulomatosa crónica (algunos síntomas son: Ampollas o llagas en la cara “impétigo”, crecimientos llenos de pus “absceso”, protuberancias llenas de pus en la piel “furúnculo” . En muchas ocasiones el objetivo médico es lograr inducir inflamación de manera eficaz, tal es el caso de las vacunas. Todos los procesos que conllevan a desencadenar la inflamación están regulados por mediadores químicos, cuyos orígenes pueden ser celulares



o plasmáticos. Aunque todos los tejidos al lesionarse van a liberar mediadores de la inflamación, la fuente principal de los mismos es el mastocito [71] [40] [37]. El mastocito contiene en el citoplasma gránulos con mediadores de la inflamación preformados, cuando se activa, libera estos factores, junto con otros de carácter lipídico que son sintetizados de novo. El mastocito se detecta en casi todos los tejidos, siendo localizado principalmente alrededor de los pequeños vasos, sobre los que actuarán los mediadores una vez liberados. Los mediadores celulares además de los mastocitos tienen su origen en los leucocitos y plaquetas, existiendo sustancias que se encuentran en gránulos de secreción y en su interior se hayan mediadores químicos como la histamina, la serotonina y enzimas lisosomales [40] [37]. Los agentes de reconocimiento más reciente son las prostaglandinas, los leucotrienos, los factores de activación de plaquetas, óxido nítrico con sus derivados, y las citosinas. Los factores de origen plasmático tienen como productor principal el hígado, allí se observan dos vías, la activación del factor de coagulación XII o de Hageman, que actúa a su vez sobre el sistema de las cininas (proteínas del plasma sanguíneo que tienen implicación en: las contracciones de los músculos lisos, la presión sanguínea, el flujo sanguíneo, la permeabilidad de los vasos capilares y los receptores del dolor), el sistema de coagulación y la fibrinólisis [71]. Las señales que inician el proceso inflamatorio; activan sensores que suscitan la producción de lotes específicos de mediadores. Estos, a su vez, alteran los estados funcionales de células, tejidos y órganos que son los efectores de la inflamación, de manera que permitan la adaptación y reparación del daño infringido por el inductor. Clásicamente la inflamación se ha considerado integrada por los cuatro signos de Celso: Calor, Rubor, Tumor y Dolor. El calor y rubor se deben a las alteraciones vasculares que determinan una acumulación sanguínea en el foco. El tumor se produce por el edema y acúmulo de células inmunes, mientras que el dolor es producido por la actuación de determinados mediadores sobre las terminaciones nerviosas del dolor. Cuando un tejido es dañado, por un golpe, por ejemplo, sus células liberan una sustancia llamada histamina, que produce la dilatación de los vasos sanguíneos y, por consiguiente, el aporte de grandes cantidades de sangre hacia el área afectada. Además, los tejidos inflamados liberan líquido intracelular, conocido como exudado inflamatorio, que puede acumularse infiltrando los tejidos y dificultando o imposibilitando el funcionamiento del órgano o de la región afectada. La inflamación puede ser aguda o crónica. Es aguda cuando presenta un período de hinchazón, dolor e incapacidad crecientes, que luego en poco tiempo disminuye; se denomina crónica cuando se prolongan durante meses o años, presentando períodos de mayor o menor intensidad, de acuerdo con factores como la humedad, la dieta o el estado del propio sistema inmunitario. La gravedad, la duración y las características peculiares de cada respuesta inflamatoria dependen del área afectada, de su estado previo y de la causa que la provoca [75] [40] [37].

Agentes inflamatorios:



- 1) Agentes vivos: bacterias, virus, parásitos, hongos.
- 2) Agentes físicos: radiaciones, frío, calor, ultravioletas.
- 3) Agentes químicos: venenos, toxinas.
- 4) Traumatismos y cuerpos extraños.
- 5) Alteraciones vasculares: como por ejemplo las que producen isquemia.

La inflamación es un proceso que implica un enorme gasto de energía metabólica. En ocasiones, transcurre hacia una situación crónica que suele dar lugar a una enfermedad degenerativa como artritis, arteriosclerosis o, incluso, cáncer. Aunque suele acompañarse de una respuesta generalizada (respuesta de fase aguda) caracterizada por un cuadro clínico pasajero de sensación de malestar, fiebre, modificación del perfil de las proteínas y leucocitos circulantes. En ocasiones, la inflamación aguda local provoca una reacción orgánica generalizada (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica) que, en una secuencia de reacciones a modo de espiral sin control (inflamación maligna), conduce al fracaso funcional de los diferentes órganos y sistemas (fracaso multiorgánico) y, tras ello, a la muerte del individuo [76].

#### Modificaciones leucocitarias:

Existen una serie de modificaciones leucocitarias durante la inflamación, los leucocitos fagocitan a los patógenos, destruyen a las bacterias y a los microorganismos, y degradan el tejido necrótico; pero también pueden prolongar la lesión tisular al liberar enzimas, mediadores químicos y ERO (las cuales son también mediadores químicos es decir sus efectos son dependientes de la concentración) [40] [37] [77].

Las fases de las modificaciones leucocitarias son:

- 1) Marginación y adherencia a las células endoteliales: Cuando el flujo de las vénulas es normal, los leucocitos se desplazan a las paredes del vaso, después se adhieren al endotelio transitoriamente (rodamiento) hasta que llegan a un punto en el que se adhieren firmemente. Con el tiempo el endotelio puede quedar revestido de leucocitos (pavimentación).
- 2) Emigración: Los leucocitos fijados emiten unos pseudópodos a modo de palanca entre las células endoteliales, se introducen y quedan entre éstas y la membrana basal. Finalmente, liberan colagenasas para romperla y consiguen atravesarla.
- 3) Moléculas de adherencia: Selectinas, Inmunoglobulinas e Integrinas: Los mediadores inflamatorios activan a las selectinas que se encuentran almacenadas en los gránulos de las células endoteliales. La adhesión firme de los leucocitos al endotelio se produce gracias al cambio conformacional de las integrinas.



- 4) Quimiotaxis: Se trata de la locomoción orientada según un gradiente químico hacia la zona de lesión.

Los leucocitos polimorfonucleares predominan más al principio, pero en las fases finales predominan más los monocitos, que tienen una vida media más larga y son más resistentes al agente inflamatorio [78].

## 1.5 Radicales libres, especies reactivas

Aunque son muchos los antecedentes sobre los efectos terapéuticos de la terapia laser de baja potencia, las publicaciones presentan resultados diversos, entre ellos algunos autores atribuyen que la fotoestimulación de las funciones celulares por la TLBI, se debe a la formación de pequeñas cantidades de especies reactivas de oxígeno (ERO) y antioxidantes, los cuales cambian el estado redox celular, conduciendo al proceso de respuesta inflamatoria [79]. Otros autores, proponen que el efecto celular de la TLBI puede ser la regulación del Óxido nítrico ( $ON\bullet$ ), el cual a su vez regula procesos fisiológicos, como el aporte de flujo sanguíneo a los tejidos mediante la vaso dilatación y vaso constricción de los vasos, a nivel celular afecta a la CTE, es por eso que en este capítulos se describirán los procesos de las ERO y especies reactivas de nitrógeno (ERN) [15] [80] [1].

### 1.5.1 Radicales Libres

Un radical libre es una molécula (orgánica o inorgánica), en general extremadamente inestable y, por tanto, con gran poder reactivo. Se puede sintetizar en el laboratorio, se puede formar en la atmósfera por radiación, y también se forma en los organismos vivos (incluido el cuerpo humano), por el contacto con el oxígeno, y actúan alterando las membranas celulares y el material genético de las células, como el ADN. Los radicales libres tienen una configuración electrónica de capas abiertas por lo que llevan al menos un electrón desapareado que es muy susceptible de crear un enlace con otro átomo o molécula. Desempeñan una función importante en la combustión, en la polimerización, en la química atmosférica, dentro de las células y en otros procesos químicos [81] [40] [37].

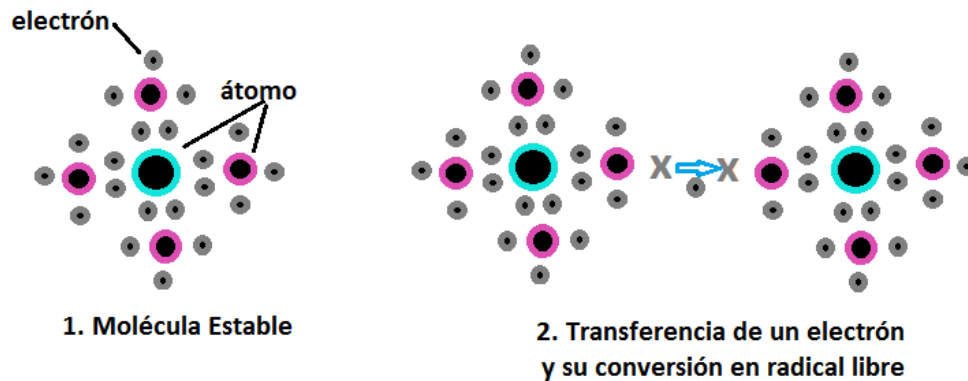


## 1.5.2 Los radicales libres en el organismo

Son moléculas altamente reactivas, debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada. Estas especies se forman de manera natural, a nivel celular como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y por el sistema inmune para atacar virus y bacterias actuando como sistemas reguladores del proceso inflamatorio. Sin embargo, existen factores ambientales (contaminación, cigarrillo, mala alimentación) que aumentan de manera desproporcionada las dosis de radicales libres que hay en nuestro cuerpo. El cuerpo maneja los radicales libres que se producen de forma natural, pero si la producción de los mismos es excesiva, se producen daños en el organismo [81] [40] [37].

### 1.5.2.1 Formación de radicales libres

El cuerpo humano está compuesto por diferentes células, que a su vez están compuestas de diferentes moléculas. Las moléculas constan de átomos que se unen por enlaces químicos, El átomo tiene protones (carga positiva) y electrones (carga negativa) que orbitan alrededor del átomo. En general los átomos de las moléculas buscan la estabilidad, la cual se logra conteniendo un número par determinado de electrones en sus orbitas. Los electrones de un átomo o molécula pueden compartirse con otros átomos o moléculas para conseguir la máxima estabilidad, cuando esta estabilidad no es alcanzada, por quedar un electrón sin pareja (impar), se forma una molécula conocida como radical libre. Estos radicales libres son muy inestables, por lo que reaccionan con facilidad con otras moléculas para encontrar el electrón necesario para lograr su estabilidad. Si roban un electrón a otra molécula, esta quedará inestable y se convertirá en un radical libre también (**Figura 1. 14**). De esta forma se realiza una cascada de radicales libres, que en exceso pueden causar daño celular [82].



**Figura 1. 14** Una molécula estable al perder un electrón se vuelve inestable, si se da a nivel celular se le llama radical libre, modificado de [83].

### 1.5.2.2 Exceso de radicales libres

Los daños producidos por la producción excesiva de radicales libres se asocian con:

- 1) Envejecimiento: Las membranas de las células epiteliales se modifican, y así se ve dificultada la nutrición de la piel, por otro lado también se ven dañadas las células de colágeno y elastina, entonces la piel pierde firmeza y elasticidad [81].
- 2) Problemas en el sistema cardiovascular: se ve favorecida la aparición de arterioesclerosis por el endurecimiento de las paredes arteriales. El endotelio es el responsable de mantener el equilibrio entre los procesos de trombosis-fibrosis y vaso dilatación-constricción. La oxidación por el exceso de radicales libres afecta a la pared endotelial, no pudiendo realizar sus funciones correctamente [82].



- 3) Problemas en el sistema nervioso: el impulso nervioso se ve disminuido, al igual que los reflejos, la memoria y el aprendizaje [84], [85].

### 1.5.3 Especies reactivas del oxígeno (ERO)

A los radicales libres que involucran a moléculas en las que el oxígeno es el elemento reactivo de su estructura, se les llama especies reactivas de oxígeno (ERO). Las ERO son especies moleculares caracterizadas por su gran capacidad de interacción química (reactividad) y que presentan en su orbital más externo un electrón no apareado, estas pueden ser producidos por dos fuentes: una endógena (como las mitocondrias, peroxisomas, citocromo P450 y la activación celular inflamatoria) y la otra exógena (rayos ultravioleta, patógenos y drogas, entre otros) [81] [86]. Las ERO interactúan con la mayoría de compuestos celulares. El producido fuera de las células reacciona fundamentalmente con las membranas plasmáticas; el producido dentro de las células reacciona con el ADN, las proteínas, los lípidos y otros compuestos celulares, las ERO tienen efectos benéficos para el organismo cuando son producidas en cantidades moderadas, participan en numerosas reacciones esenciales para los organismos aeróbicos, por ejemplo, durante los estados de infección, los macrófagos y los polimorfo-nucleares ejercen su papel de defensa mediante un sistema enzimático de oxidación y reducción, donde se producen ERO, las cuales dañan la membrana y el ADN microbiano, por la alteración de lípidos y proteínas, formándose un sistema de defensa antimicrobiano. Así mismo, durante la inflamación aguda, las grandes cantidades de dichas especies liberadas permiten activar los fagocitos (sistema de señalización), promover la vasodilatación e inducir citotoxicidad. La naturaleza reactiva de ERO en grandes cantidades puede producir daño celular y tisular en general, por lo que su concentración es regulada por el sistema endógeno de antioxidantes [87]. Se ha calculado que cada molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) contenida en cada una de nuestras células es objeto de 10,000 ataques por día por parte de los radicales libres. El ADN contenido en el interior de las mitocondrias está mucho más expuesto que el ADN del núcleo, ya que está más próximo a la fuente de las ERO y esta menos protegido, al carecer de histonas. Puesto que el ADN mitocondrial codifica sobre todo para componentes de la maquinaria de producción de energía, estos componentes acumulan alteraciones que contribuyen a disminuir su funcionalidad, lo que produce una disminución de la producción de energía (ATP). Cuando la producción de ATP disminuye por debajo de un umbral, la célula deviene incompetente, por lo que se desencadena el proceso de muerte celular por



apoptosis, un claro ejemplo de esto es el proceso de envejecimiento, donde se va disminuyendo el número de células productoras de energía, conforme pasan los años [88].

### 1.5.3.1 Producción de ERO en las mitocondrias

El proceso normal de producción de energía en nuestras células, esencial para mantener las funciones vitales, tiene lugar en el interior de las mitocondrias. De manera colateral, durante este proceso se generan ERO, que son compuestos moleculares inestables, extremadamente reactivos, que alteran todos los componentes celulares (ácidos nucleicos, proteínas y lípidos). El  $O_2$  se utiliza como aceptor final en la respiración mitocondrial, su función es la de recibir los electrones provenientes de la cadena respiratoria y protones de la matriz mitocondrial para formar agua como un subproducto del metabolismo. Durante el metabolismo oxidativo mitocondrial, aproximadamente 5% del oxígeno es convertido fundamentalmente en ERO mientras que 95% es reducido a agua [89]. El NADH como sustancia reductora (que cede fácilmente electrones) junto con el  $O_2$  forman ERO, estas se forman como consecuencia de que el oxígeno presenta 2 electrones desapareados en su capa de valencia con lo que puede sufrir una serie de reducciones mono-electrónicas que conducen a la formación de Radical Superóxido ( $O_2\cdot$ ) cuando el  $O_2$  capta un electrón, el  $O_2\cdot$  forma otras ERO entre las más reactivas tenemos: de Peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el Radical Hidroxilo ( $HO\cdot$ ), entre otras (**Figura 1. 15**). Alrededor del 1% del  $O_2$  consumido en la respiración celular genera  $O_2\cdot$  lo cual significa que una persona de 70 Kg en reposo genera unos dos litros de  $O_2\cdot$  al día. Con el ejercicio el consumo de  $O_2$  se incrementa y por lo tanto la generación de  $O_2\cdot$  aumenta hasta diez veces [90].

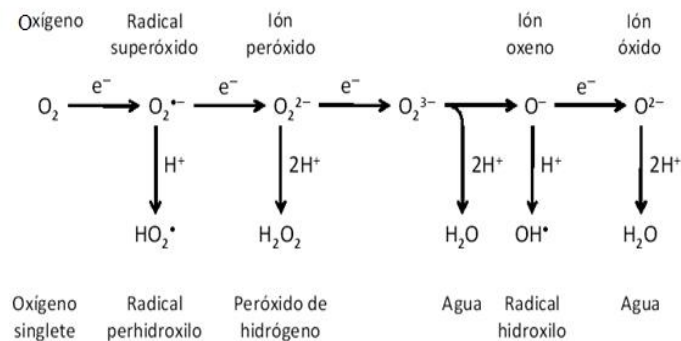


Figura 1. 15 Generación de ERO, a partir de oxígeno, mediante redistribución electrónica o por reducción secuencial con un electrón [90].

### 1.5.3.2 El óxido nítrico (NO•)

Además de las ERO, se ha descubierto que hay otras especies de oxígeno combinadas con el nitrógeno que son importantes en la biología, tal es el caso del monóxido de nitrógeno u óxido nítrico (NO•). El óxido nítrico (NO•) el cual es un radical libre diatómico, de vida media corta, es sintetizado en los organismos vivos a partir de L-arginina por una familia de enzimas denominadas Óxido Nítrico Sintetas (NOS), la NOS cataliza la oxidación del amino guanidino de la L-arginina para generar óxido nítrico y L-Citrulina, con la formación del intermediario N-Hidroxi-L-arginina, utilizando NADPH como sustrato [91], la reacción se muestra en la (Figura 1. 16).

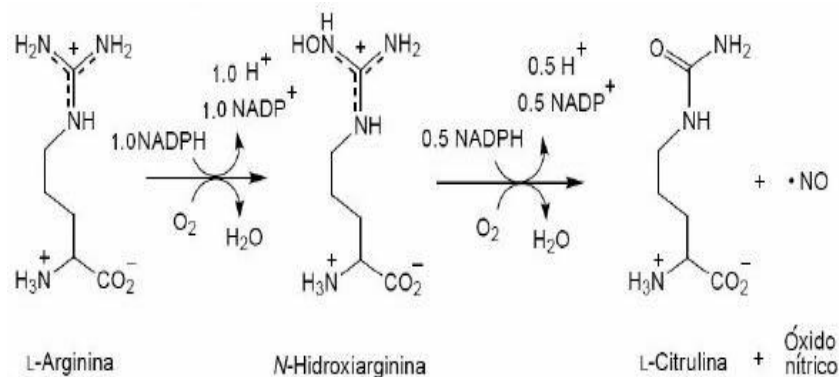


Figura 1. 16 Reacción general para la formación de Óxido nítrico, catalizada por las Óxido nítrico sintetas (NOS) [91].

El NO• juega un papel fisiológico en el control del tono vascular, la producción excesiva de NO• induce la formación de diversas Especies Reactivas de los Óxidos de Nitrógeno (ERON) y una disfunción mitocondrial, la cual está asociada a diversas patologías, tales como la diabetes mellitus, la isquemia-reperfusión y diversos procesos inflamatorios. El NO• es un gas incoloro relativamente soluble, la concentración fisiológica del NO• es de orden nanomolar, aunque puede llegar a ser micromolar en el sitio en el que se produce [91] [92]. El NO• es un radical porque tiene un electrón desapareado, sin embargo, al igual que el O<sub>2</sub>•, al cual se parece mucho, el NO• no es muy reactivo y se puede difundir, reacciona lentamente con los tioles formando tionitritos (nitrosotioles) o con los sulfhidrilos de algunas enzimas (deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato), en cambio, reacciona rápidamente con otros radicales, como con el O<sub>2</sub>, generando Dióxido de



Nitrógeno ( $\text{NO}_2\bullet$ ) y con el  $\text{O}_2\bullet$  generando peroxinitrito ( $\text{ONOO}\bullet$ ), ambos compuestos son más oxidantes que el  $\text{NO}\bullet$  [92]. Se piensa que, para que genere daño, el  $\text{NO}\bullet$  se debe transformar primero en un compuesto más reactivo, como él  $\text{NO}_2\bullet$  o el  $\text{ONOO}\bullet$ . La mayor parte del  $\text{NO}\bullet$  que se produce en los tejidos se une a la hemoglobina o a la mioglobina produciendo metahemoglobina o metamioglobina y nitrato ( $\text{NO}_3$ ). Este último se elimina por la orina [90]. Además de la vasodilatación, el  $\text{NO}\bullet$  está implicado fisiológicamente en diversos procesos, tales como la neurotransmisión, y la respuesta inmune [37].

### 1.5.3.3 El óxido nítrico Sintetasa

El  $\text{NO}\bullet$  se sintetiza en numerosas células del organismo (macrófagos, neutrófilos, plaquetas, neuronas, células adrenales, retina, etc.), pero su génesis fundamental es a nivel de las células a través de la Óxido Nítrico Sintetasa (NOS). Diferentes isoformas de la NOS han sido caracterizadas: la NOS<sub>n</sub> y la NOS<sub>e</sub> (también denominada, NOS neuronal y endotelial, respectivamente), las cuales se expresan de manera constitutiva; la NOS<sub>i</sub> (NOS inducible) es sintetizada en respuesta a estímulos inmunológicos o inflamatorios; y por último la NOS<sub>mt</sub> (NOS mitocondrial), la cual se ha sugerido es una modificación postraduccional de la NOS<sub>n</sub> [91]. Existen enzimas intracelulares que producen especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno mediante reacciones electroquímicas. Las enzimas de la familia NADPH o NOX se encuentran presentes en la mitocondria y participan de la cadena respiratoria celular, convirtiendo el  $\text{O}_2$  en anión superóxido  $\text{O}_2\bullet$ . La NOX se ubica en los fagocitos; sin embargo, una enzima similar a la NADPH se encuentra en las demás células realizando la misma función, de una forma un poco menos eficiente. La sintasa de óxido nítrico se encarga de producir óxido nítrico a partir de la reacción del  $\text{O}_2$  con la L-arginina, en presencia de la NADPH. Existen 7 homólogos de la NADPH, cuya función primaria es generar ERO. Algunas células, como las endoteliales y las neuronas, presentan NADPH de manera constitutiva, lo que permite la producción continua de ERO y ERN, logrando mantener el tono vascular y la adecuada transmisión neuronal. La mieloperoxidasa es específica de los gránulos azurófilos de los neutrófilos y es la encargada de la producción de ácido hipocloroso a partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{Cl}$ , importante en la defensa antimicrobiana y que puede ser utilizado como marcador de activación del neutrófilo. Además de la NAPH existen enzimas “radicales” presentes en muchas células y tejidos que, además de producir radicales libres, tienen muchas otras funciones. En condiciones normales, estas enzimas, como la oxidasa del retículo endoplásmico, las enzimas del peroxisoma y las enzimas del citosol, producen pocas cantidades de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. La xantina-oxidasa es una de estas enzimas del citosol que, en el proceso de hipoxia-reperfusión, es la encargada de la producción de las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. Los iones metálicos, aunque no producen directamente dichas



especies reactivas, permiten ampliar su producción, sobre todo cuando se liberan masivamente como producto de la muerte celular. Las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno son el producto de múltiples procesos fisiológicos, como el metabolismo celular, patológicos, como la inflamación y la isquemia, e incluso, producto de la relación con elementos ambientales, como la radiación por la luz, la polución y el humo del cigarrillo. [93] [94] [95] [96] [97] [98]

#### 1.5.3.4 El óxido nítrico, la célula y la cadena respiratoria

El blanco más sensible para el  $\text{NO}\bullet$  en la cadena respiratoria es COX. La exposición a  $\text{NO}\bullet$  por períodos cortos de tiempo y a concentraciones fisiológicas (50-100 nM), inhibe rápidamente al complejo IV mitocondrial de una manera reversible y competitiva con el oxígeno en mitocondrias de corazón, terminales nerviosas del cerebro, cultivos celulares y el complejo IV aislado [91].

Se ha propuesto que el probable significado fisiológico de esta interacción podría ser [91]: a) La regulación de la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; b) La regulación de la liberación del COX durante la apoptosis; c) La prevención de hipoxia en tejidos vivos mediante la inhibición de la respiración mitocondrial, con lo cual se extenderían los gradientes de difusión del  $\text{O}_2$  provenientes de los vasos sanguíneos, permitiendo que el  $\text{O}_2$  difunda hasta células más distales [93]. Se sabe por experimentos en cultivos de macrófagos, que la exposición de  $\text{NO}\bullet$ , durante tiempos prolongados (de hasta 14 h.) promueve una inhibición progresiva de la respiración celular, la cual se vuelve irreversible con el transcurso del tiempo. Bajo estas condiciones, el complejo I es inhibido de manera específica y este efecto no puede ser prevenido ni por la adición de superóxido dismutasa o el atrapador de peroxinitrito ( $\text{ONOO}\bullet$ ): lo que en último término se refleja en la inhibición de la cadena transportadora de electrones en la respiración celular [91]. La cadena respiratoria es la principal fuente generadora de anión superóxido ( $\text{O}_2\bullet$ ) en mitocondrias de mamífero a nivel de los complejos I y III. Así, el  $\text{NO}\bullet$  como ya se mencionó antes, puede reaccionar fácilmente con  $\text{O}_2\bullet$ , para formar al radical libre peroxinitrito. El  $\text{ONOO}\bullet$  puede a su vez reaccionar con grupos  $-\text{SH}$  de residuos de cisteína (s-nitrosilación) y grupos  $-\text{OH}$  de residuos de tirosina (nitricación). Este hecho implica que el  $\text{NO}\bullet$  también puede actuar a nivel de la mitocondria a través de la formación de especies reactivas de nitrógeno (ERN) [92]. La formación del  $\text{O}_2\bullet$  puede incrementarse mediante la adición de algunos inhibidores de la cadena respiratoria, tales como, la antimicina A, la rotenona, el cianuro y probablemente, el  $\text{NO}\bullet$ , que actúa de manera análoga al cianuro. De modo que, un aumento en la producción del  $\text{O}_2\bullet$  por alguno de estos agentes, o por disminución en la actividad de los sistemas antioxidantes (durante el estrés oxidativo), junto con una producción sostenida de  $\text{NO}\bullet$  por parte de la NOSmt o por la activación de los macrófagos (los cuales producen  $\text{NO}\bullet$  bajo la

acción de ciertos efectores), puede dar lugar a una importante formación de  $\text{ONOO}^\bullet$  [91]. Se han detectado incrementos de  $\text{NO}^\bullet$  in vitro en cultivos de monocitos de pacientes con enfermedad de Hansen (lepra) [99]. A nivel celular el  $\text{NO}^\bullet$  es capaz de reaccionar con metaloproteínas que contienen grupos hemo, con el oxígeno y con ERO. La interacción del óxido nítrico con la NADPH oxidasa en células vasculares no únicamente produce especies reactivas de nitrógeno al interactuar con el oxígeno y con el anión súper oxido, también puede actuar para suprimir la activación de la misma NADPH oxidasa (**Figura 1. 17**). [66] [92]

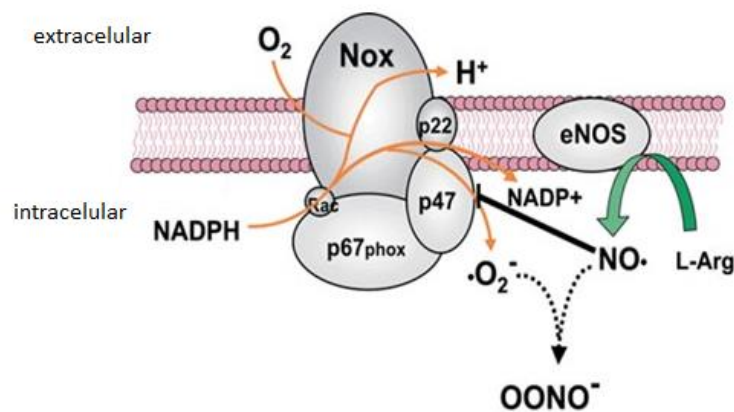


Figura 1. 17 Interacción del óxido Nítrico con la NADPH oxidasa, precursora de especies reactivas de nitrógeno, las cuales en una alta concentración inhiben a la misma NADPH [66].

### 1.5.3.5 NADPH y especies reactivas de oxígeno (ERO)

El sistema fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido (NADPH) oxidasa es un complejo multiproteico de cinco subunidades distribuidas en el citoplasma, las membranas citoplasmáticas y las vesículas fagocíticas. Los componentes citoplasmáticos son las proteínas p40phox, p47phox y p67phox (la denominación phox es el acrónimo de las palabras inglesas phagocyte oxidase) que se encuentran formando un complejo macromolecular, mientras que en la membrana se encuentran las proteínas p22phox y gp91phox que conforman un heterodímero llamado flavocitocromo b558. Estas proteínas junto con la NADPH están involucrada en diferentes procesos celulares: La destrucción intracelular de microorganismos fagocitados, la inducción de muerte celular por apoptosis,

la transcripción de diversos genes, el movimiento intermembranal de iones, la secreción de citoquinas y sustancias proinflamatorias, además de servir como plataforma acopladora de diversas proteínas por ejemplo las citosólicas con las de membrana, necesaria para la activación en un fenómeno llamado explosión respiratoria el cual se caracteriza por un aumento en el consumo de oxígeno molecular y tiene como objetivo generar ERO, entre estos el radical anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) dentro de la vacuola fagocítica, o en el medio extracelular, utilizando como sustrato NADPH (donador de electrones) [66]. Las células fagocíticas (principalmente neutrófilos y macrófagos) participan en la destrucción de microorganismos patógenos, mediante la fagocitosis (las células capturan microorganismos dañinos y los desechan), y la formación de las trampas extracelulares de neutrófilos (NET, por neutrophils extracellular traps), así como en la activación de procesos inflamatorios [93]. El proceso de fagocitosis (**Figura 1. 18**), promueve la translocación de los componentes citosólicos a la membrana de los fagocitos donde se ensambla el sistema NADPH oxidasa. Este complejo genera el anión superóxido, por transferencia de un electrón a una molécula de  $O_2$ . El anión superóxido es una molécula muy inestable y se transforma, espontáneamente o por acción de la superóxido dismutasa (SOD), en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que a su vez puede degradarse por acción de la catalasa o transformarse en radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ) o ácido hipocloroso (HOCl), agentes con alto potencial oxidante. Estos agentes participan en la destrucción de los patógenos que han sido fagocitados [65] [66].

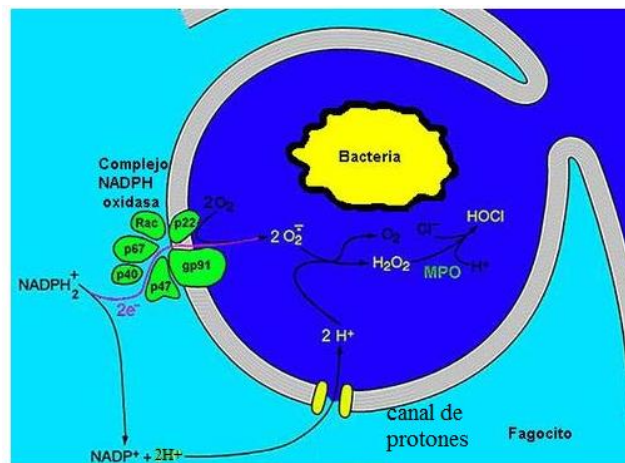


Figura 1. 18 El proceso de fagocitosis promueve la translocación de los componentes citosólicos a la membrana de los fagocitos donde se ensambla el sistema NADPH oxidasa.



### 1.5.3.6 La luz ultravioleta y la generación de especies reactivas

Se denomina radiación ultravioleta a las ondas electromagnética cuya longitud de onda está comprendida aproximadamente entre los 400 nm y los 100 nm [100]. Su nombre proviene del hecho que su rango empieza desde longitudes de onda más cortas de lo que los humanos identificamos como el color violeta. Esta radiación es parte integrante de los rayos solares y produce varios efectos en la salud.

La luz ultravioleta (LUV) de acuerdo a la longitud de onda se divide en tres tipos:

- 1) LUV-A: larga: (400-315 nm)
- 2) LUV-B: media: (315-280 nm)
- 3) LUV-C: corta (280-100 nm)

Las células contienen sustancias, tales como las flavinas, las porfirinas y sustancias reductoras como el NADH y NADPH, los cuales reaccionan a la luz azul (430–490 nm) y el componente A de la luz ultravioleta UVA (320–400 nm). Los compuestos excitados pueden transferir su energía al O<sub>2</sub> y formar ERO, las cuales producen una serie de cambios: que consiste en atacar el material genético al formar unas estructuras que evitan la síntesis normal del ADN, producen mutaciones, fragmentan el material genético y muchas veces si no se produce la muerte celular se propicia el desarrollo de cáncer. El poder de penetración de la LUV-A es tan profundo que no produce quemaduras superficiales, mientras que la LUV-B y la LUV-C penetran las capas más superficiales de la piel, haciendo evidente su daño por la formación del proceso inflamatorio conocido como eritema o enrojecimiento [23] [24] [25]. Los niveles de penetración de los rayos UVB y UVA a nivel de la piel son diferentes. El 70% de la radiación UVB es absorbida por el estrato córneo de la epidermis, a diferencia de la radiación UVA que es absorbida entre el 70-80% por células de la dermis y melanocitos de la epidermis basal. La LUVB produce mayor daño biológico que la LUVA ya que contribuye con cerca del 80% de los efectos dañinos que se asocian a la exposición solar, la UVA sólo produce el 20% restante [101]. Un estudio fue realizado para proporcionar los primeros datos que especifican las dosis de umbral medioambientales de UV-A y UV-B en las que los fibroblastos humanos experimentan apoptosis y necrosis, con lo que se obtuvieron datos para estudios mecanicistas y datos de línea de base, para programas de prevención de cáncer de piel. Los datos reportados del umbral de dosis de la apoptosis a la necrosis se encuentran entre 24-28 kJ/m<sup>2</sup>,



correspondiente a los 19 y 23 minutos de exposición ambiental a UVA y UV-B [26]. Algunos artículos proponen a NADPH y NADH como sustrato para producir ERO cuando la molécula de oxígeno es irradiada por LUV de 290 a 405 nm [27].

### 1.5.3.7 Sistemas antioxidantes

Para protegerse de los radicales libres de oxígeno, el plasma, incluidos fluidos tisulares y las células poseen mecanismos antioxidantes [81]. El desbalance entre la generación de ERO y los sistemas de defensas antioxidantes conlleva a modificaciones químicas de macromoléculas de relevancia biológica, el cual se asocia con mecanismos fisiopatológicos para la iniciación y desarrollo de enfermedades de notable morbilidad y mortalidad (aterosclerosis, cáncer, enfermedades del sistema nervioso central, enfermedades autoinmunes, daño por isquemia-reperusión, entre otras). La generalidad de estos estados fisiopatológicos se han asociado con ciertos hábitos de vida que incluyen aquellos relacionados con la dieta [93]. En resumen, la mayoría de las reacciones de oxidación utilizan el oxígeno ( $O_2$ ), lo que lleva a que 90% del oxígeno plasmático sea utilizado para procesos metabólicos. Las reacciones de oxidación son necesarias para obtener energía para un adecuado funcionamiento celular y un desequilibrio entre la producción de especies reactivas y los mecanismos antioxidantes, genera estrés oxidativo, genera daño, compromete las funciones celulares normales, puede contribuir a estados patológicos y puede conllevar a disfunción y muerte celular [102]. El estudio de las ERO ha sido de gran significación para la práctica médica, fundamentalmente por el aporte de nuevos conocimientos acerca de la causa de diversas enfermedades, en la medida que: 1) Se descubre cómo sustancias antioxidantes son efectivas en el tratamiento de estos desórdenes y 2) Cómo fármacos, de eficacia comprobada en diferentes enfermedades, poseen propiedades antioxidantes [103]. Los sistemas antioxidantes trabajan mediante dos tipos de mecanismos que permiten eliminar los excesos de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, que son la protección estequiométrica y la catalítica. La protección estequiométrica consiste en su neutralización por medio de moléculas pequeñas que inactivan una o dos moléculas de especies reactivas. La protección catalítica se produce con enzimas que inhiben las reacciones de oxidación y evitan la formación de grandes cantidades de especies reactivas. Existe gran cantidad de compuestos antioxidantes, como enzimas, iones metálicos, uratos y otras moléculas endógenas, y moléculas exógenas convencionales, como son las vitaminas y los carotenoides, y no convencionales o menos conocidas. Los sistemas enzimáticos, son de tipo inhibitorio, reductores o neutralizantes, y reparadores. Dentro del grupo de enzimas inhibitorias, encontramos la NADPH oxidasa y el inhibidor Óxido Nítrico Sintasa (NOS), que actúan modulando la actividad de las enzimas responsables de la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno [93]. Otras





enzimas que funcionan como antioxidantes son: superóxido dismutasa, que convierte el anión superóxido en peróxido de hidrogeno; la enzima catalasa que detoxifica el peróxido de hidrogeno para evitar que se convierta en hidroxilo; la glutathion peroxidasa, otro potente detoxificador del peróxido de hidrogeno; el ácido úrico, [104] un potente antioxidante presente en el plasma en una concentración mucho mayor que el ascorbato (vitamina C); la proteína ceruloplasmina, la principal transportadora de cobre en el suero; la fracción plasmática libre de hierro de la proteína transferrina. Además existen compuestos de origen alimentario con capacidad antioxidante que también intervienen en la neutralización de los ERO: el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), liposoluble, con capacidad de protección de las membranas celulares; los carotenoides (como el  $\beta$ -caroteno) y los polifenoles (como el ácido caféico y la quercetina); el ascorbato (vitamina C), hidrosoluble, capaz de regenerar los demás antioxidantes, como el glutathion o el  $\alpha$ -tocoferol [93].

### 1.5.3.9 El factor nuclear kappa B sensor del estrés oxidativo

Al desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad de un sistema biológico de decodificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante se le llama estrés oxidativo. El factor nuclear kappa B (NF-KB) es un factor de transcripción sensible a redox, que se ha propuesto para ser el sensor para el estrés oxidativo. ERO y otros estímulos proinflamatorios pueden activar NF-KB, el cual es un complejo proteico que controla la transcripción del ADN (**Figura 1. 19**). Se encuentra en la mayoría de tipos de células animales y está implicado en la respuesta celular frente a estímulos como el estrés, las citoquinas, radiación ultravioleta, y antígenos bacterianos o virales. El NF-KB juega un papel clave en la regulación de la respuesta inmune debida a la infección (las cadenas ligeras kappa son componentes cruciales de las inmunoglobulinas). La regulación defectuosa del NF-kB está relacionada con el cáncer, enfermedades inflamatorias y autoinmunes, shock séptico, infecciones virales o un desarrollo inmune inadecuado. También está implicado en procesos de plasticidad sináptica y de memoria. Regula la expresión genética, respuesta inducida al estrés y supervivencia. La activación de NF-KB se rige por retroalimentación negativa por I $\kappa$ B, un inhibidor de la proteína que se une a NF-KB, pero puede someterse a la ubiquitinación y la degradación proteasomal, liberando así NF-KB para translocalizar al núcleo e iniciar la transcripción. Entender los mecanismos de la activación que rigen NF-KB puede ser importante en el estudio de la reparación de tejidos o incluso en la progresión del cáncer [105] [106] [107].

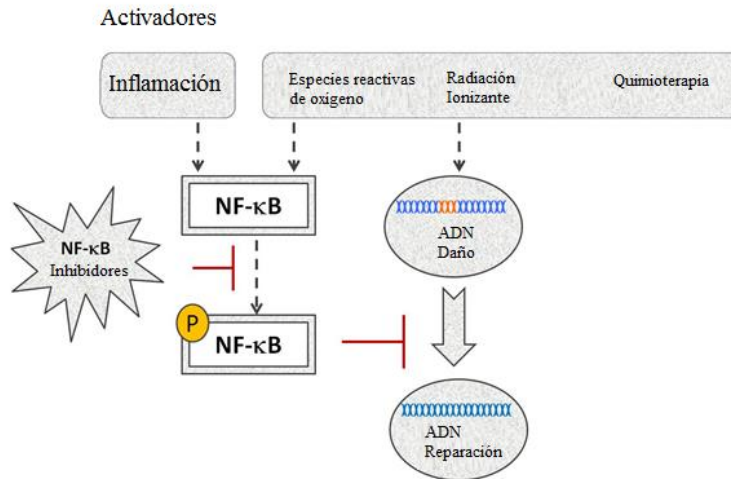


Figura 1. 19 Factor NF-κB sensor del estrés oxidativo, que controla la transcripción del ADN [105].

## 1.6 Apoptosis

El término apoptosis se refiere a las características morfológicas de la Muerte Celular Programada (MCP), la cual es caracterizada por los fenómenos de contracción celular, condensación nuclear, formación de bolsas en la membrana, fragmentación de la membrana relacionada con cuerpos apoptóticos y cambios en la misma, que eventualmente llevan a la fagocitosis de la célula afectada (**Figura 1. 20**). La MCP es requerida, tanto en el proceso del desarrollo animal, como en la vida adulta. En animales maduros, la muerte celular está en balance con la división celular, lo cual mantiene la constancia en la masa del tejido. El proceso de apoptosis hace posible remover de un organismo células dañadas por defectos genéticos, envejecimiento, enfermedades o exposición a agentes nocivos. Además, el proceso de respuesta inmune normal requiere la eliminación regulada de poblaciones celulares específicas, mediante este mecanismo de muerte celular [108] [40] [37]. La apoptosis juega un papel biológico importante en el desarrollo y regulación de las poblaciones celulares, así como en la patogénesis y expresión de enfermedades. La insuficiencia de apoptosis contribuye a la patogénesis de una amplia variedad de enfermedades relacionadas con neurodegeneración, autoinmunidad e infecciones virales, y esta también involucrada en el crecimiento y regresión de tumores. Los recientes avances del conocimiento de la misma se basan en gran parte en la identificación de los llamados genes de la muerte. Las especies reactivas pueden regular la muerte celular interactuando con la caspasa e induciendo la liberación de COX de la mitocondria, la fragmentación del ADN y la activación de la cinasa de proteínas activada por mitógenos, las cuales participan



de múltiples procesos celulares al activar cascadas de señalización intracelular que pueden terminar por inducir apoptosis [109] [110]. La apoptosis puede ser diferenciada de otra forma de muerte celular, la necrosis, que puede ocurrir en respuesta a daños por toxinas, estímulos físicos o isquemia. El hinchamiento de la célula y el rompimiento de la membrana son dos de las características determinantes de la necrosis, donde la cromatina nuclear sufre un proceso de lisis, no de condensación. Con frecuencia los tejidos necróticos involucran vigorosos procesos inflamatorios. En contraste, los daños a la membrana ocurren tardíamente en el proceso de apoptosis y las células muertas son endocitadas por células vecinas o por fagocitos (**Figura 1. 20**). La morfología apoptótica característica puede ser observada en diversas situaciones, por ejemplo, la regulación homeostática de poblaciones celulares y el envejecimiento. El estrés metabólico inducido por defectos genéticos específicos conlleva también a una muerte celular con las características típicas de la morfología apoptótica. Sin embargo, la clásica descripción del fenotipo apoptótico no necesariamente se aplica a todas las circunstancias durante las cuales prevalece el proceso de apoptosis. En ciertas condiciones que involucran el estrés celular impuesto por toxinas, agentes físicos o por isquemia, las células pueden morir tanto por apoptosis como por necrosis [109]. El proceso de MCP puede ser dividido en tres etapas principales; iniciación, reclutamiento y ejecución. Una gran cantidad de estímulos pueden servir como activadores del proceso de muerte celular, incluyendo esencialmente todas las drogas usadas en quimioterapia; radiaciones gama y ultravioleta; citocinas, incluyendo al factor de necrosis tumoral (TNF), linfotóxina-a, linfotóxina-P, ligando Fas y factor de crecimiento transformante, hormonas esferoidales, tales como glucocorticoides y retinoides; células T citotóxicas; privación de factores de crecimiento; algunos tipos de virus; agentes oxidantes; y factores que alteran la homeostasis del ion Ca y la sobreexpresión de Bcl-2. Por décadas, la interrupción del transporte de electrones en la fosforilación oxidativa, ha sido reconocida como una característica temprana de la muerte celular. Estudios utilizan los cambios dinámicos de la molécula NADH como indicador de apoptosis y necrosis. La disrupción de la membrana mitocondrial es suficiente, por sí misma, para causar la muerte celular, ya sea vía apoptosis o necrosis y parece ser que a nivel post- mitocondrial, la activación de caspasas decide el modo de muerte celular. Después de la pérdida del gradiente mitocondrial y la liberación del COX (con interrupción de la transferencia de electrones entre los complejos II y IV de la cadena respiratoria) la mitocondria pierde su función antioxidante, provocando una catástrofe energética, culminando en la muerte celular. En general las especies reactivas pueden regular la muerte celular, interactuando con la caspasa e induciendo la liberación de COX de la mitocondria, la fragmentación del ADN y la activación de la cinasa de proteínas activada por mitógenos, las cuales participan de múltiples procesos celulares al activar cascadas de señalización intracelular que pueden terminar por inducir apoptosis. [111] [112] [113] La apoptosis no solo se produce durante el desarrollo normal de un organismo, sino también juega un papel importante en condiciones fisiopatológicas. Los efectos proapoptóticos parecen estar vinculados a las

condiciones fisiopatológicas, donde las altas concentraciones de  $\text{NO}\bullet$  son producidos por el óxido nítrico sintasa inducible, especialmente en los macrófagos. En contraste,  $\text{NO}\bullet$  también previene la inducción de apoptosis por diversos estímulos, por lo que el óxido nítrico se considera como un regulador de la apoptosis, con una gama de propiedades benéficas que justificarían su uso terapéutico en diversas patologías [114] [115]

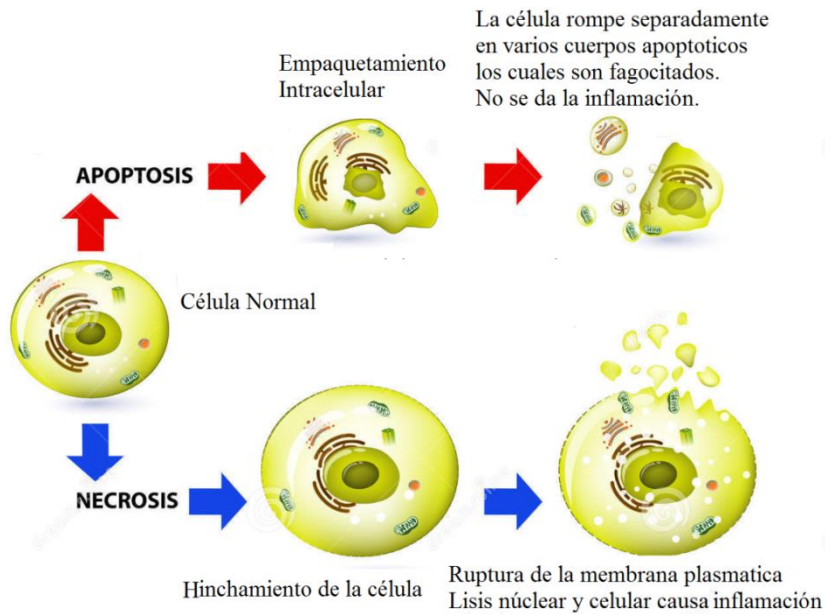


Figura 1. 20 Apoptosis y Necrosis [109]



## Capítulo 2

# Fluorescencia

### 2.1 Introducción

La fluorescencia es un tipo particular de luminiscencia, su importancia radica en la información que aporta sobre la estructura y dinámica a escala molecular del sistema que estemos estudiando [116]. Es un fenómeno conocido desde la antigüedad, aunque inicialmente descrito de forma científica por Georges Gabriel Stokes en 1852. Este científico británico comprobó cómo los cristales de fluorita, al ser iluminados con luz ultravioleta, emitían una intensa luz púrpura azulada. Stokes comprobó también que la luz emitida por el cristal presenta siempre una longitud de onda superior a la luz de iluminación. Este fenómeno, conocido como «Stokes shift» es una característica básica de la fluorescencia, formulada en la ley que lleva su nombre [117]. Luminiscencia es todo proceso de emisión de luz, en la que la emisión de radiación lumínica es provocada. En función del método de excitación que produce la emisión de luz, tendremos los siguientes procesos luminiscentes: Fotoluminiscencia la cual es una luminiscencia en la que la energía activadora es de origen electromagnético (rayos ultravioletas, rayos X). Los rayos X en particular producen una intensa luminiscencia. Radioluminiscencia: si el origen es una irradiación con rayos  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$ . Fue observada por primera vez por Pierre Curie y Marie Curie con el elemento radio. Además de la excitación por radiaciones ionizantes, la luminiscencia puede generarse también mediante una reacción química (quimioluminiscencia), energía mecánica (triboluminiscencia), energía eléctrica (electroluminiscencia) [118] [119] [120] [121]. Como método de análisis la luminiscencia, mide la radiación electromagnética que emana de la materia; su aplicación a la biomedicina se encuentra en la región del espectro electromagnético, entre el ultravioleta (UV) y el Infrarrojo Cercano (IRC), lo cual nos permite el análisis de los cambios bioquímicos y morfológicos de las células y tejidos en vivo y ex vivo, contribuyendo al diagnóstico médico de enfermedades como los pre-cánceres, presentado una alta sensibilidad y especificidad cuando es comparada con la histopatología de los tejidos [122] [123], para el análisis del metabolismo celular, bajo diferentes condiciones como prueba de fármacos [124] [121]. Aunque el término fluorescencia se ha formado a partir de las propiedades físicas del flúor, otros elementos pueden tener esta propiedad, su sensibilidad inherente es, con frecuencia, de uno a tres órdenes de magnitud mejor que las de espectroscopia de absorción, no obstante, los métodos de fluorescencia se aplican mucho menos que los



métodos de absorción debido al número relativamente limitado de sistemas químicos que se pueden hacer fluorescer [125] [116]. En el mecanismo de fluorescencia, una sustancia absorbe un fotón de alta energía, sufre una excitación electrónica y algunos de sus electrones son promovidos a orbitales moleculares de mayor energía, luego estos electrones excitados decaen nuevamente a orbitales de menor energía emitiendo luz de longitud de onda más larga, en el proceso parte de la energía de excitación se puede perder de dos maneras radiativa (calor) o no radiativa, por lo que cuatro aspectos a considerar son esenciales al aplicar técnicas de fluorescencia [116] [1]:

1) La longitud de onda de excitación:

Esta es deseablemente elegida, de acuerdo a los máximos picos de absorción de la sustancia en cuestión, logrando con ello la máxima excitación de los electrones y por tanto una máxima intensidad fluorescente. Una mala elección de esta puede derivar en una pobre o nula intensidad fluorescente.

2) La energía de excitación es mayor que la emisión fluorescente:

Como se mencionó existen pérdidas de energía durante el proceso de fluorescencia, pudiendo ser radiativas o no radiativas. En el estado electrónico excitado las moléculas rápidamente se relajan al más bajo nivel vibracional (regla de Kasha), y desde ahí pueden decaer al más bajo estado electrónico mediante la emisión de un fotón.

3) La longitud de onda de emisión de luz es más larga que la de excitación.

Como consecuencia de la relajación vibracional de los electrones excitados, la banda fluorescente para una transición electrónica dada se desplaza hacia frecuencias menores o longitudes mayores respecto a la banda de absorción.

4) la fluorescencia proviene del mecanismo de emisión espontánea del átomo o molécula y su distribución de frecuencia, intensidad y duración temporal depende de las propiedades de la materia

Mediante espectros de emisión de fluorescencia es posible realizar análisis cualitativos y cuantitativos de la estructura molecular de sustancias fluorescentes. En física, un espectro puede definirse, como una representación gráfica de la distribución de intensidad de la

radiación electromagnética, emitida o absorbida por una muestra de sustancia, en función de la longitud de onda (o frecuencia) de dicha radiación, sus aplicaciones en física, química, astronomía, medicina, industria, etc., han mostrado ser una poderosa herramienta de análisis de los materiales y sustancias [126] [127].

## 2.2 Luminiscencia, interacción de la radiación electromagnética

La luz visible, las ondas de radio, el calor, los rayos ultravioleta e infrarrojos, o los rayos X son formas de energía electromagnética (Figura 2. 1), las cuales radian de acuerdo a la teoría básica de ondas o Teoría ondulatoria, que describe como la energía electromagnética viaja con forma sinusoidal a la velocidad de la luz, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$c=v\lambda$$

Donde  $c$  es un constante,  $3 \times 10^8$  m/s,  $v$  es la frecuencia y  $\lambda$  la longitud de onda.

Siendo una combinación de ondas eléctricas con magnéticas la radiación electromagnética se puede propagar en el vacío, a diferencia de otros tipos de onda, como el sonido, que necesitan un medio material para propagarse [116].

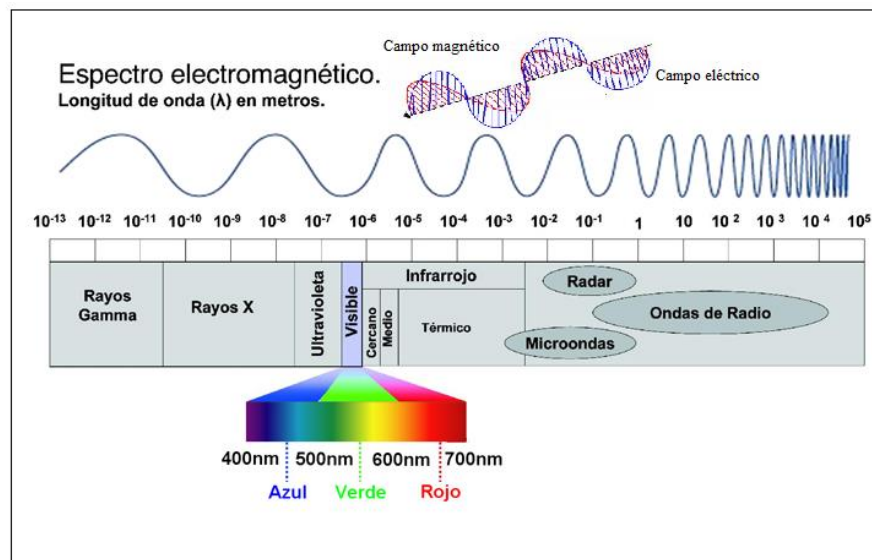


Figura 2. 1 Representación del espectro electromagnético en función de la longitud de onda en metros y nanómetros [128].



Debido a los mecanismos de interacción de la radiación electromagnética con la materia, se han derivado métodos ópticos para el análisis de materiales, métodos espectroscópicos, donde la medida de la intensidad y la longitud de onda de la energía radiante, indican la presencia de transiciones energéticas en la materia analizada. El modo de propagación de una onda electromagnética en el ambiente que se propaga, depende de constantes ópticas como el índice de refracción ( $n$ ) y la constante dieléctrica ( $k$ ); las cuales a su vez dependen de las constantes del material con el que interaccionan, como permitividad ( $\epsilon$ ), permeabilidad ( $\mu$ ) y conductividad ( $\sigma$ ), que pueden variar en un intervalo de frecuencias. Al aplicar un campo electromagnético a un material este absorbe o emite radiación electromagnética produciéndose una transferencia de energía al medio absorbente o procedente de este; para entender el concepto físico que ocurre en estos fenómenos se debe tratar la radiación electromagnética, no como onda sino como un flujo de partículas discretas (fotones o cuantos de energía) [116] [129]. Aunque muchas características de la radiación electromagnética se describen fácilmente con la teoría ondulatoria, no podemos olvidar la naturaleza corpuscular de la radiación descrita por la teoría cuántica. Esta teoría establece que la radiación está compuesta de muchos elementos discretos denominados cuantos o fotones. En física moderna, el fotón es la partícula elemental responsable de las manifestaciones cuánticas del fenómeno electromagnético. Es la partícula portadora de todas las formas de radiación electromagnética, incluyendo a los rayos gamma, los rayos X, la luz ultravioleta, la luz visible, la luz infrarroja, las microondas, y las ondas de radio. El fotón tiene una masa invariante cero, y viaja en el vacío con una velocidad constante  $c$ . Como todos los cuantos, el fotón presenta tanto propiedades corpusculares como ondulatorias. Se comporta como una onda en fenómenos como la refracción que tiene lugar en una lente, o en la cancelación por interferencia destructiva de ondas reflejadas; sin embargo, se comporta como una partícula cuando interacciona con la materia para transferir una cantidad fija de energía, que viene dada por la expresión.

$$E=h\nu=hc/\lambda$$

Donde  $h$  es la constante de Planck,  $\nu$  es la frecuencia,  $c$  es la velocidad de la luz y  $\lambda$  es la longitud de onda. Este principio es una de las leyes fundamentales de la física y se aplica a todos los procesos radiativos que involucran partículas cargadas y campos electromagnéticos; es así, como las interacciones electromagnéticas se pueden considerar como el resultado de un intercambio de fotones entre las partículas cargadas interactuantes, las cuales se pueden visualizar a través de un espectro característico [116] [130]. Un espectro depende en principio, de la separación entre los niveles de energía; ahora bien, un sistema molecular, puede tener diferentes tipos de energía, como la energía de rotación, asociada al movimiento de giro o rotación de las moléculas; energía de vibración, debida a las oscilaciones periódicas o vibraciones de los átomos alrededor de sus posiciones de equilibrio; energía electrónica, que depende de las posiciones medias de los electrones respecto de los núcleos, etc. Los diferentes tipos de energía de los sistemas atómicos o moleculares son de orden de magnitud bastante diferente, por lo que las transiciones entre





Los correspondientes niveles de energía, dan lugar a la emisión o absorción de radiación en distintas zonas de frecuencia. Por esto, se pueden distinguir distintos tipos de espectros, según los niveles de energía que intervienen y las técnicas experimentales utilizadas para su observación [131]. La luminiscencia se define como la emisión de fotones a partir de estados excitados de moléculas. La fluorescencia surge debido a transiciones radiativas entre estados singuletes de una molécula, a diferencia de la fosforescencia que es causada por transiciones radiativas entre estados triplete y singulete [116]. La mecánica cuántica nos dice que la luz puede comportarse al mismo tiempo como una partícula o una onda. En 1926 Erwin Schrödinger formula la llamada ecuación de onda de Schrödinger la cual describe la forma en que se propagan las ondas de materia. Una ecuación, cuyo aspecto general era similar a la ecuación de onda de la física clásica, que permitía describir el comportamiento y la energía de las partículas submicroscópicas, función que incorpora tanto el carácter de partícula (en función de la masa) como el carácter de onda en términos de una función de onda  $\Psi$ , donde, el valor de la función de onda al cuadrado ( $\Psi^2$ ) representa la distribución de probabilidad de encontrar al electrón en cierta región del espacio, también denominado densidad electrónica. Así la ecuación que describe una partícula de masa  $m$  que se mueve en una dimensión está definida por la ecuación:

$$-\frac{\hbar^2}{8\pi^2m} \frac{\partial^2\Psi(x,t)}{\partial x^2} + V(x,t)\Psi(x,t) = i\frac{\hbar}{2\pi} \frac{\partial\Psi(x,t)}{\partial t}$$

En esta ecuación,  $\Psi(x, t)$  es la función de onda y depende del espacio, representado por la variable  $x$ , y por el tiempo, representado por la variable  $t$ , de la misma manera  $V(x,t)$  representa la energía potencial. A diferencia de la ecuación de onda de la Física Clásica, en la ecuación anterior aparece el número imaginario  $i$ , por lo que las soluciones que satisfacen a esta ecuación no pertenecen necesariamente a los reales [132]. En este modelo aparece el concepto de orbital (región del espacio en la que hay una alta probabilidad de encontrar al electrón). No debe confundirse el concepto de orbital con el de órbita, que corresponde al modelo de Bohr: una órbita es una trayectoria perfectamente definida que sigue el electrón, y por tanto es un concepto muy alejado de la mecánica probabilística [133]. El modelo de Bohr (**Figura 2. 2A**) utiliza órbitas definidas, el modelo de Schrödinger habla de distribuciones probables para un electrón con cierto nivel de energía, así para el electrón del átomo de hidrógeno en el estado fundamental la probabilidad de la distribución se refleja en la (**Figura 2. 2B**), donde la intensidad del color rojo indica una mayor probabilidad de encontrar al electrón en esa región, o lo que es lo mismo una mayor densidad electrónica.

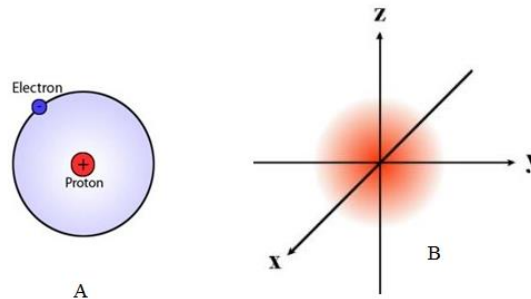


Figura 2. 2 A) Representación del modelo de Bohr y B) representa la distribución de probabilidad de encontrar al electrón en cierta región del espacio, del átomo de hidrogeno [134].

El modelo de Bohr es un modelo unidimensional que utiliza un número cuántico ( $n$ ) para describir la distribución de electrones en el átomo. El modelo de Schrödinger permite que el electrón ocupe un espacio tridimensional. Por lo tanto requiere tres números cuánticos para describir los orbitales en los que se puede encontrar al electrón. La descripción del átomo mediante la mecánica ondulatoria está basada en el cálculo de las soluciones de la ecuación de Schrödinger, la siguiente es una ecuación diferencial independiente del tiempo que permite obtener los números cuánticos de los electrones. Donde  $E$  es el valor de la energía total del electrón,  $V$  representa la energía potencial del electrón un punto  $(x, y, z)$ , por tanto,  $E - V$  es el valor de la energía cinética cuando el electrón está en el punto  $(x, y, z)$  [135] [136]

$$\frac{\partial^2 \Psi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \Psi}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 \Psi}{\partial z^2} + \frac{8\pi^2 m}{h^2} (E - V) \Psi$$

Mientras que el modelo de Bohr utilizaba un número cuántico ( $n$ ) para definir una órbita, el modelo de Schrödinger utiliza tres números cuánticos para describir un orbital:  $n$ ,  $l$  y  $m_l$ , sin embargo, como la teoría cuántica necesitaba explicar algunas propiedades de los espectros atómicos, añadieron un número cuántico adicional, el número cuántico espín “ $s$ ” que proporciona una medida del momento angular intrínseco de toda partícula. El principio de exclusión de Pauli postula que en un átomo no puede haber 2 electrones con los 4 números cuánticos iguales (Recordar: Cada orbital está determinado por los números cuánticos principal ( $n$ ), azimutal ( $l$ ) y magnético ( $m$ ), como el electrón, además, tiene dos posibles valores del número cuántico de espín ( $s$ ), en cada orbital pueden colocarse dos electrones, uno con espín  $+\frac{1}{2}$  y otro con espín  $-\frac{1}{2}$ ) [135]. El estado cuántico de un electrón está determinado por sus números cuánticos [132] [133] [135] [136]:

- 1) Número cuántico principal ( $n$ ): Representa al nivel de energía (estado estacionario de Bohr) y su valor es un número entero positivo (1, 2, 3, 4, etc) y se le asocia a la idea física del volumen del orbital (**Figura 2. 3**). Dicho de otra manera el número cuántico principal determina el tamaño de las órbitas, por tanto, la distancia al núcleo de un electrón vendrá determinada por este número cuántico. Todas las órbitas con el mismo número cuántico principal forman una capa. Su valor puede ser cualquier número natural mayor que 0 (1, 2, 3...) y dependiendo de su valor, cada capa recibe como designación una letra. Si el número cuántico principal es 1, la capa se denomina K, si 2 L, si 3 M, si 4 N, si 5 P, etc.



Figura 2. 3 Número cuántico principal ( $n$ ) [134].

- 2) El entero " $l$ ", número cuántico azimutal: " $l$ ", describe el momento angular orbital del átomo, depende de " $n$ " y toma valores enteros de 0 a ( $n-1$ ). Así para  $n=1$  sólo hay un valor posible "0". Para  $n=2$  hay dos valores de " $l$ ": 0 y 1. Para  $n=3$  hay tres valores posibles: 0, 1 y 2. Así el número cuántico secundario o azimutal ( $l = 0, 1, 2, 3, 4, 5, \dots, n-1$ ), indica la forma de los orbitales y el subnivel de energía en el que se encuentra el electrón. Generalmente el valor de " $l$ " se representa por una letra en vez de por su valor numérico (**Figura 2. 4**):

$l = 0$ : Subórbita "s" (forma circular)  $\rightarrow$ s proviene de sharp (nítido) (\*)

$l = 1$ : Subórbita "p" (forma semicircular achatada)  $\rightarrow$ p proviene de principal (\*)

$l = 2$ : Subórbita "d" (forma lobular, con anillo nodal)  $\rightarrow$ d proviene de diffuse (difuso) (\*)

$l = 3$ : Subórbita "f" (lobulares con nodos radiales)  $\rightarrow$  proviene de fundamental

$l = 4$ : Subórbita "g" (\*);

$l = 5$ : Subórbita "h" (\*); etc.

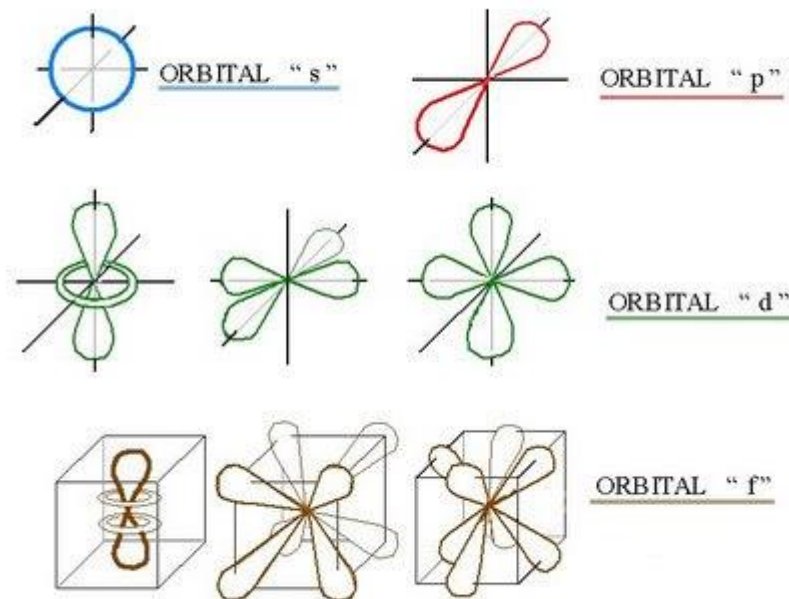


Figura 2. 4 El Número cuántico azimutal "l", describe el momento angular orbital [137].

- 3) El entero  $m_l$ , número cuántico magnético, describe la componente z del momento angular  $M_z$ , con valores permitidos ( $m = -l, \dots, 0, \dots, l$ ). Para cada valor de  $l$  hay  $2l+1$  valores de  $m$ . Veamos los diferentes orbitales que podemos tener para  $n=3$ . Tendremos entonces tres valores de  $l$ : 0, 1 y 2. Los valores de  $m_l$  para el valor de  $l=2$  serían -2, -1, 0, 1, 2. En el tercer subnivel tenemos 5 orbitales atómicos (para  $n=3$ ;  $l=2$ ;  $m_l=-2, -1, 0, 1, 2$ ) con diferentes orientaciones en el espacio tal y como vemos en la (Figura 2. 5).

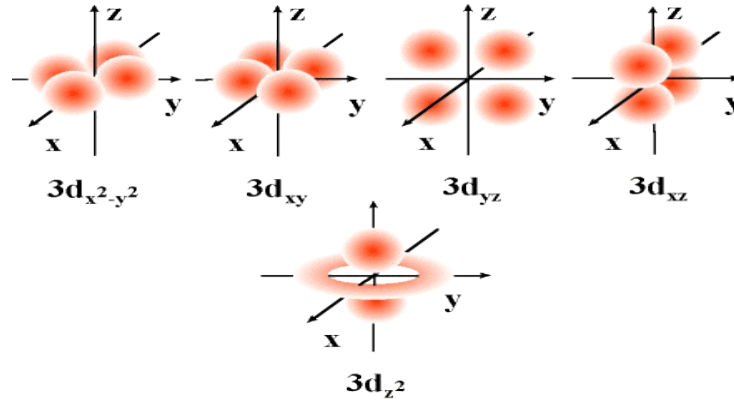


Figura 2. 5 Orientación espacial para un nivel cuántico principal  $n=3$  [138].

- 4) El número cuántico de espín  $s$ , indica la proyección del momento angular orbital el sentido de giro que produce el electrón al girar sobre su eje toma valores  $\frac{1}{2}$  y  $-\frac{1}{2}$  (Figura 2. 6).

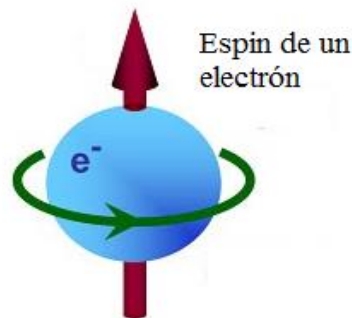


Figura 2. 6 Espín de un electrón [139].

El principio básico de la fluorescencia y fosforescencia puede ser entendido en términos del estado electrónico de una molécula, el cual está referido a las propiedades de todos los electrones en todos sus orbitales. La forma en que una molécula absorbe radiación electromagnética es por medio de un proceso mecánico cuántico, donde una molécula es transformada de un estado basal a un estado excitado. Cuando un electrón en una molécula es movido de un orbital a otro, cambia el estado de la molécula y entonces es importante considerar los estados de la molécula involucrados en lugar de considerar solamente los orbitales involucrados en la promoción del electrón. Una molécula en un estado excitado es mejor referida como una nueva entidad, solo remotamente relacionada a

la misma molécula en estado basal. Un estado excitado tendrá una distribución electrónica completamente diferente del estado basal, una nueva geometría, y más que eso, podrá reaccionar químicamente de forma diferente del estado basal, que es el estado normal o de menor energía. Existe sólo un estado basal para una molécula dada. Sin embargo, hay diversos estados excitados posibles aún para moléculas muy simples. Los estados electrónicos de las moléculas, se pueden agrupar en dos grandes categorías, estados singulete y triplete [116].

### 2.3 Estados singulete y triplete

El estado energético fundamental de cualquier molécula corresponde a su configuración o distribución electrónica de menor energía. Los estados electrónicamente excitados de las moléculas se forman cuando éstas absorben energía, normalmente en forma de luz (**Figura 2. 7**). En ellos, las moléculas tienen configuraciones electrónicas diferentes y más energéticas que la del estado fundamental.

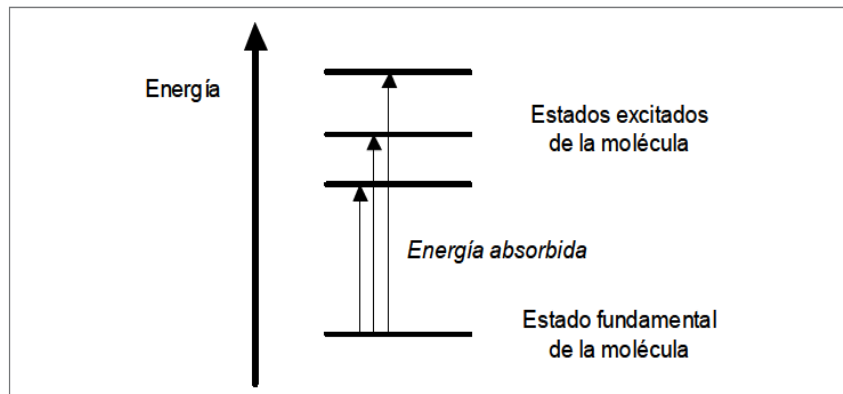


Figura 2. 7 Estado fundamental y excitado de una molécula [116].

Los estados excitados o activados, a diferencia del estado fundamental, presentan configuraciones electrónicas que tienen una duración limitada, por lo que tienden a regresar a la configuración de mínima energía del estado fundamental pasado un corto lapso de tiempo. Este periodo, que puede tener una duración comprendida entre los picosegundos ( $10^{-12}$  s) y los milisegundos ( $10^{-3}$  s), está caracterizado por el tiempo de vida media (o simplemente tiempos de vida) ( $\tau$ ), tiempo requerido para que el número de moléculas excitadas caiga a una fracción de su valor original. El tiempo de vida media es característico de cada estado excitado y del medio que circunda a las moléculas. Una molécula presenta un estado energético de carácter singulete cuando sus dos electrones más externos se encuentran apareados, es decir, cuando tienen números cuánticos de espín

opuesto o antiparalelo. Por otro lado, una molécula presenta un estado energético de carácter triplete cuando sus dos electrones más externos se encuentran desapareados o paralelos, esto es, cuando tienen números cuánticos de espín iguales. Típicamente, el estado fundamental de la mayoría de las moléculas suele tener carácter singlete ( $S_0$ ), mientras que los estados excitados de cualquier molécula pueden tener carácter singlete ( $S_1$ ) o triplete ( $T_1$ ), como muestra la (**Figura 2. 8**) [116] [140] [141].

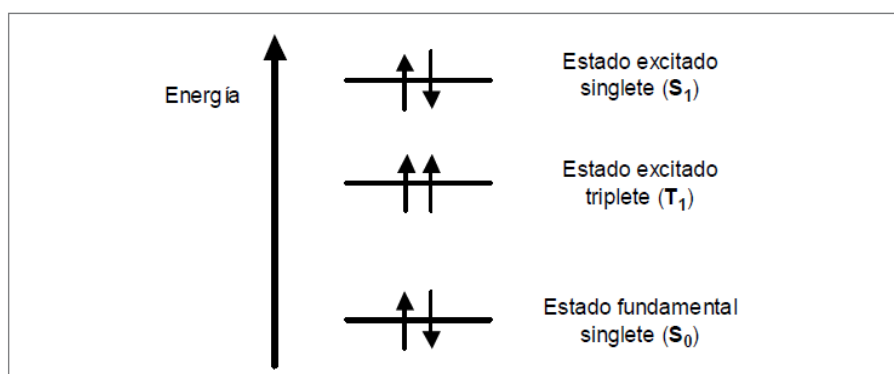


Figura 2. 8 Estado fundamental singlete ( $S_0$ ) de una molécula y estados excitados singlete ( $S_1$ ) y triplete ( $T_1$ ). Los símbolos ( $\uparrow\downarrow$ ) y ( $\uparrow\uparrow$ ) representan pares de electrones con espín antiparalelo y paralelo, respectivamente.

Un estado excitado singlete es de mayor energía que su correspondiente estado excitado triplete debido a la energía de apareamiento electrónico necesaria para que los dos electrones más externos tengan espines antiparalelos. Importante es el hecho que una transición singlete/triplete (o viceversa), que también implica un cambio en el estado electrónico, es significativamente menos probable que la correspondiente transición singlete/singlete. Como consecuencia, el tiempo de vida medio de un estado triplete a singlete puede oscilar desde  $10^{-4}$  a varios segundos (fenómeno de fosforescencia), mientras que el tiempo de vida es de  $10^{-5}$  a  $10^{-8}$  segundos para un estado singlete a singlete (fenómeno de fluorescencia). [116] [140] [141]

## 2.4 Diagrama de Jablonski, corrimiento de Stokes, regla de Kasha.

La forma gráfica de ilustrar los procesos de la fluorescencia que ocurren entre la absorción y la posterior emisión de luz, es mediante el diagrama de Jablonski. La (**Figura 2. 10**) ilustra un diagrama de Jablonski típico, en donde los estados electrónicos base, primero y segundo están señalados por  $S_0$ ,  $S_1$  y  $S_2$ , respectivamente. En el diagrama la energía crece en estado ascendente, en cada uno de estos niveles de energía los fluoróforos pueden existir en algún estado vibracional indicados por 0, 1 y 2, etc. Las transiciones entre estados están indicadas con líneas verticales a propósito de indicar la naturaleza instantánea

de la absorción de la luz. La razón es que las transiciones entre estados ocurren durante un tiempo aproximado de  $10^{-15}$  s. Después de que la luz es absorbida el fluoróforo usualmente es excitado a un estado vibracional superior ya sea de  $S_1$  o  $S_2$ . La magnitud del salto del electrón excitado corresponde a la energía del fotón absorbido. Normalmente, las moléculas en fases condensadas se relajan rápidamente hacia el nivel vibracional inferior de  $S_1$ . Tal proceso es conocido como conversión interna y ocurre en un intervalo temporal cercano a los  $10^{-11}$  s o menos. Debido a que los tiempos de fluorescencia son del orden de  $10^{-9}$  s la conversión interna termina antes de la emisión. La emisión de fluorescencia se produce a partir del estado de energía vibracional más bajo de  $S_1$ . En el diagrama de Jablonski (Figura 2. 10), se observa que la energía de emisión es inferior a la de la absorción debido a las pérdidas de energía por relajaciones vibracionales, conversiones internas y otros mecanismos. Esto por lo tanto implica que la longitud de onda de fluorescencia se produzca en una mayor longitud de onda que la de absorción, a lo cual se le conoce como **corrimiento de Stokes**. Otra propiedad de la fluorescencia es que el espectro de emisión de fluorescencia es independiente de la longitud de onda de excitación. Esto se conoce como la **regla de Kasha** (Figura 2. 9) [125] [116] [142] [143] [144].

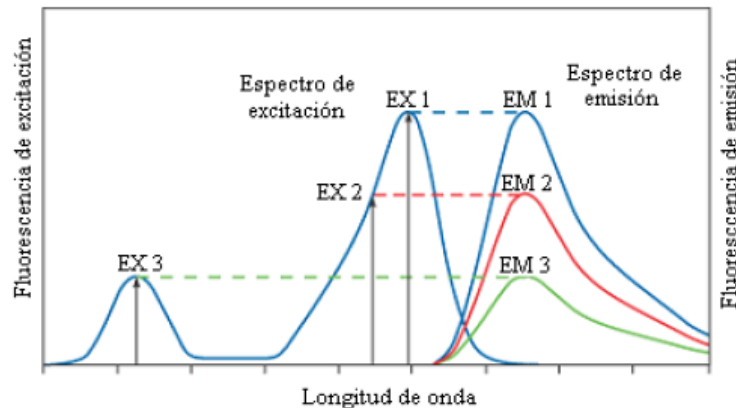


Figura 2. 9 Mecanismos de excitación y emisión de la fluorescencia [144]

## 2.5 Modos de disipación del estado excitado y rendimiento cuántico.

La radiación fluorescente es radiación espontáneamente emitida en contraposición a la emisión estimulada. Se rige por una constante de velocidad  $k_F$

$$k_F = A_{ba} = 1 / \Gamma_F$$

Donde  $\Gamma_F$  se llama el tiempo de vida radiativo del estado electrónico excitado  $b$  de la molécula. “ $A_{ba}$ ” es el coeficiente de Einstein de la transición espontánea de un estado  $b$  a un



estado  $a$  ver (**Figura 2. 10**), el cual es el más bajo estado basal.  $A_{ba}$  puede ser evaluado en términos de la frecuencia de la luz incidente y la intensidad del momento eléctrico dipolar correspondiente a los estados  $a$  y  $b$  [145]. La molécula puede también ir del estado excitado a un más bajo estado por varios mecanismos que no involucran emisión de radiación. Por ejemplo la energía puede ser perdida a través de colisiones con las moléculas solventes o por la vibración de las moléculas. La contribución a la vida útil de estos procesos no radiativos pueden ser caracterizados por un rendimiento cuántico de fluorescencia. Estos procesos implicados son [144] :1) La conversión interna  $i_c$ : donde la energía del estado excitado se pierde a través de colisiones con moléculas externas o se disipan a través de modos de vibración; 2) Cruce entre sistemas  $isc$ : donde la energía se pierde por la conversión del estado singlete excitado al estado triplete excitado; 3) Procesos quenching  $q$ : donde las colisiones o formación de complejos con especies capaces de extinguir el estado excitado, tales como el  $O_2$  molecular, ocurren. Sus respectivas tasas:  $k_{ic}$ ,  $k_{isc}$  y  $k_q(Q)$ ; 2 de ellas representadas en la (**Figura 2. 10**). Donde el rendimiento cuantico  $Q_0$  estara dado por la expresión:

$$Q_0 = \frac{k_F}{[k_F + k_{ic} + k_{isc} + k_q(Q)]}$$

Diagrama de Jablonski

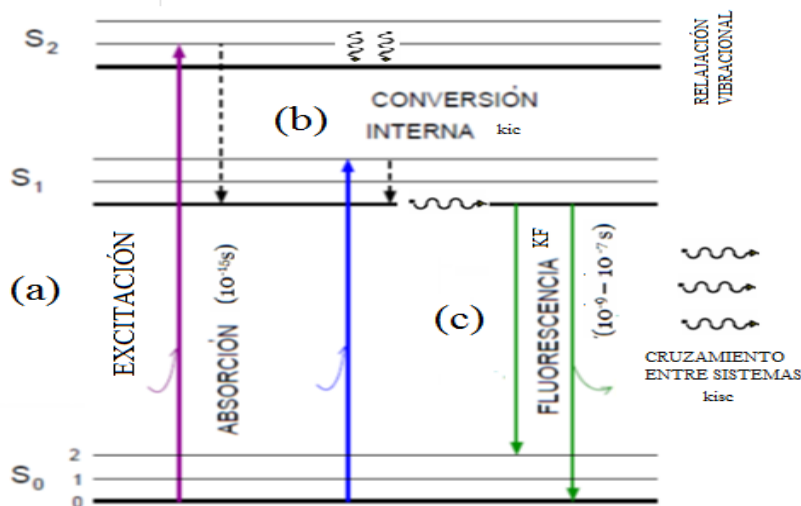


Figura 2. 10 Diagrama de energía de Jablonski, representando los niveles de energía electrónicos en una molécula, la estructura, y sus posibles transiciones: a) Transiciones del estado base al estado excitado, b) Pérdida de energía no radiativa, c) Transición radiativa a un estado más bajo. Modificado de [116].



Los cromóforos o grupos en moléculas biológicas como proteínas y ácidos nucleicos tienen una baja relación de rendimiento cuántico y muy corto tiempo de vida de radiación. Por ejemplo, la más intensa absorción del grupo de proteínas, la presenta el triptófano; cuya absorción máxima es en 280 nm, mientras que su emisión de fluorescencia máxima se da en 348 nm, ello tiene  $Q_0 = 0.20$  y  $\tau_F = 2.6$  ns. El rendimiento cuántico puede variar apreciablemente de 30 a 90 %. [146] Una forma más sencilla de definir el rendimiento cuántico de fluorescencia es decir simplemente que este se refiere a la relación entre el número de fotones emitidos ( $\gamma_e$ ) con el número de fotones absorbidos ( $\gamma_a$ ).

$$Q_0 = \frac{\gamma_e}{\gamma_a}$$

El rendimiento cuántico de fluorescencia máximo es de 1.0; cada fotón absorbido resulta en un fotón emitido (100%). Los compuestos con rendimientos cuánticos de 0.10 todavía se consideran muy fluorescentes. El tiempo de vida de la molécula fluorescente en ausencia de procesos no radiativos es llamado el tiempo de vida intrínseco  $\tau_0$ , cuando  $\gamma = \gamma_a = \gamma_e$ , y está dado por [116]:

$$\tau_0 = 1/\gamma$$

## 2.6 Relación entre la IF y la concentración de la muestra

La intensidad de la radiación fluorescente IF es proporcional a la intensidad radiante del haz de excitación que es absorbido por el sistema, ver (**Figura 2. 11, Figura 2. 22**).

$$IF = Q_0 (I_0 - I)$$

Donde  $I_0$  es la intensidad del haz incidente sobre la disolución,  $I$  es su intensidad después de atravesar la longitud  $b$  del medio, El rendimiento  $Q_0$  depende de la eficiencia cuántica del proceso de fluorescencia. Por otro lado la relación de Lambert-Beer describe la correlación entre el comportamiento de absorción  $A$  de una sustancia, así como la concentración y el espesor de la capa de esta sustancia en la solución.

Esta relación se expresa de la siguiente manera:

$$A = \epsilon b ct$$

Donde el término  $\epsilon$  se llama coeficiente de extinción molar o absorptividad molar, el cual depende de la longitud de onda de medición, por tanto su valor se escribe  $\epsilon(\lambda, \text{nm})$ , por ejemplo el coeficiente de absorptividad medido a 235 nm se escribe  $\epsilon_{235}$ . El siguiente término  $b$  es la longitud de la trayectoria que realiza la luz medida en cm y  $ct$  es la concentración del analito. La ley de Lambert-Beer se cumple solamente para soluciones diluidas, ya que para valores de concentración altos, el coeficiente  $\epsilon$  varía, debido a fenómenos de dispersión de la luz, agregación de moléculas, cambios del medio, etc [116].

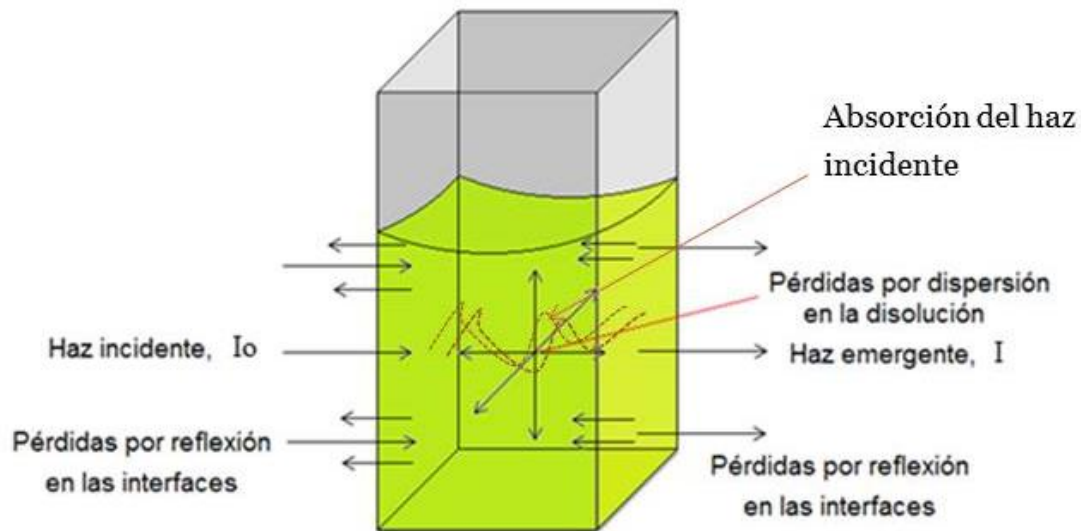


Figura 2. 11 Fenómenos ópticos que suceden en el interior de una celda con una solución en su interior [147]

Con objeto de relacionar el rendimiento cuántico  $Q_0$  con la concentración  $ct$  escribimos la ley de Beer de la siguiente manera [135]:

$$\frac{I}{I_0} = 10^{-\epsilon bct}$$

Sustituyendo en :

$$IF = Q_0 (I_0 - I)$$

Queda:

$$IF = Q_0 I_0 (1 - 10^{-\epsilon b c t})$$

Si desarrollamos el término exponencial como una serie de Maclaurin:

$$IF = Q_0 I_0 \left[ 2.303 \epsilon b c t - \frac{(2.303 \epsilon b c t)^2}{2!} + \frac{(2.303 \epsilon b c t)^3}{3!} \right]$$

Cuando el término  $\epsilon b c$  sea menor que aproximadamente 0.05, todos los términos de la Ecuación, excepto el primero, son muy pequeños, y la expresión se reduce a:

$$IF = Q_0 I_0 2.303 \epsilon b c t$$

y si ( $I_0$ ) se mantiene constante:

$$IF = k_{ct}$$

donde  $k$  es una constante. Así, para disoluciones muy diluidas, la IF será directamente proporcional a la concentración. Cuando la concentración  $c_t$  es suficientemente elevada como para que la absorbancia multiplicada por 2.303 sea mayor que 0.05, los términos de mayor orden de la expresión anterior no son despreciables y la linealidad se pierde. A continuación se muestra una representación gráfica de la variación de la IF con la concentración  $c_t$  (Figura 2. 12). Si la concentración es tan grande que toda la radiación incidente es absorbida, se puede ver de:  $IF = Q_0 (I_0 - I)$ , que IF tiende al valor de:  $Q_0 I_0$  [125] [148].

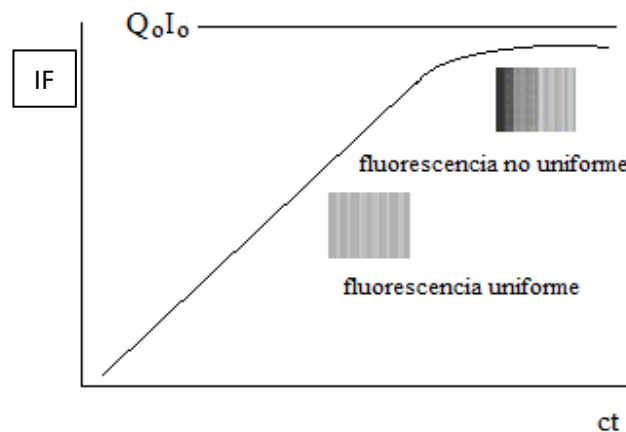




Figura 2. 12 La IF dependiente de la concentración donde  $Q_0$  es la eficiencia cuántica del proceso de fluorescencia, modificada de [149].

## 2.7 Propiedades del fenómeno de fluorescencia

A continuación se resumen las principales características del fenómeno de fluorescencia:

1. Debido al proceso de conversión interna y de acuerdo con la regla de Kasha, la posición en cuanto a longitud de onda, del espectro de fluorescencia no depende de la longitud de onda de excitación.
2. El espectro de fluorescencia se desplaza en dirección de longitud de onda mayor con respecto a la banda de absorción  $S_0 \rightarrow S_1$  (regla de Stokes) y es aproximadamente la imagen especular de esta banda.
3. El número de fotones emitidos  $\gamma_e$  por unidad de tiempo es proporcional al número de fotones absorbidos  $\gamma_a$  por unidad de tiempo y a la eficiencia cuántica  $Q_0$ .

$$\gamma_e \propto Q_0 \gamma_a$$

4. La intensidad de fluorescencia está definida por:

$$IF = I_0 (1 - 10^{-A}) Q_0$$

Donde  $I_0$  es la intensidad de la luz incidente,  $(A = \epsilon bct)$  es la absorbancia de la solución,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción de la molécula,  $(ct)$  es la concentración de la molécula,  $(b)$  la longitud de la trayectoria óptica,  $Q_0$  es la eficiencia cuántica de fluorescencia, definida como la razón del número de cuantos emitidos desde un estado excitado entre el número de cuantos absorbidos durante la transición al estado excitado por unidad de tiempo. Si la concentración es baja, entonces [146] :

$$IF = 2.303 \epsilon bct I_0 Q_0$$

## 2.8 Compuestos fluorescentes

La fluorescencia más intensa y la más útil es la que presentan los compuestos que contienen grupos funcionales aromáticos. Los compuestos que contienen estructuras alifáticas y alicíclicas de carbonilo o estructuras con dobles enlaces muy conjugados pueden presentar también fluorescencia. Una de las moléculas más comunes y populares que se encuentran en abundancia es la quinina, pudiendo encontrarse en agua tónica, además de ser el primer fluoroforo conocido desde 1845 y el cual propició el desarrollo del primer espectrofluorómetro hacia la década de 1950. En la vida diaria se encuentran otros compuestos fluoroforos. Algunos resplandeciendo en tonos verdosos tal como la fluoresceína que es una sustancia colorante orgánica hidrosoluble de color amarillo perteneciente al grupo de las xantinas que produce un color fluorescente verde intenso en soluciones alcalinas (con pH mayor a 7). Se usa terapéuticamente como una ayuda para el diagnóstico de las lesiones corneales y trauma corneal. Fluorescencia de tonos roji-naranjas la encontramos en la rodamina, ver (**Figura 2. 13**), los cuales podemos encontrarlos en el anticongelante para el radiador de los carro, El 1, 4-bis(5-feniloxazol- 2-il) benceno (POPOP), que es un agente de centelleo líquido usado en las mediciones radio isotópicas, la acridina naranja que es usualmente útil para pigmentar el DNA. La piridina 1 y la rodamina que se utilizan en láseres de colorante [116] [150].

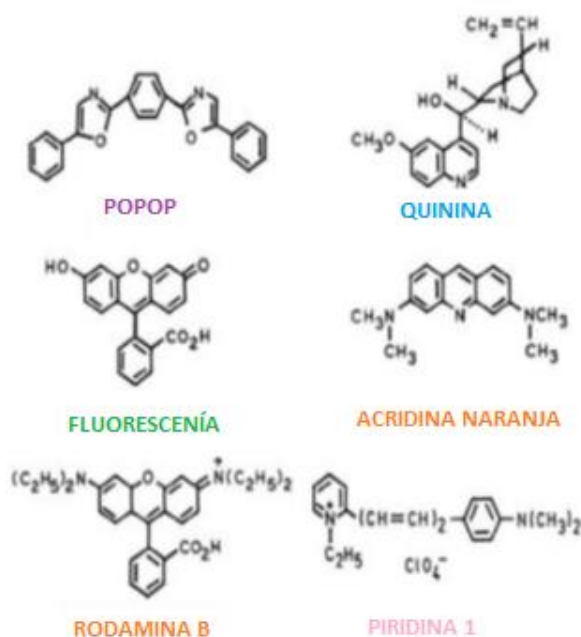


Figura 2. 13 Estructura química de sustancias fluorescentes. Estas cinco sustancias tienen una base de solvente y se preparan en el laboratorio para producir las soluciones resplandecientes [150].

## 2.8 Aplicaciones médicas de la espectroscopia de fluorescencia.

La espectroscopia de fluorescencia es uno de los métodos ampliamente usados para mediciones analíticas e investigación científica. Durante los últimos años varios artículos científicos han sido publicados en los cuales la espectroscopia de fluorescencia ha sido usada. En los laboratorios de investigación científica, la espectroscopia de fluorescencia está siendo aplicada para estudiar los procesos físicos fundamentales de moléculas; relaciones estructura-función. Interacciones de biomoléculas como proteínas y ácidos nucleicos, estructuras y actividad dentro de una célula. Así como detección y secuenciación de ADN [123]. Hoy día las técnicas de fluorescencia para el estudio de las características del tejido humano se han extendido y es posible su aplicación tanto in vivo como in situ, lo cual ha permitido que tenga un gran campo de aplicación en el diagnóstico y/o detección de cáncer. La biopsia óptica se refiere a la detección del estado cancerígeno de un tejido utilizando métodos ópticos no invasivos. El principio básico utilizado para el método de la biopsia óptica es que la emisión y el esparcimiento de la luz están fuertemente influenciados por la composición y estructura celular del tejido. La progresión de una enfermedad o cáncer causa un cambio en la composición y la estructura celular de los tejidos afectados, produciendo así un cambio en la emisión y dispersión de la luz. [151]

En la (Figura 2. 14) se puede observar un esquema representativo de la biopsia óptica.

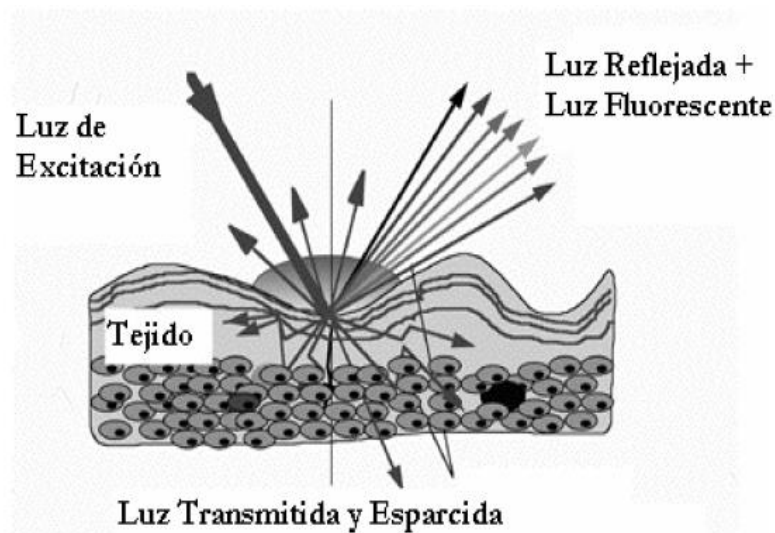


Figura 2. 14 Características ópticas del tejido [152].

Para la detección, la fluorescencia endógena (autofluorescencia) de un tejido es preferible a la fluorescencia exógena (fluorescencia por adición de colorantes). La fluorescencia endógena se deriva de una serie de fluoróforos que son componentes de un tejido o una célula. Ejemplos de fluoróforos en tejido humano son el triptófano, la elastina, el colágeno, el NADH y las flavinas. Los espectros de absorción y de fluorescencia de estas moléculas se pueden observar en la (Figura 2. 15, Figura 2. 16) respectivamente.

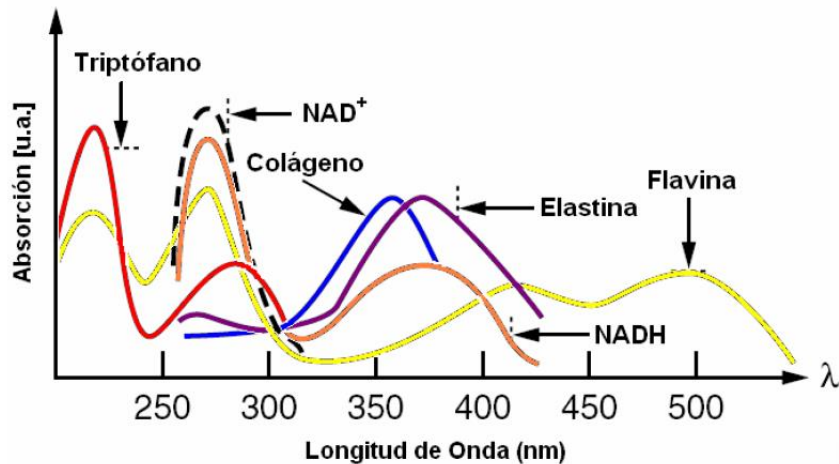


Figura 2. 15 Espectros de absorción de fluoróforos, presentes en los tejidos [153].

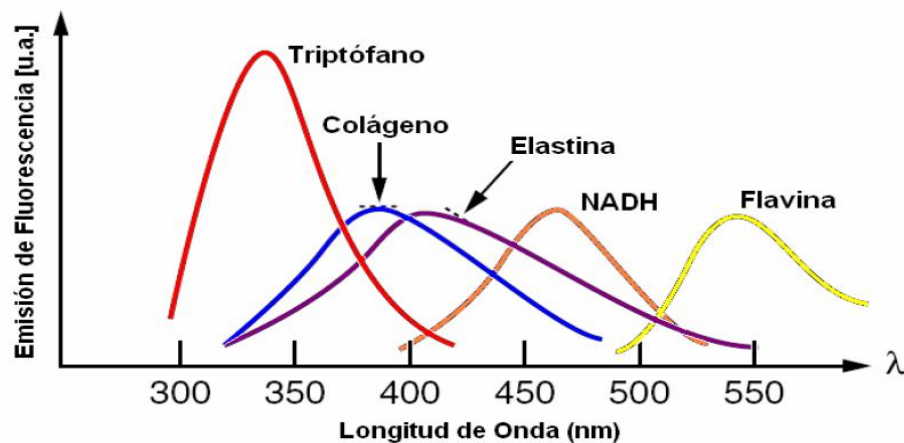


Figura 2. 16 Espectros de fluorescencia de fluoróforos, presentes en los tejidos [153].

La mayoría de las aplicaciones para el diagnóstico de cáncer, por medio de fluorescencia, ocurren hoy día a nivel de investigación y en los últimos años ha sido prolífica, principalmente en cánceres de tipo cervicouterino, colon, bronquios, vejiga,





esófago, boca, cerebro, cuello y laringe; siendo aún la biopsia junto con su análisis correspondiente, la regla de oro para establecer el diagnóstico final. [154] Dentro de los trabajos que hacen uso de la espectroscopia de fluorescencia, para la detección de cáncer podemos mencionar los siguientes:

1) Nirmala Ramanujam y su equipo de trabajo desarrollaron un espectrofluorómetro portátil. El cual está basado en espectroscopia de fluorescencia inducida por láser. El equipo consta de dos láseres de nitrógeno, una fibra óptica, un policromador y un arreglo de detectores. Los cuales permitieron obtener los espectros de fluorescencia de 95 pacientes con cáncer cervical a tres longitudes de onda distintas (337, 380 y 460 nm). Para el análisis de los espectros in vivo se utilizaron las técnicas de análisis multivariante, mediante las cuales se obtuvo la información característica del tejido. Dicha información fue la base para realizar una discriminación entre SIL (Lesiones Escamosas Intraepiteliales) y no SIL. Con una sensibilidad del 82 %  $\pm$  1.4% y una especificidad del 68 % [155].

2) En el instituto de electrónica y la academia de ciencias en Sofía, Bulgaria, Blizkanova y su grupo de trabajo realizaron un estudio para conocer las propiedades de la fluorescencia en la piel, utilizaron como fuente de excitación un láser en nitrógeno (337 nm) y cuatro diodos de luz ultravioleta con una emisión en 365, 375, 385 y 400 nm. En el estudio encontraron que las intensidades de los espectros de fluorescencia, dependen del fototipo de la piel así como de la longitud de onda de excitación. Encontrando también que los materiales que fluorescen a esas longitudes de excitación son el colágeno, la elastina, el NADH y el FAD<sup>+</sup> [156].

3) En Alemania, W. Lohmann obtuvo espectros de fluorescencia de un grupo de 82 pacientes, 54 con células de nevos (una proliferación de distintos tipos de células en la piel, generalmente sebáceos) y 28 con melanoma (generalmente pequeños tumores pigmentados). Para la excitación utilizaron la línea de emisión de 366 nm de una lámpara de mercurio. Para el grupo de personas con melanoma encontraron un pico de emisión en 475 nm; las intensidades de fluorescencia fueron diferentes para cada paciente. El resultado principal obtenido, indica que el borde de los melanomas fluoresce con mayor intensidad en comparación con la piel sana y los nevos [157].

## 2.9 Fluorescencia de la molécula NADH

La nicotinamida adenina dinucleótido abreviado (NAD<sup>+</sup> en su forma oxidada y NADH en su forma reducida), son coenzima que se encuentra en todas las células vivas. El compuesto es un dinucleótido, ya que consta de dos nucleótidos unidos a través de sus grupos fosfato con un nucleótido que contiene un anillo adenosina y el otro que contiene

nicotinamida. En el metabolismo, el  $\text{NAD}^+$  participa en las reacciones redox (oxidorreducción), llevando los electrones de una reacción a otra. La coenzima, por tanto, se encuentra en dos formas en las células:  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADH}$  (**Figura 2. 17**). El  $\text{NAD}^+$ , que es un agente oxidante, acepta electrones de otras moléculas y pasa a ser reducido, formándose  $\text{NADH}$ , que puede ser utilizado entonces como agente reductor para donar electrones a la cadena respiratoria celular, precursora y necesaria para la formación de la molécula energética ATP [158] [159] . Formas reducidas  $\text{NADH}$  y  $\text{NADPH}$ , además de absorber luz en el cercano UV, son fluorescentes, mientras las formas oxidadas no lo son.  $\text{NADH}$  y  $\text{NADPH}$  tienen bandas de absorción idénticas, con el máximo en 340 nm,  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}$  no absorben a esta longitud de onda. De esta forma, los cambios en el estado de oxidación o reducción pueden ser medidos por espectroscopia de absorción y fluorescencia [159] (**Figura 2. 18**).

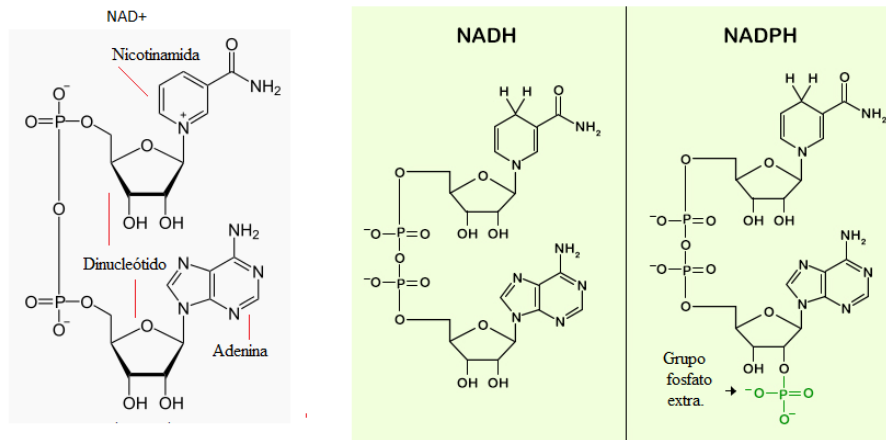


Figura 2. 17  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADH}$  y  $\text{NADPH}$  compuestos dinucleótidos, constan de dos nucleótidos unidos a través de sus grupos fosfato; con un nucleótido que contiene adenina y el otro que contiene nicotinamida [158].

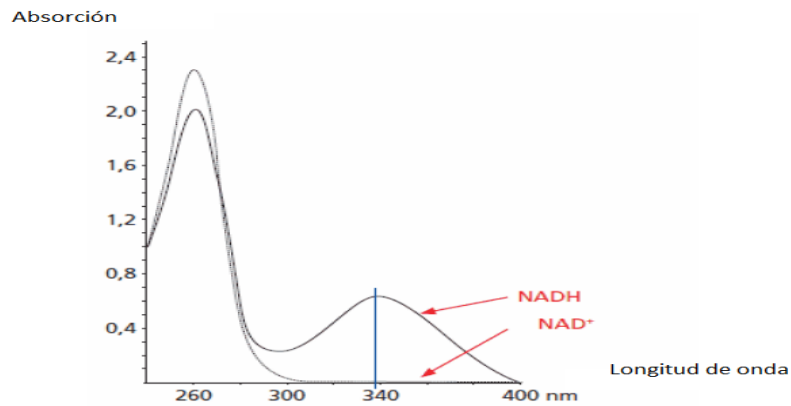


Figura 2. 18 Espectros de absorción del  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADH}$  [134].

El  $\text{NADH}$  en solución presenta fluorescencia bajo la excitación de luz ultravioleta, es decir absorbe luz en 320-380 nm y emite luz en el rango de 420 a 540 nm presentando un pico máximo entre 440 nm y 480 nm (**Figura 2. 19**) [160] [161] [162] [61].

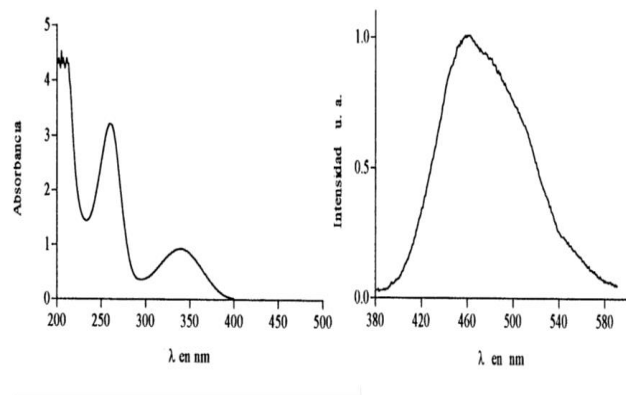


Figura 2. 19 Espectro de absorción del lado izquierdo y de fluorescencia lado derecho concentración  $10^{-4}\text{M}$  [61]

### 2.9.1 La función mitocondrial en vivo evaluada por fluorescencia de $\text{NADH}$ .



La función normal mitocondrial es un factor crítico en la homeostasis y mantenimiento celular en los varios órganos del cuerpo. Es bien sabido que la disfunción mitocondrial está implicado en muchas enfermedades, tales como isquemia, hipoxemia, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, y en el proceso apoptótico celular. El seguimiento en vivo en tiempo real del estado metabólico mitocondrial es de crucial importancia, debido a la participación de la disfunción mitocondrial en muchos estados patológicos. Este tipo de monitoreo en modelos animales, así como en pacientes proporciona datos en tiempo real que puede ayudar a interpretar resultados experimentales u optimizar el tratamiento de pacientes. Aunque las señales de NADH no están calibradas en unidades absolutas, el seguimiento de los niveles de NADH en el tejido y en células proporciona la más importante información sobre el estado metabólico de la mitocondria en términos de producción de energía y niveles de oxígeno intracelular [159]. La viabilidad del tejido en tiempo real y la espectroscopia de tejido; permiten la monitorización de la actividad de la cadena respiratoria en vivo, esto mediante la monitorización mitocondrial de las moléculas de  $\text{NAD}^+$ , FAD, o el estado oxidación-reducción del citocromo oxidasa. La interferencia de la sangre en el seguimiento del FAD y citocromo oxidasa es mucho mayor que con NADH; por lo tanto, el esfuerzo es en el seguimiento del estado redox del NADH mitocondrial [163] [164].

## 2.10 Influencia de la temperatura en la fluorescencia

La temperatura es una variable importante en fluorimetría analítica, observándose una disminución de la fluorescencia al aumentar la temperatura. El cambio en la fluorescencia es normalmente del 1 % por °C, si bien, en algunos compuestos, como el triptófano o la rodamina B puede ser hasta del 5 %. La disminución de la emisión fluorescente con la temperatura se debe a que el aumento de la frecuencia de choques de las moléculas a temperatura elevada incrementa la probabilidad de desactivación en forma de energía no radiante. Por otra parte, el aumento de temperatura hace disminuir la viscosidad del disolvente, lo cual, también aumenta la probabilidad de desactivación mediante colisiones [116].

### 2.10.1 Efectos de la temperatura en la fluorescencia de $\beta$ – NADH

Existen evidencias de que la fluorescencia de la molécula NADH se ve afectada por la temperatura [116]. Trabajos previos evaluaron la dependencia de la temperatura de  $\beta$ -NADH en solución de glicerol / agua. La vida media de la fluorescencia del NADH en glicerol / agua es 0.66 ns, a 20 °C. Espectros de emisión se registraron desde 290 a 12 °K

(16.8 a  $-261.1^{\circ}\text{C}$ ). Se encontró que la fluorescencia de  $\beta$  - NADH en glicerol / agua aumentaba a medida que disminuía la temperatura; esta se incrementó aproximadamente 16 veces y la emisión se desplazó aproximadamente 35 nm hacia el azul al final del experimento (**Figura 2. 20**). Debajo de  $77^{\circ}\text{K}$ , las características espectrales de  $\beta$ -NADH no cambiaron significativamente con los cambio de temperatura, es decir no aumenta la sensibilidad por ir a temperaturas muy bajas. Esto se realizó ya que se quería evaluar el metabolismo de células y tejidos en condiciones estables, proponiendo que bajas temperaturas inhiben el metabolismo y que el estado metabólico de las células puede ser evaluado por el seguimiento de reacciones redox de la molécula NADH la cual es precursora de la molécula energética ATP [165].

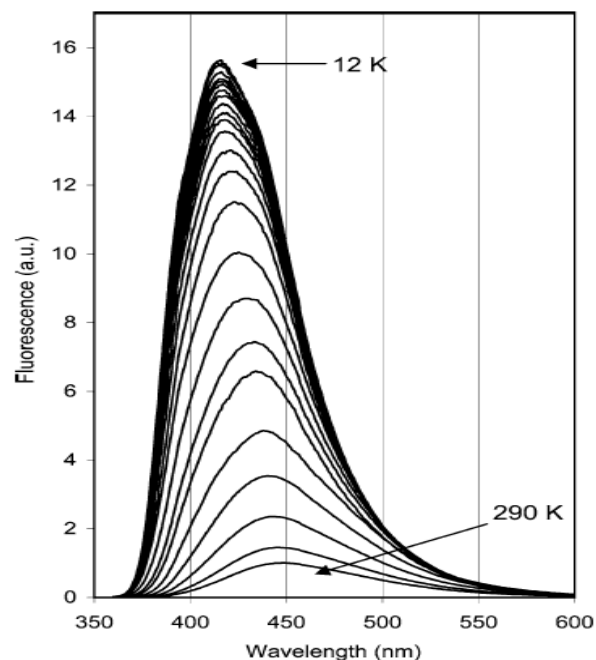


Figura 2. 20 Incremento de la emisión de fluorescencia de  $\beta$ -NADH en glicerol / agua por disminución de temperatura de  $290$  a  $12^{\circ}\text{K}$  ( $16.8$  a  $-261.1^{\circ}\text{C}$ ), las cuales son indicadas [165].

## 2.11 Quenching de fluorescencia

El fenómeno de quenching de fluorescencia se refiere a procesos que provocan una disminución de la IF de una sustancia dada. El quenching puede ser resultado de varios mecanismos. Una gran variedad de sustancias pueden actuar como quenchers de fluorescencia. Uno de los mejores ejemplos está dado por el oxígeno molecular, por lo que frecuentemente es necesario eliminar el oxígeno disuelto de las muestras sobre las que se desea medir tiempos de vida de fluorescencia o rendimientos cuánticos de fluorescencia.

Otros ejemplos son las aminas alifáticas y aromáticas, xenón, peróxido de hidrógeno, acrilamida, bromato, yoduro, etc. Debido a la gran variedad de moléculas quenchers, se debe identificar aquéllas de interés para cada molécula fluorescente en particular. La presencia de oxígeno disuelto a menudo reduce la IF de una dilución. Este efecto puede ser el resultado de una oxidación inducida fotoquímicamente de las especies fluorescentes. Sin embargo, con más frecuencia tiene lugar una atenuación (quenching) como consecuencia de las propiedades paramagnéticas del oxígeno molecular. El paramagnetismo es la tendencia de los momentos magnéticos libres (espín) a alinearse paralelamente a un campo magnético [166] [167].

## 2.12 Fluorescencia del NADH mitocondrial a diferentes niveles de oxigenación.

Para entender la función mitocondrial en vivo y en diferentes condiciones patológicas, varios estudios en células y tejidos, se han realizado bajo diferentes niveles de oxigenación y bajo diferentes condiciones: en vivo e in vitro, anestesia, fármacos. Encontrando que en situaciones de hipoxia, anoxia, isquemia, se ve un incremento en la fluorescencia del NADH, comparados con estados de Normoxia (**Figura 2. 21**). Estos cambios se asocian al estados Redox de la molécula  $NAD^+$  (Oxidado), NADH (Reducido) [159] [168].

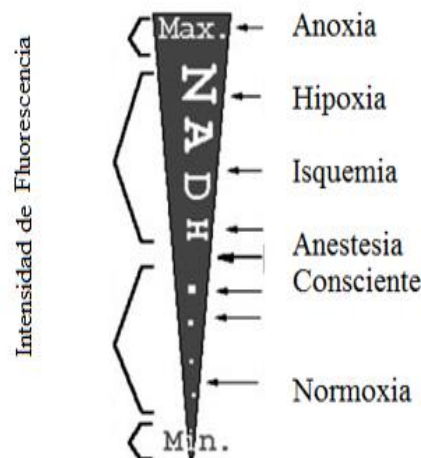


Figura 2. 21 En situaciones de hipoxia, anoxia, isquemia, se ve un incremento en la fluorescencia del NADH, comparados con estados de Normoxia [159].



### 2.13 Fluorescencia del NADH en la cadena respiratoria celular; influencia de Inhibidores y desacopladores.

Estudios usando miocitos aislados, compararon espectros bajo varias condiciones, ellos encontraron que el cianuro un inhibidor induce un incremento en los espectros de fluorescencia, así como el carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona (FCCP), usado típicamente como un desacoplador de la fosforilación oxidativa, produce un marcado decremento en los espectros. La función principal de los inhibidores es detener el transporte de electrones en la cadena de la respiración, actuando en diferentes partes de la cadena respiratoria. La acción de los desacopladores consiste en disociar la oxidación en la cadena respiratoria, de la fosforilación. Bloquean la síntesis de ATP, al tiempo que permite que continúe el transporte electrónico a lo largo de la cadena respiratoria hasta el  $O_2$  [168] [159] [25].

### 2.14 Instrumentación

Los diversos componentes de los instrumentos para la medida de la fotoluminiscencia son similares a los que se encuentran en los fotómetros o espectrofotómetros ultravioleta/visible. La **(Figura 2. 22)** muestra una configuración típica para estos componentes. Estos utilizan ópticas de doble haz, tal como se muestra para compensar las fluctuaciones en la potencia de la fuente. El haz de la muestra primero pasa a través de un filtro o un monocromador de excitación, el cual transmite la radiación que luego provocara la fluorescencia pero limita la radiación de la fuente a una sola longitud de onda. La fluorescencia se propaga desde la muestra en todas direcciones pero la manera más conveniente de observarla es en ángulo recto ( $90^\circ$ ) respecto al haz de excitación; a otros ángulos, la dispersión por la solución y las paredes de las cubetas pueden causar grandes errores en la medida de la intensidad. La radiación emitida llega a un detector fotoeléctrico después de haber pasado por un segundo filtro o monocromador que aísla un pico fluorescente para medirlo. El haz de referencia pasa a través de un atenuador que reduce su potencia a “aproximadamente la de la radiación fluorescente”, el poder de reducción es normalmente un factor de 100 o más. La señal de muestra y de referencia son entonces conducidas a un amplificador diferencial cuya salida se lee en un contador o un registro [116].

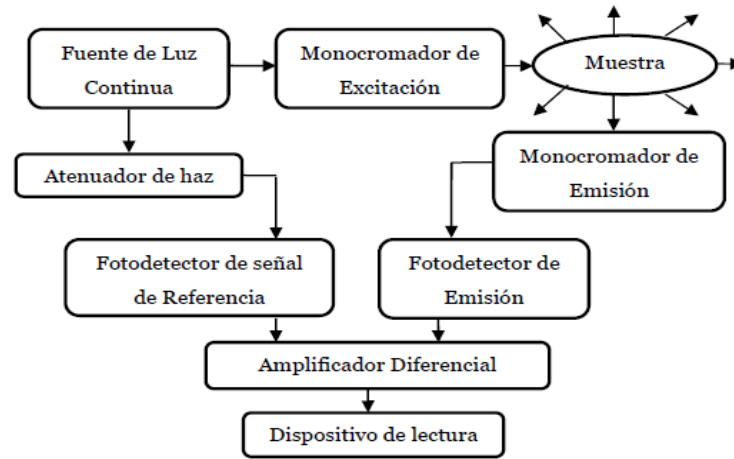


Figura 2. 22 Configuración de la instrumentación de un fotómetro para la medida de fluorescencia, modificado de [116].

### 2.14.1 Fuentes de espectrofotómetros de fluorescencia

En la mayoría de las aplicaciones donde se requiere medir fluorescencia, se necesita una fuente más intensa que las lámparas de tungsteno o deuterio utilizadas para la medida de la absorción, dado que la magnitud de la señal de salida y por tanto la sensibilidad, es directamente proporcional a la potencia de la fuente. Normalmente se utiliza una lámpara de arco de xenón o de mercurio. La lámpara más corriente para los fluorímetros de filtro es la lámpara de arco de mercurio a baja presión equipada con una ventana de sílice fundida. Esta fuente produce líneas muy intensas a 254, 366, 405, 436, 546, 577, 691 y 773 nm. Las líneas individuales se pueden aislar con filtros de interferencia o absorción adecuados [169] [170]. La fluorescencia de los compuestos que son fluorescentes se puede inducir por diversas longitudes de onda, al menos una de las líneas del mercurio resulta normalmente adecuada, para los espectrofluorímetros. En donde se requiere una fuente de radiación continua, normalmente se utiliza una lámpara de arco de xenón a una presión elevada de 75 a 450 W. Estas lámparas requieren una potencia elevada capaz de producir de 15 a 20 V y corrientes continuas de 5 a 20 A. El espectro de una lámpara de xenón es continuo desde aproximadamente 300 a 1300 nm. En algunos instrumentos, se obtienen destellos espaciados regularmente por descarga de un condensador a través de la lámpara; de esta manera se producen impulsos de gran intensidad, por lo que la salida de los fototubos es de corriente alterna, con lo que fácilmente se puede amplificar y procesar [116] [171] [172].

### 2.14.2 Fluorescencia inducida por láser (LIF)





A principios de 1970, se utilizaron también diversos tipos de láseres como fuentes de excitación para medidas de fotoluminiscencia. Particular interés tiene un láser ajustable de colorante que utiliza un láser pulsado de nitrógeno como fuente primaria y que produce una radiación monocromática entre 360 y 650 nm. En general los dispositivos láser eliminan la necesidad de un monocromador de excitación. LIF representa intensas fuentes de luz con densidades espectrales de energía que sobrepasan por varios ordenes de magnitud a aquellas de luz incoherente, además de ser una técnica con alta selectividad, con lo que es posible abordar de forma selectiva las especies para emitir luz, incluso en ambientes de combustión donde están presentes cientos de especies diferentes. Debido a esta sensibilidad, LIF tiene la capacidad de detectar moléculas en partes por millón (ppm) o incluso nivel de sub-ppm. La sensibilidad y la selectividad son las dos principales ventajas de la técnica LIF. Un particular interés tienen los láseres sintonizables de colorante que utilizan, como sistema de bombeo, un láser de nitrógeno pulsante o un láser de Nd:YAG. La mayoría de los espectrofluorímetros comerciales utilizan lámparas de tungsteno o deuterio (ya descritas) como fuentes, por ser menos caras y menos complicadas de uso adecuados [169] [170] [171] [172].

Sin embargo, las fuentes de láser ofrecen importantes ventajas en determinados casos [173]:

- 1) Cuando las muestras son muy pequeñas como en cromatografía con microcolumnas y en electroforesis capilar donde la cantidad de muestra es de un microlitro o menor
- 2) En los sensores de control remoto, como en la detección fluorimétrica de radicales hidroxilo en la atmósfera de clorofila en seres vivos acuáticos, donde la naturaleza colimada de los haces de láser es vital
- 3) Cuando se requiere una radiación de excitación altamente monocromática para minimizar los efectos de las interferencias fluorescentes.

En la (**Figura 2. 23**) podemos ver el diagrama básico de un fluorímetro con fuente de luz láser.

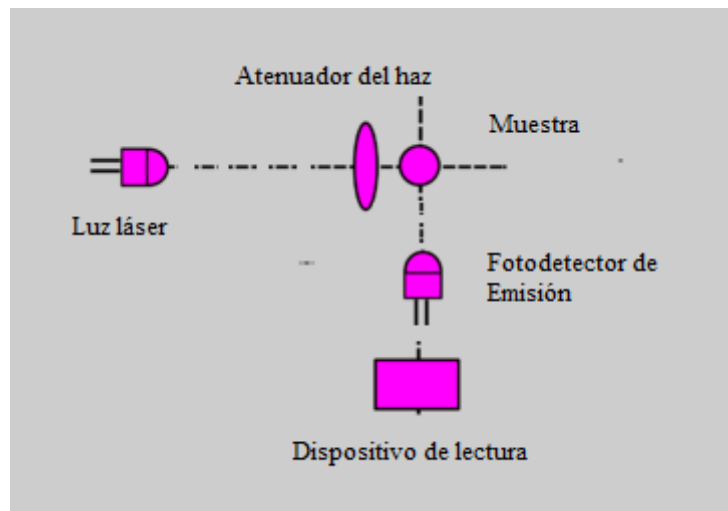


Figura 2. 23 Diagrama básico de un medidor de fluorescencia con fuente de luz láser, modificado de [116].

### 2.14.3 Filtros ópticos

Un filtro óptico es un medio que sólo permite el paso de luz a través de él, suprimiendo o atenuando luz. Los filtros ópticos más comunes son los filtros de color, es decir, aquellos que sólo dejan pasar luz de una determinada longitud de onda [116]. Si se limitan a atenuar la luz uniformemente en todo el rango de frecuencias se denominan filtros de densidad neutra. Según su procedimiento de acción pueden ser de absorción, si absorben parte de la luz, o bien reflectivos si la reflejan. Según el rango de frecuencias que dejan sin filtrar, se clasifican en filtros de paso alto o de paso bajo, según si dejan sin filtrar las radiaciones de frecuencia superior o inferior respectivamente a cierto valor, denominada frecuencia de corte. En los filtros de paso de banda se filtran las frecuencias por encima y por debajo de ciertos límites [116] [174] (Figura 2. 24).

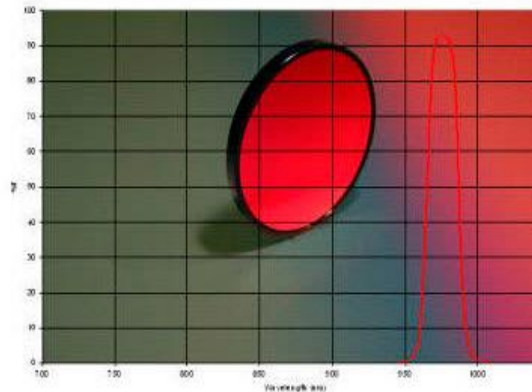


Figura 2. 24 Filtro pasa banda solo deja pasar el infrarrojo entre 950 a 1000 nm [174].

## 2.10.4 Monocromador

Un monocromador es un dispositivo óptico que permite, por medio de un mecanismo, seleccionar y transmitir una estrecha banda de longitudes de onda a partir de una fuente emisora que produzca una amplia gama de longitudes de onda. Un monocromador (**Figura 2. 25**) consiste, en general, de una rendija de entrada (B) que proporciona una imagen estrecha y casi coherente de la fuente de radiación (A), un colimador que produce paralelas de la radiación procedente de la rendija de entrada (C), una rejilla de difracción para difractar la radiación incidente (D), otro colimador (E) para formar la imagen de la rendija de entrada sobre la rendija de salida y una rendija de salida (F) para aislar la banda espectral deseada (G). En resumen, el monocromador permite seleccionar finos haces de radiación, de pequeños intervalos de frecuencia, que se hacen incidir sucesivamente sobre un detector. La anchura de una rendija de entrada, limita el haz de radiación que penetra en el monocromador, si éste es muy fino, la dispersión es más eficaz. La anchura de la rendija de salida determina el intervalo de frecuencias o sea la monocromaticidad del haz de radiación que incide sobre el detector [116].

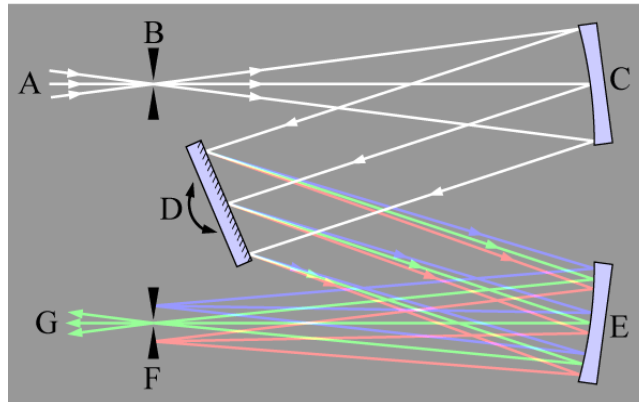


Figura 2. 25 Monocromador Czerny- Turner: Dispositivo óptico que permite, seleccionar y transmitir una estrecha banda de longitudes de onda a partir de una fuente emisora, modificado de [116].

#### 2.14.4 Fotodetectores

Los fotodetectores son sensores que generan una señal eléctrica dependiente de la luz u otra radiación electromagnética que reciba, basados en el efecto fotoeléctrico, en el fotovoltaico, fotoelectroquímico o en la fotoconductividad. Cuando una señal de fluorescencia es de baja intensidad, se necesita una amplificación para estas medidas, generalmente se utilizan tubos fotomultiplicadores o diodos alineados como detectores en instrumentos de fluorescencia [116]. Ejemplo de foto detectores en espectrofotómetros son los dispositivos de carga acoplada (CCD; en inglés charge-coupled device). El término CCD es conocido popularmente como la designación de uno de los elementos principales de las cámaras fotográficas y de video digitales. El CCD es un chip de silicio sensible a la luz que está eléctricamente dividido en un gran número de partes independientes llamadas pixels (picture element: elemento de imagen) ver (**Figura 2. 26**). El CCD convierte luz (fotones) en un arreglo de cargas electrónicas en el chip de silicio. Esta estructura de cargas se convierte en una onda digitalizada y es guardada como un archivo en quizás una computadora. Los píxeles del CCD registran gradaciones de los tres colores básicos: rojo, verde y azul (abreviado "RGB", del inglés red, green, blue), por lo cual tres píxeles, uno para cada color, forman un conjunto de células fotoeléctricas capaces de captar cualquier color en la imagen. Para conseguir esta separación de colores la mayoría de cámaras CCD utilizan una máscara de Bayer que proporciona una trama para cada conjunto de cuatro píxeles de forma que un pixel registra luz roja, otro luz azul y dos píxeles se reservan para la luz verde (el ojo humano es más sensible a la luz verde que a los colores rojo o azul). El resultado final incluye información sobre la luminosidad en cada píxel pero con una

resolución en color menor que la resolución de iluminación. La sensibilidad del detector CCD depende de la eficiencia cuántica del chip, la cantidad de fotones que deben incidir sobre cada detector para producir una corriente eléctrica. El número de electrones producido es proporcional a la cantidad de luz recibida. Al final de la exposición los electrones producidos son transferidos de cada detector individual por una variación cíclica de un potencial eléctrico aplicada sobre bandas de semiconductores horizontales y aisladas entre sí por una capa de  $\text{SiO}_2$ . De este modo, el CCD se lee línea a línea, aunque existen numerosos diseños diferentes de detectores [153] [175] [176].

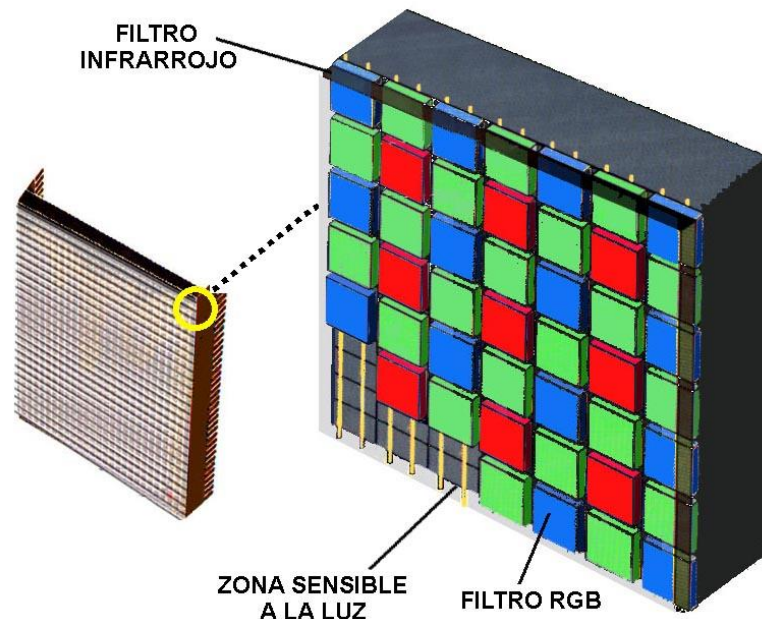


Figura 2. 26 El CCD es un chip de silicio sensible a la luz, eléctricamente dividido en píxeles independientes; convirtiendo luz (fotones) en un arreglo de cargas electrónicas [175].

### 2.14.5 Cubetas para espectrofotómetro

Para medidas de fluorescencia se utilizan tanto cubetas cilíndricas como rectangulares, las cubetas deben ser tan claras o transparentes como sea posible, sin impurezas que puedan afectar la lectura espectroscópica. Fabricadas en vidrio, plástico u cuarzo según las diferentes longitudes de onda utilizables. Para la elección de la cubeta, se debe tener cuidado en el diseño del compartimento de la misma, para reducir la cantidad de radiación dispersada que llega hasta el detector. En la (Figura 2. 27) se muestran cubetas de diferentes capacidades volumétricas, el rango de operación de estas celdas es dependiente del material con que fueron elaboradas [177] [178] [179].

- ◆ Las celdas de vidrio óptico tienen un rango de 334 a 2500nm.
- ◆ Las celdas de cuarzo tienen un rango de 170 a 2700nm.

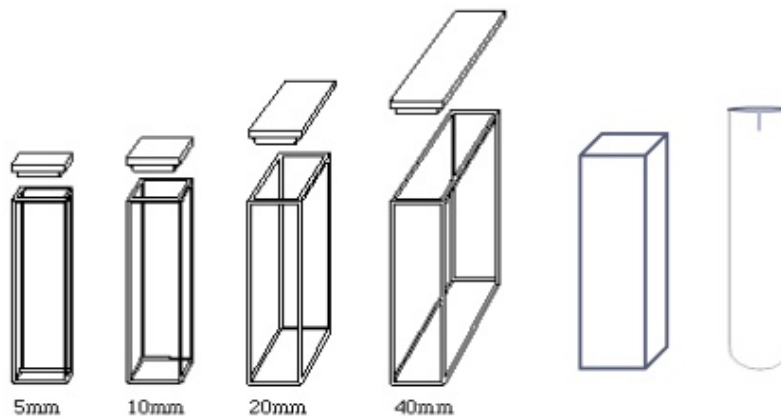


Figura 2. 27 Diferentes tamaños y formas de celda pudiendo ser de vidrio, plástico o cuarzo [179].

### 2.14.6 Fibra óptica

Las fibras ópticas son conductos, rígidos o flexibles, de plástico o de vidrio (sílice), que son capaces de conducir un haz de luz inyectado en uno de sus extremos, mediante sucesivas reflexiones que lo mantienen dentro de sí para salir por el otro extremo. Es decir, es una guía de la fuente de luz. Las aplicaciones de la fibra óptica son muy diversas, pudiendo ser desde transmisión de datos, hasta la conducción de la luz solar hacia el interior de edificios, o hacia donde pudiera ser peligroso utilizar la iluminación convencional por presencia de gases explosivos. También es utilizada en medicina para transmitir imágenes desde dentro del cuerpo humano. En espectroscopia diversos tipos de análisis por fluorescencia se pueden llevar a cabo en posiciones muy alejadas de la fuente y el detector. En este caso, la radiación de una fuente de laser viaja a través de una fibra óptica y excita la fluorescencia en disoluciones de la muestra. La radiación fluorescente vuelve entonces otra vez por la misma fibra óptica al detector para la medida. La aplicabilidad de este tipo de dispositivo se ha extendido a análisis no fluorescentes poniendo un material fluorescente indicador al final de la fibra óptica. Una forma de clasificar a las fibras ópticas es por el modo en que transmite, los modos son formas de ondas admisibles, la palabra modo significa trayectoria [153] [180].

### Fibras ópticas Multimodo

Son aquellas que pueden guiar y transmitir varios rayos de luz de diferente longitud de onda por sucesivas reflexiones, (modos de propagación).

### Fibras ópticas Monomodo

Son aquellas que por su especial diseño pueden guiar y transmitir un solo rayo de luz (una sola longitud de onda). En estas fibras monomodo cuando se aplica el emisor de luz, el aprovechamiento es mínimo, también el costo es más elevado, la fabricación difícil y los acoples deben ser perfectos, en la figura (**Figura 2. 28**) podemos ver los modos de transmisión de la luz antes mencionados.

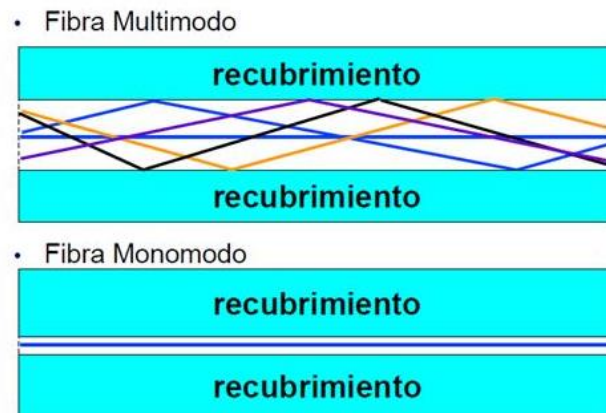


Figura 2. 28 Fibra Multimodo y Monomodo [180].



## Capítulo 3

# Terapia Láser de Baja Intensidad (TLBI).

### 3.1 Introducción

En la actualidad el rayo láser constituye una herramienta importante en el área de la medicina, pudiendo ser clasificado en base a su aplicación médica, en dos tipos de láser [181]:

1) El láser de alta potencia o quirúrgico:

Empleado para el corte, la coagulación y la vaporización de los tejidos, es aplicable a todas las especialidades quirúrgicas con la ventaja de una significativa disminución del sangrado, un menor daño tisular y una pronta recuperación, al grado de que en ocasiones los procedimientos pueden realizarse en el consultorio.

2) El láser de baja potencia o terapéutico (tema del presente trabajo):

Empleado en diversas áreas como en la reumatología, la medicina del deporte, la medicina física, la rehabilitación y la odontología, también es usado en problemas crónico-degenerativos (padecimientos osteomusculares y artritis, en los que se mejora la movilidad de las articulaciones y se reduce el dolor); En las lesiones ulcerosas causadas por el pie diabético (ayudando a la regeneración del tejido dérmico).





Entre los efectos benéficos en el organismo por la aplicación de TLBI encontramos: Analgesia en la zona irradiada; Efecto Anti inflamatorio; Efecto Anti edematoso; Ayuda a la mejora de la cicatrización por heridas y traumatismos en diversos tejidos. Algunos de los mecanismos celulares por los cuales se piensa que la radiación láser ejerce su efecto terapéutico son: 1) Induce la liberación de sustancias como la histamina, serotonina y bradicinina; 2) Aumenta la síntesis de Trifosfato de Adenosina (ATP) intracelular; 3) Estimula la síntesis de ADN y proteínas; 4) Estimula la actividad enzimática. [182] En la actualidad los efectos de la terapia laser siguen siendo tema de investigación actual, no quedando claros hasta el momento, los mecanismos intracelulares y moleculares que son disparados por la radiación láser durante su acción terapéutica [1].

### 3.2 Antecedentes de la terapia láser

La palabra láser se forma con la primera letra de cada palabra de la frase en inglés: Light Amplification Stimulated Emission of Radiation (amplificación de luz por emisión estimulada de radiación). El láser es un dispositivo que utiliza un efecto de la mecánica cuántica, la emisión inducida o estimulada, para generar un haz de luz coherente tanto espacial como temporal [183]. Los orígenes del láser se dan en 1917, cuando Albert Einstein, expuso la posibilidad de que el proceso de emisión de la radiación pudiese ser alterado estimulando el paso del átomo de su posición de excitación a la de reposo [184]. Sin embargo, no fue sino hasta los años cincuenta cuando el principio pudo ser llevado a su reproducción en un modelo experimental. Townes y colaboradores diseñaron los primeros sistemas de amplificación de radiaciones utilizando el procedimiento de estimular la emisión, pero en la zona del espectro correspondiente a las microondas, sistema al que llamaron MASER (amplificación de microondas por emisión estimulada de radiación). En 1958, Townes y Scbawlow en los Estados Unidos y Basov y Projorov, en la URSS, demuestran 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 a impulso en los laboratorios de la Hughes Aircraft Corporation. A partir de este momento se inicia el desarrollo de otros tipos de emisores láser [185]. En 1962 se crean los primeros láseres con diversos tipos de gas como medio activo. Paralelamente se va desarrollando un amplio campo de posibilidades prácticas de utilización de los diversos sistemas de emisión láser en ingeniería, comunicaciones, informática, industria del espectáculo y a partir de 1965 en medicina. Desde ese momento, se realizaron los primeros trabajos para adaptar el láser a la práctica médica, iniciando con estudios sobre las posibilidades terapéuticas de los distintos medios emisores de láser, siendo los científicos de la URSS los principales exponentes de los primeros estudios que darían lugar posteriormente al concepto de terapia láser de baja intensidad (TLBI) [186].

La terapia láser está basada en el uso de la luz monocromática, coherente, roja e infrarroja para acelerar los procesos naturales de sanación en nuestro organismo. La fuente

de luz es puesta en contacto con la piel, permitiendo que la luz penetre en los tejidos donde su interacción es deseable para la regulación de la circulación sanguínea y la restauración de la homeostasis (función normal) de la función celular. La TLBI no provoca ablación de los tejidos como lo hacen los láseres quirúrgicos [1] [3]. La controversia de los efectos benéficos por la aplicación de la TLBI en personas y animales como caballos, perros y ratas que requieren el alivio de algún padecimiento ha llevado a la administración de alimentos y drogas de los estados unidos (FDA) a tener una política muy estricta en cuanto a los equipos de TLBI se refiere, aprobando solo el uso de ciertos equipos en el año de 1999 para su uso en el alivio del dolor y el tratamiento del túnel carpiano, todo esto basado en evidencia clínica reportada [187].

### 3.3 Conceptos básicos sobre la operación del láser

La física involucrada en la emisión del haz láser, consiste de tres pasos: la emisión estimulada, la amplificación de la luz y la inversión de la población. Pero, para lograr estos fenómenos, es necesaria una fuente de energía externa y por último para aumentar la ganancia, se deberá utilizar un resonador. La luz es absorbida y emitida por los átomos mediante los mecanismos llamados de absorción y de emisión, respectivamente. Si el electrón de un átomo está en una órbita inferior, puede pasar a una superior solamente si absorbe energía del medio que lo rodea, generalmente en la forma de un fotón luminoso. Este es el proceso de absorción que se representa mediante los diagramas de la **(Figura 3. 1 (A))**. Si el electrón se encuentra en una órbita superior, puede caer a una órbita inferior si pierde energía, lo cual puede también suceder mediante la emisión de un fotón. Este proceso de emisión se muestra en los diagramas de la **(Figura 3. 1 (B))**. En ambos procesos la frecuencia ( $\gamma$ ) de la onda absorbida o emitida está determinada por la magnitud de la energía emitida o absorbida (E), según la relación ya obtenida por Planck  $E=h\gamma$ . Cuando un electrón está en una órbita exterior este no puede permanecer en ese estado un tiempo demasiado grande, por lo que tiende a caer al estado inferior, emitiendo un fotón, después de un tiempo sumamente corto, menor que un microsegundo, al que se denomina vida media del estado. Este proceso de emisión se conoce como emisión espontánea. Existe una segunda forma de emisión de luz por un átomo, llamada emisión estimulada, que se representa mediante el diagrama de la **(Figura 3. 1 (C))**. Si un electrón está en el estado superior y recibe un fotón de la misma frecuencia del que emitiría si bajara al nivel inferior, desestabilizará a este átomo, induciéndolo a emitir inmediatamente. Después de esta emisión estimulada existirán dos fotones en lugar de uno, el que estimuló y el estimulado. Naturalmente, para que la emisión estimulada tenga lugar, se requiere que el electrón permanezca en el estado superior un tiempo suficientemente largo para darle oportunidad al fotón estimulador a que llegue al átomo. Por esta razón, el proceso de emisión estimulada es más fácil si el nivel superior tiene una vida media relativamente larga [188] [189].

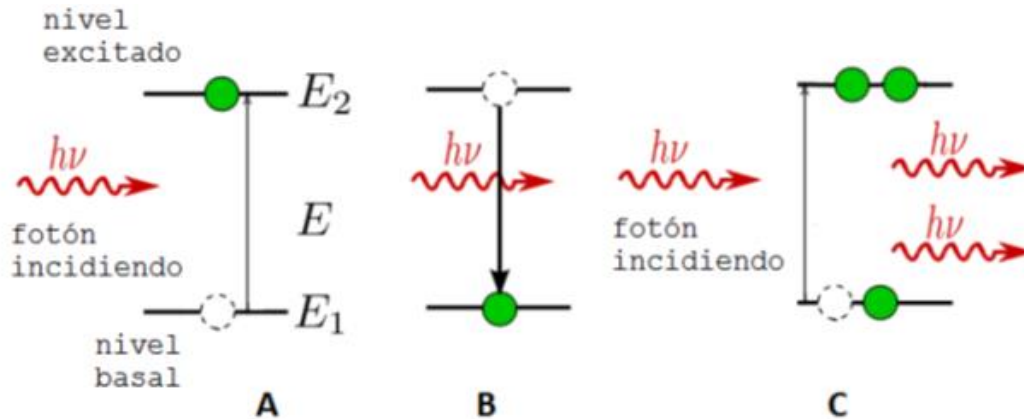
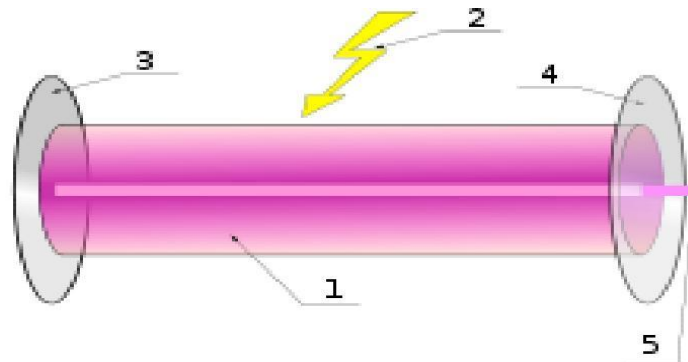


Figura 3. 1 A) Absorción; B) Emisión; C) Emisión del estado excitado estimulado.

Si consideramos el caso anterior, pero ahora un grupo de átomos que están en el mismo estado de energía y la mayoría está en el rango de estimulación del fotón que pasa, además, asumimos que el tiempo de emisión espontánea es muy largo y la probabilidad de emisión espontánea es cien por ciento. Este fotón interactúa con el primer átomo, como consecuencia, se consigue la emisión estimulada de un fotón. Estos dos fotones, interactúan con los siguientes dos átomos, resultando así en cuatro fotones coherentes. Multiplicándose así, los fotones que tienen la misma dirección, fase y longitud de onda resultan en el fenómeno que se conoce como amplificación de la luz. Hay que notar, que la energía necesaria para excitar los átomos, debe ser proporcionada por una fuente de energía externa. Por otra parte, en cualquier población real de átomos, la probabilidad de lograr la emisión estimulada es bastante pequeña. Esto se debe a que, generalmente van a haber más átomos en niveles inferiores de energía que en estados excitados. Por esto hay que invertir la población de átomos para lograr que el sistema funcione como láser. La energía que necesita un electrón para subir al estado superior no necesariamente se manifiesta bajo la forma de fotón luminoso. También puede absorber la energía que se le comunique mediante otros mecanismos, como por ejemplo, mediante una colisión con otro átomo. Si estamos subiendo constantemente los átomos de un cuerpo al estado superior mediante un mecanismo cualquiera, éstos caerán espontáneamente al estado inferior emitiendo luz. A este proceso se le conoce con el nombre de "bombeo óptico", el cual se provoca mediante una fuente de radiación como puede ser, otro láser, una lámpara convencional, el paso de una corriente o descarga eléctrica, dependiendo del tipo de láser. Consideremos un material en la (Figura 3. 2 (1)) sujeto a bombeo óptico a fin de que sus átomos regresen constantemente al nivel superior. Supongamos también que la vida media de este estado superior es lo suficientemente larga como para permitir la emisión estimulada. Finalmente,

hagamos incidir en este material un fotón de la frecuencia adecuada para provocar la emisión estimulada (**Figura 3. 2 (2)**). Es fácil ver que se provocará una reacción en cadena, por lo que a la salida se tendrán no uno, sino una multitud de fotones (**Figura 3. 2 (5)**). Dicho de otro modo, se habrá amplificado la luz mediante el mecanismo de emisión estimulada. A fin de que éste sea un proceso continuo, podemos colocar un arreglo de espejos semitransparente a la salida y entrada, para lograr un medio resonante el cual logra la amplificación (**Figura 3. 2 (3 y 4)**) y a su vez generar el haz láser (**Figura 3. 2 (5)**) [189] [190] [188].



Componentes principales:

1. Medio activo para la formación del láser
2. Energía bombeada para el láser
3. Espejo reflectante al 100%
4. Espejo reflectante al 99%
5. Emisión del rayo láser

Figura 3. 2 Sistema resonador básico para la generación de luz láser [191] .

### 3.3. 1 Características de la emisión de la radiación

Emisión espontánea: En una emisión espontánea de radiación, los electrones que vuelven del estado excitado al estado fundamental emiten fotones, es un proceso aleatorio y la radiación resultante está formada por fotones que se desplazan en distintas direcciones y con fases distintas generándose una radiación monocromática incoherente. Dicho de otro

modo, las fases de las ondas no tienen ninguna relación entre sí, o lo que es lo mismo las crestas de estas ondas no están alineadas, como se muestra en la **(Figura 3.3 (A))** [189] [188].

Emisión estimulada de radiación: La emisión estimulada, base de la generación de radiación de un láser, se produce cuando un átomo en estado excitado recibe un estímulo externo que lo lleva a emitir fotones y así retornar a un estado menos excitado. El estímulo en cuestión proviene de la llegada de un fotón con energía similar a la diferencia de energía entre los dos estados. Lo que logra el bombeo óptico es que la mayoría de los átomos estén constantemente en el nivel superior. Este proceso se denomina inversión de población, y es absolutamente indispensable para que se produzca la emisión láser. Los fotones así emitidos por el átomo estimulado poseen fase, energía y dirección similares a las del fotón externo que les dio origen. La emisión estimulada descrita es la raíz de producir luz coherente y monocroma **(Figura 3.3 (B))** [189] [188].

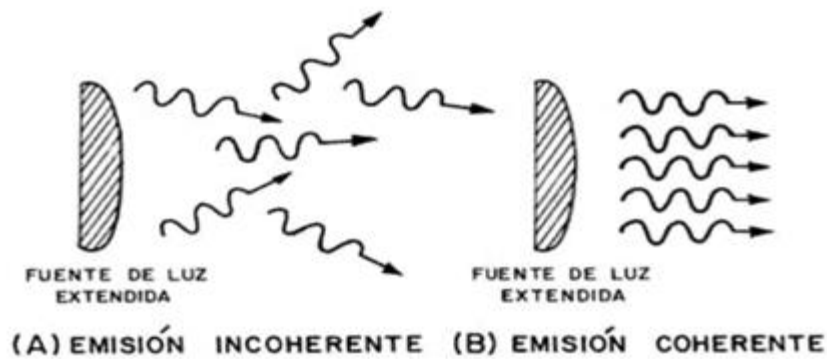


Figura 3.3 Diferencia entre a) emisión Incoherente (emisión espontánea) y b) coherente (emisión estimulada) [189].

### 3.3.2 Resonador óptico

Como ya se mencionó, parte importantes en la generación del láser es el sistema de bombeo, el cual se provoca mediante una fuente de radiación, el paso de una corriente eléctrica, o el uso de cualquier otro tipo de fuente energética que provoque una emisión, al estimular un cierto material, así mismo se mencionó un sistema de un par de espejos en el que la emisión generada por el sistema de bombeo es susceptible de permanecer confinada, gracias a estos espejos en los que se reflejan, formándose una cavidad resonante. Una cavidad óptica o resonador óptico es un dispositivo en el que algunos rayos luminosos son

susceptibles de permanecer confinados gracias a espejos sobre los que se reflejan. La forma más fácil de realizar una cavidad óptica consiste en colocar dos espejos planos o esféricos frente a frente y separados por una distancia  $L$ . Encontrada esta configuración en muchos láseres pequeños. La luz reflejada varias veces por los espejos puede interferir con ella misma. De ello se deduce que sólo algunas longitudes de onda, y sus ondas asociadas, pueden estar presentes en la cavidad. Estas ondas se denominan modos de resonancia. Dependen de la forma de la cavidad. La presencia del resonador óptico (**Figura 3. 4**) nos permite extraer en forma eficiente la energía que el sistema de bombeo ha depositado en los átomos contenidos en la cavidad amplificadora. Debido a que uno de los espejos del resonador tiene una reflectancia del 90%, esto permitirá que el 10% de los fotones que incidan allí sean transmitidos fuera del resonador óptico, formando un haz de luz muy intenso, monocromático (formado por fotones de idéntica energía), coherente (pues todos sus fotones están en fase, ya que fueron producidos por el proceso de emisión estimulada) y altamente direccional. Éstas son las propiedades fundamentales de la luz láser que es generada por todo oscilador óptico [189] [188] [170].

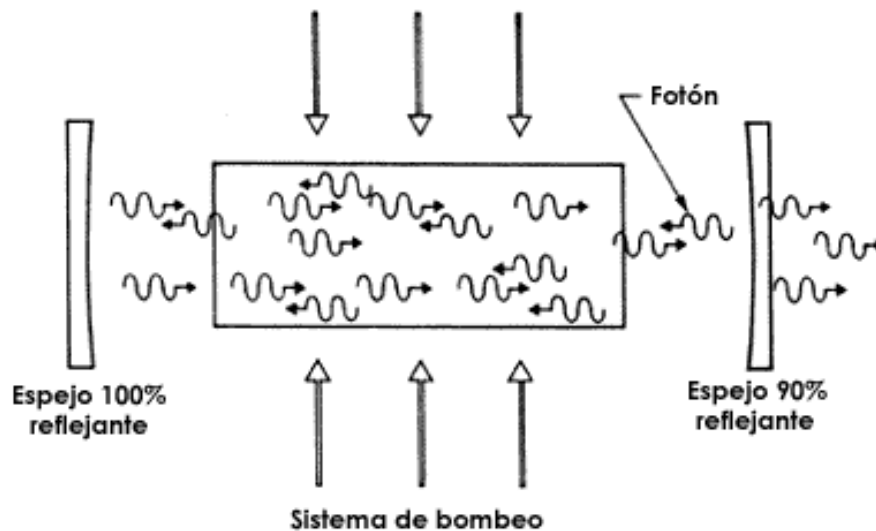


Figura 3. 4 Resonador óptico [189].



### 3.4 Propiedades de la radiación láser

El láser al ser una fuente luminosa posee propiedades muy especiales e importantes de su luz, cuatro de ellas técnicamente reciben los nombres de coherencia espacial, coherencia temporal, Monocromaticidad y Unidireccionalidad.

- **Monocromaticidad:** La emisión de la radiación es de un solo color a una longitud de onda determinada, pudiendo esta ser visible, infrarroja o ultravioleta. Algunos láseres, como los de colorantes, permiten sintonizar la emisión dentro de una gama de frecuencias o longitudes de onda.
- **Direccionalidad:** La disposición de una cavidad resonante, uno de los más importantes requisitos técnicos en la construcción de los sistemas láser, proporciona otra de las características de esta radiación, su escasa divergencia. Dado que sólo se amplifican los fotones emitidos en el sentido de un eje del material emisor, la radiación resultante posee una marcada direccionalidad de emisión, lo cual la hace idónea para diversas aplicaciones prácticas, en las que se requiere precisión en la iluminación.
- **Coherencia:** En contraposición a la radiación luminosa convencional, de componentes desorganizados o incoherentes, la radiación coherente es aquella en la que todos sus fotones están en fase. Al coincidir en una misma dirección de propagación, los estados vibracionales se suman. El resultado es un efecto de amplificación en la intensidad luminosa emitida, característica de la radiación láser. La luz coherente tiene una característica muy distintiva que la delata: siempre viaja en una misma dirección sin disminuir apreciablemente su intensidad en grandes distancias. La luz diurna (luz del sol la cual no tiene color y se denomina luz blanca) con la que llevamos a cabo nuestras actividades cotidianas, la cual de hecho está formada por fotones que abarcan una amplia gama de frecuencias (colores) ciertamente no es coherente, cada uno de los fotones está desfasado con respecto a los demás y los fotones viajan en direcciones diferentes. Inclusive la luz monocromática, aunque sea de un solo color, tampoco es coherente, porque los fotones también se desparraman en todas direcciones. Únicamente la luz cuyos fotones viajan en fase los unos con respecto a los otros es coherente, y este tipo de luz es producido por lo que hoy conocemos como el láser ( Figura 3. 5) [182] [189] [188].

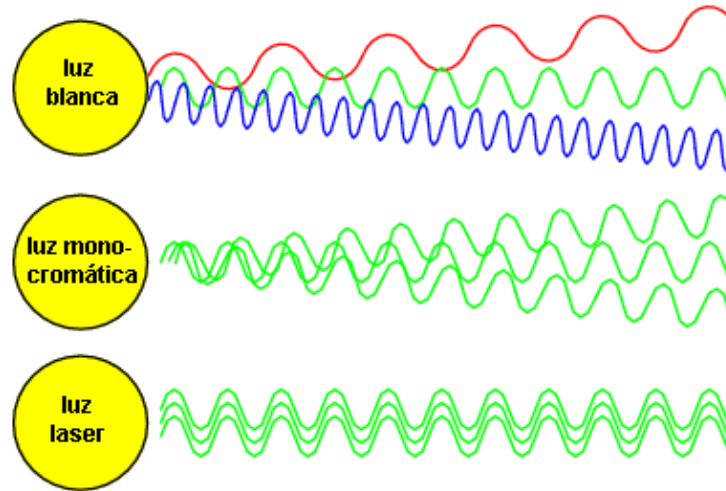


Figura 3. 5 La Coherencia del láser [192].

### 3.5 Parámetros aplicados a TLBI

Los parámetros de calibración de cualquier movimiento ondulatorio comunes a la emisión o producción de cualquier fenómeno ondulatorio electromagnético son [193]: Amplitud, Periodo, Frecuencia y Longitud de onda (Figura 3. 6).

- Amplitud: Es la intensidad del movimiento ondulatorio. Es la máxima perturbación de la onda.
- Periodo: Es el tiempo que se requiere para que pase un ciclo completo (cresta-valle-cresta) por un punto fijo de referencia en el espacio. Es el tiempo necesario para que se realice una oscilación completa.
- Frecuencia: Es el número de ondas que pasan por un punto dado del espacio en la unidad de tiempo. Es recíproco del periodo y de la longitud de onda. Es el número de oscilaciones que tiene lugar en un segundo.
- Longitud de onda: Es la distancia entre dos crestas o dos valles consecutivos de una forma de onda determinada. Los fenómenos electromagnéticos se caracterizan porque su velocidad de propagación es constante ( $c = 3 \times 10^8 \text{ m/s}$ ). La diferencia entre





los diversos tipos de radiación electromagnética está dada por los valores de dos parámetros: longitud de onda y frecuencia de la radiación, estos valores son recíprocos. Podemos clasificar los distintos tipos de radiación electromagnética desde las ondas de radio con longitudes de miles de kilómetros hasta las ondas de los rayos cósmicos, en el otro extremo del espectro, con longitudes de billonésimas de metro y por tanto con frecuencias altísimas del orden de  $10^{25}$  Hz, pasando por los rayos infrarrojos (10,000 a 760 nm), luz visible (760-380 nm), la radiación ultravioleta (380-180 nm), rayos X y rayos gamma (menos de 180 nm). El parámetro correspondiente a la longitud de onda es el usado habitualmente para catalogar los diversos tipos de radiación en el espectro electromagnético tanto por su uso más fácil en la zona en la que nos moveremos con láser como para no confundir la frecuencia propia de la radiación con la frecuencia de impulsos del emisor. Actualmente, los diversos tipos de laser se construyen en el campo de la luz visible y en el campo del infrarrojo cercano, con la peculiaridad de tener siempre fija su longitud de onda, la luz será monocromática [194] . Dentro de la luz visible conviene marcar las diferencias entre los diversos colores para facilitar su correcta situación dentro del espectro (Tabla 3. 1). La longitud de onda es medida en nanómetros (nm) y es visible en la gama de 400-700 nm. De tal manera que cuando se dice que el He-Ne emite en una longitud de onda de 632.8 nm será de color rojo y su absorción estará dada por las características de la luz roja. El láser de Nd-YAG, que emite en 1,060 nm de longitud de onda, estará ubicado en el campo del infrarrojo. La longitud de onda determina qué cromóforos absorben la luz. Dispositivos de TLBI están típicamente en el rango de 600-1000 nm, ya que como se explicara posteriormente existe una ventana óptica donde la absorción de la radiación es más factible para ciertas moléculas como COX, ya que substancias como la sangre, melanina y agua absorben muy poco en ese rango [195] [196] [197].

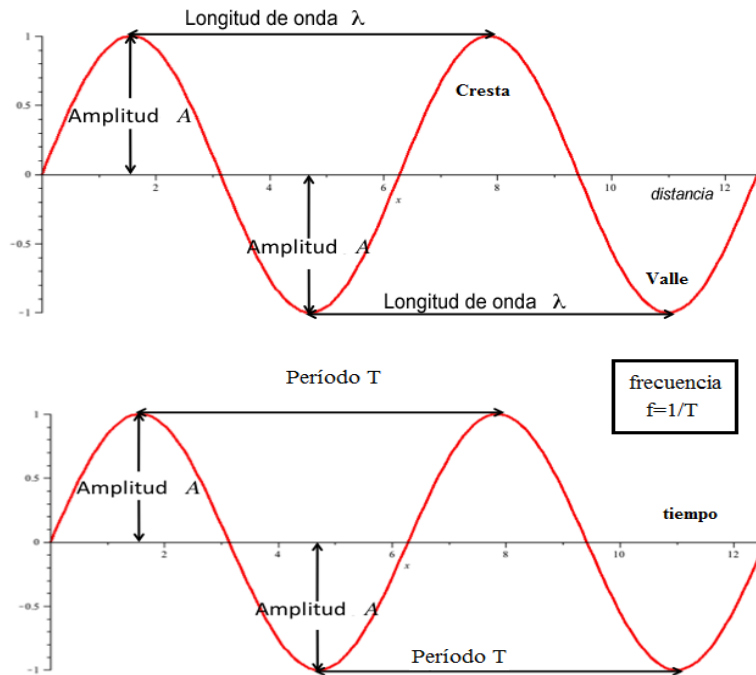


Figura 3. 6 Los parámetros de calibración de cualquier movimiento ondulatorio comunes a la emisión o producción de cualquier fenómeno ondulatorio electromagnético son: Amplitud, Periodo, Frecuencia y Longitud de onda [193].

Visible	$\lambda$ (nm)
Rojo	760
Naranja	630-600
Amarillo	600-570
Amarillo verdoso	570-550
Verde	550-520
Verde azulado	520-500
Azul	500-450
Violeta	450-380

Tabla 3. 1 Longitud de onda del espectro visible [194].



Parámetros aplicables a la TLBI [8] [12]:

- Irradiación: ( $W / cm^2$ ) A menudo llamada densidad de potencia (técnicamente incorrecto) y se calcula:

$$\text{Irradiación} = \frac{\text{Potencia(W)}}{\text{Superficie (cm}^2\text{)}}$$

- Energía (Julios= J); calculada como:

$$\text{Energía (J)} = \text{Potencia (W)} \times \text{tiempo (s)}$$

- Densidad de energía ( $J / cm^2$ ) Expresión común de "dosis" en TLBI.

$$\text{Densidad de energía} = \frac{\text{Energía (J)}}{\text{Área de aplicación (cm}^2\text{)}}$$

- Tiempo de irradiación (Segundos) tiempo de aplicación y prescripción de la TLBI.
- Intervalo de Tratamiento (Horas, días o semanas): La TLBI requiere generalmente al menos dos tratamientos a la semana durante varias semanas para alcanzar significación clínica, generalmente se aplica de acuerdo al progreso de la sanación.

### 3.6 Dosis de la terapia láser

La dosimetría en TLBI es muy complicada. El gran número de parámetros interrelacionados ha hecho que todavía no exista un estudio integral reportado que examine el efecto de variar todos los parámetros individuales, uno por uno, y hay que señalar que es poco probable que alguna vez un estudio de este tipo sea llevado a cabo. Este considerable nivel de complejidad ha significado que la elección de los parámetros dependa a menudo de la preferencia o “experiencia personal del experimentador o médico”, más que en una declaración de consenso por un organismo autorizado. La efectividad de la terapia láser se fundamenta en el aporte de suficiente energía para que mediante su absorción y transformación en los tejidos pueda generarse el proceso terapéutico [1].

Existen dos tipos de emisión de energía luminosa [8] [12]:

- 1) la continua
- 2) la pulsada

El cálculo de las dosificaciones variará de acuerdo al tipo de energía utilizada. Otro parámetro a tener en cuenta sería la potencia exacta de emisión que nos indica la energía que se entrega por segundos y está relacionada con el tipo de emisión y la potencia de salida del equipo. Su unidad de medida es el watt (W).

$$\text{Potencia (P)} = \text{Energía (E)} / \text{Tiempo (t)}$$

Por tanto, despejando la energía de la fórmula quedará:

$$\text{Energía (E)} = \text{Potencia (P)} \times \text{Tiempo (t)}$$

Si el láser emite en régimen continuo la energía sólo será identificada por su potencia de emisión, mientras que en los de régimen pulsado (**Figura 3. 7**) se necesitarán otros parámetros para conocer cuanta energía se aporta por segundo:

Parámetros de láser pulsado.

- Potencia pico (Pp)
- Duración del pulso (tp)
- Frecuencia de emisión (f)
- Potencia media (Pm )

Para el cálculo de la potencia media tenemos:

$$P_m = P_p \times t_p \times f$$

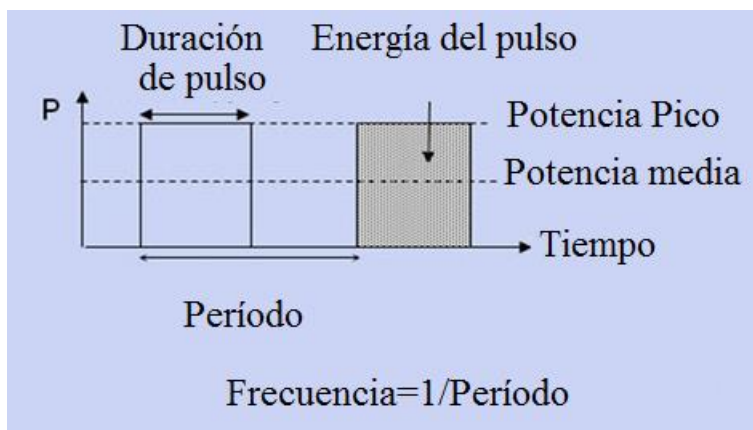


Figura 3. 7 Parámetros del láser pulsado



La eficacia terapéutica estará en dependencia de la cantidad de energía suministrada, del tipo empleado para ello, y por último, de la forma en que sea suministrada. Siempre se aconseja reducir las superficies de aplicación, por lo que si la zona a irradiar es muy amplia se realizan varios depósitos puntuales de energía a una distancia no mayor de los 2 ó 3 cm. para obtener la máxima eficiencia. Se debe tener siempre bien claro que la Energía (E) solamente depende del tiempo empleado y de la potencia de emisión utilizada, cuando se trata de Densidad de Energía (D.E.) esta dependerá de la superficie donde es depositada la energía, que viene determinada por el spot del emisor láser. Densidad de Energía (D.E): Es la relación existente entre la energía suministrada por un emisor láser y la superficie del spot (S) primario, no confundir con el área total de tratamiento. Se expresa en (Joules (J)/cm<sup>2</sup>) [11] .

$$D. E \left( \frac{J}{cm^2} \right) = \frac{P(W)}{S (cm^2)} \times t (s)$$

Si se quisiera saber el tiempo de tratamiento.

$$t (s) = \frac{D. E. \left( \frac{J}{cm^2} \right)}{P (W)} \times S (cm^2)$$

Para el caso del láser pulsado se maneja el concepto de Potencia Media (Pm) la cual es igual a: potencia de pico (p<sub>p</sub>) por tiempo del pulso en segundos (t<sub>p</sub>) por frecuencia (f).

Densidad de Energía (D.E):

$$D. E \left( \frac{J}{cm^2} \right) = \frac{[ P_p (W) \times t_p (s) \times f (Hz) ]}{S (cm^2)} \times t (s)$$

Si se quisiera saber el tiempo de tratamiento:



$$t (s) = \frac{D. E. \left( \frac{J}{cm^2} \right)}{[Pp (W) \times tp(s) \times f(Hz)]} \times S (cm^2)$$

### 3.6.1 Dosis bifásica

Un punto importante que ha sido tratado en múltiples estudios en cultivo celular en modelos animales y en estudios clínicos es el concepto de respuesta a la dosis bifásica, cuando el resultado es comparado con la densidad de energía total entregada de luz. Se ha encontrado que existe una dosis óptima de luz para una aplicación en particular, y valores de dosis más bajos y más altos de este valor óptimo tendrán un resultado terapéutico no favorable, pudiéndose incluso derivar en un daño. Evidencias sugieren que la densidad de energía es parámetro clave biológicamente para la eficacia de la terapia láser y puede operar con umbrales (es decir un umbral inferior y superior en los que la terapia láser sea efectiva, fuera de estos umbrales obtendremos resultados en el cual la terapia láser sea demasiado débil como para tener un efecto o tan intensa que la respuesta sea una inhibición del efecto requerido para la sanción [1]. Experimentos con ratas que han reportado los efectos de la dosis bifásica [198] [199] [200]: Muestras de hígado obtenidos quirúrgicamente de ratas radiadas previamente anestesiadas con dosis diarias de 1, 2, 4, 8, y 16 J/cm<sup>2</sup> durante 15 días emitidas por el láser AsGa equivalente a 904 nm, fueron procesadas para microscopía óptica, siendo estudiadas y sometidas a técnicas morfométricas utilizando aumentos de 1000<sub>x</sub>, con especial énfasis en cuantificar áreas de núcleos y nucleolos. El análisis de los resultados entre hepatocitos normales e irradiados revela que existen marcadas diferencias entre sus áreas tanto nucleares como nucleolares, concluyéndose que los efectos de estas dosis de radiación infrarroja provoca en los hepatocitos una drástica transformación en sus componentes y por ende en su funcionalidad, principalmente en lo relativo a la síntesis proteica, representando el efecto de estas estimulaciones sobre este tipo celular de elevado metabolismo. Se evidencia una directa relación entre dosis crecientes de láser infrarrojo asociado a una sostenida disminución en el área nuclear, y de igual manera se observa una relación directa entre el aumento de dosis infrarrojas con un evidente aumento de las áreas nucleolares, ambas observaciones logradas con una irradiación máxima de 8 J/cm<sup>2</sup>. Situación que se muestra en la (Tabla 3. 2) [198].



	NORMAL	1J/cm <sup>2</sup>	2J/cm <sup>2</sup>	4J/cm <sup>2</sup>	8J/cm <sup>2</sup>	16 J/cm <sup>2</sup>
ÁREA NUCLEAR	33	30	22	20	18	30
ÁREA NUCLEOLAR	3	10	11	13	10	9

Tabla 3. 2 Áreas nucleares y nucleolares correspondientes a hepatocitos de rata tanto normales como estimuladas con dosis crecientes de láser infrarrojo [198].

En hepatocitos irradiados con dosis infrarrojas superiores a 8 J/cm<sup>2</sup>, se observan notables modificaciones de las estructuras nucleares asociadas a síntesis proteica, manifestadas en un aumento del área nuclear y una disminución del área nucleolar, mientras que a nivel citosólico se visualiza disminución de las fracciones volumétricas de retículo endoplásmico rugoso y un aumento de las de glicógeno, todo lo cual se traduciría en una evidente inhibición de la actividad celular generada por estas estimulaciones infrarrojas elevadas. Las estimulaciones con láser infrarrojo, sobre hepatocitos de rata con dosis correspondiente a 8 y 16 Joules/cm<sup>2</sup> se evidencian en las (**Figura 3. 8 y Figura 3. 9**) respectivamente, y el análisis mediante microscopía electrónica de transmisión generan los siguientes datos morfométricos en relación a estructuras celulares asociadas a síntesis proteica. Considerando los datos derivados de la morfometría y cuantificando las fracciones volumétricas de retículo endoplásmico rugoso, mitocondrias e inclusiones de glicógeno se evidencia claramente que la dosis óptima de estimulación infrarroja corresponde a 8 J/cm<sup>2</sup> con la cual se observa una notable activación de la función celular (**Figura 3. 8**). Es observable que la dosis de 16 J/cm<sup>2</sup> utilizada, genera en el hepatocito una notable disminución y variadas modificaciones en las estructuras celulares asociadas a síntesis proteica, manifestadas a nivel nuclear en una disminución del área nucleolar, mientras que a nivel citosólico se visualiza disminución de las fracciones volumétricas de retículo endoplásmico rugoso y mitocondrial, además, de un aumento del glicógeno. Todo lo cual se traduciría en una evidente inhibición de la actividad celular generada por estas estimulaciones infrarrojas [198] [199] [200].

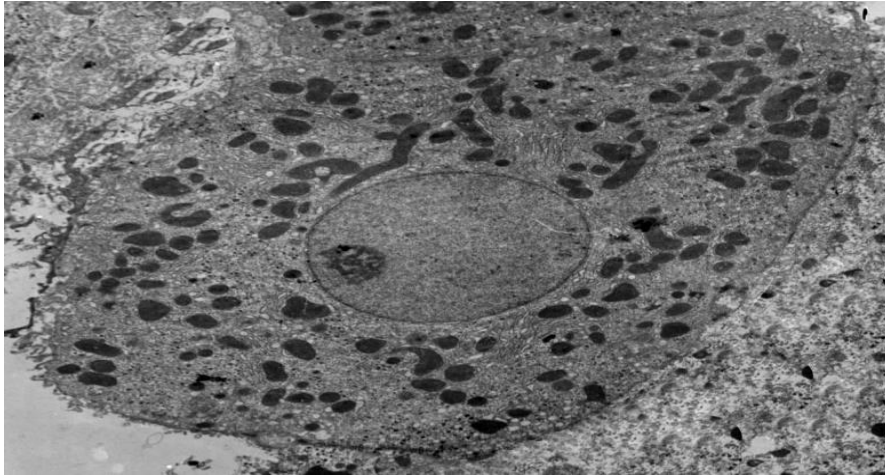


Figura 3. 8 Microfotografía electrónica de hepatocito de rata estimulado con dosis de láser infrarrojo correspondiente a  $8 \text{ J/cm}^2$ .  $8500 \times$  [198].

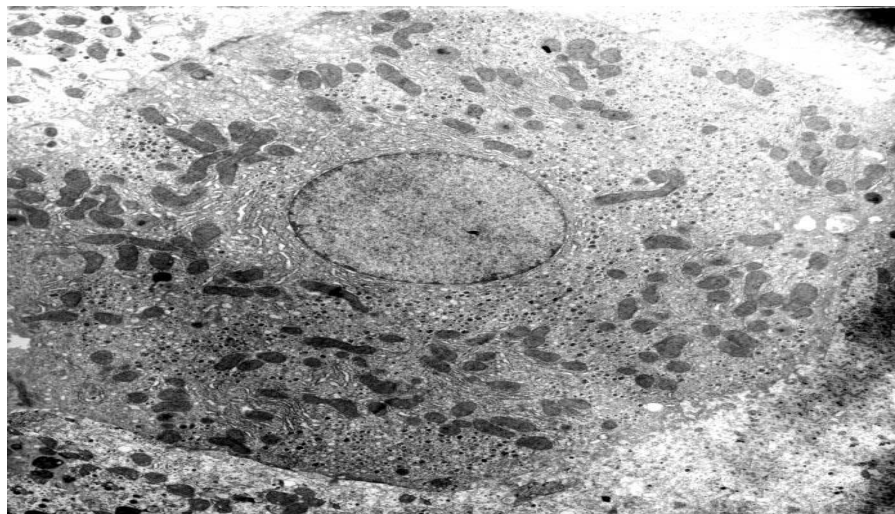


Figura 3. 9 Microfotografía electrónica de hepatocito de rata estimulado con dosis de laser infrarrojo correspondiente a  $16 \text{ J/cm}^2$ ,  $8500 \times$  [198].





### 3.7 Formas de aplicación de la TLBI

En la práctica médica existen 3 formas de aplicación de la TLBI :

1. Local: directamente en la zona afectada, que de acuerdo con su extensión requerirá uno o más punto de aplicación. La aplicación local se realiza en contacto directo y perpendicular entre el dispositivo aplicador y el tejido afectado. En los únicos casos en que no debe aplicarse el contacto directo es cuando la lesión es húmeda (herpes simple, úlceras varicosas, fístulas, etc.) o cuando el tejido afectado es una mucosa (faringitis, gingivitis, rinitis, etc.). En estos casos basta separar el aplicador pocos milímetros del tejido a tratar.
2. Laserpuntura: es decir, aplicación del láser en los puntos de acupuntura considerados por la medicina tradicional.
3. Zonas Trigger: son zonas del cuerpo humano dotadas de una inervación particularmente rica, coinciden con los puntos motores de mejor respuesta eléctrica. Se detectan a la palpación como zonas hipertensas, hipersensibles al dolor, inflamadas y, con frecuencia, fibrosadas cuando el proceso se ha cronificado excesivamente. Reciben el nombre de trigger por generar dolor reflejo a distancia del punto de presión. Existen mapas de las zonas sobre las que se reflejan las molestias o dolor referido. Dichos mapas son relativamente fiables ya que, en la práctica, el mismo punto puede inducir su manifestación hacia una localización y otras veces para otra. A fin de ponerlos de manifiesto se aplica una presión moderada sobre el punto e inmediatamente aparecerá un aumento de dolor local, que será seguido por la sensación de entumecimiento doloroso sobre su zona de influencia. Para comprobar lo dicho, basta con localizar los mismos puntos sobre ambos trapecios en un paciente con problemas de cuello. Observaremos como en el lado en el que el paciente manifieste irradiaciones o radiculalgias, el reflejo doloroso se manifiesta distal (hacia el brazo). El mismo punto del trapecio opuesto, genera su respuesta hacia proximal (sobre el cuello y cabeza). La respuesta del segundo caso se debe a la sobrecarga que soportan los antagonistas a la lesión como actitud de defensa protectora del lado del pinzamiento radicular [201].

Por lo general, en la práctica cotidiana, se combinan las 3 formas de aplicación según los cuadros clínicos que se necesitan tratar, las frecuencias con que se realizan las aplicaciones del láser variarán de acuerdo con la patología; se ha demostrado, que al inicio, el tratamiento con láser, es más eficaz en sesiones seguidas (3 por semana, en dosis moderadas). Luego pueden distanciarse en el tiempo, llegando a alcanzar de 15 a 20 sesiones en días intercalados, según se vean los resultados. Hoy día la TLBI se aplica cada vez más en distintas afecciones médicas, ya sea como único tratamiento o en combinación



con otros métodos físicos o medicamentosos. La energía de la TLBI, se aplica en 2 formas: forma continua y otra de forma pulsada. La potencia terapéutica de estos dos tipos de láseres se encuentra dentro del rango de los mW, realizándose cálculos de dosificación de formas diferentes. Cuando vamos a aplicar el láser es necesario conocer qué energía emite el equipo, para hacer un buen cálculo de la densidad de energía [12] [152] [182].

### 3.8 Tecnología del láser utilizado en medicina.

Según las aplicaciones y utilización que pueden encontrar en el campo de la medicina, podemos clasificar los distintos sistemas láser en dos grandes grupos [182]:

1. Laser quirúrgico potencias superiores a 50 W (laser de alta potencia)
2. Laser terapéutico (considerado láser de baja intensidad (Utilizan potencias menores de 100 mW; de forma puntual).

La clasificación de estos láseres de acuerdo al tipo de medio emisor será como sigue [182]:

1. Laser con gas:
  - a. De mezcla de gases atómicos (He-Ne)
  - b. Moleculares (CO<sub>2</sub>)
  - c. De átomos ionizados (Ar, Kr, Xe)
2. Laser en estado sólido: En ellos se introduce una especie atómica de comportamiento meta estable, como aditivo en un vidrio o cristal: es el caso del Nd que se introduce en el YAG (Itrio, Aluminio, Granate)
3. Laser químico: Como el de fluoruro de hidrogeno. Poco utilizado en medicina.
4. Laser diodo o de semiconductores: El más utilizado es el de arseniuro de galio y aluminio.

A continuación se mencionaran los más usuales [182] [1] [194]:



### El láser de helio-neón

Es uno de los tipos más empleados en la terapéutica médica. Las características de su emisión son las siguientes: Emite continuamente con una potencia que puede oscilar entre 1 y 50 mW, dependiendo de las dimensiones del tubo emisor. En medicina se utiliza normalmente con potencias alrededor de 10 mW, según las aplicaciones específicas, como pueden ser, los tratamientos en cavidades, problemas del sistema musculo-esquelético o tratamientos de la piel. La característica de absorción de este láser rojo por la epidermis, lo hace un método excelente de laserterapia dermatológica.

### El láser de CO<sub>2</sub>

Es un láser de gas tipo molecular que emite continuamente en potencias que van de los 10 a los 100 watts. Emite con una longitud de onda de 10600 nm, lo que lo sitúa dentro del espectro de la radiación infrarroja lejana. Por esta razón goza de una alta absorción por el agua, produciéndose, tras la misma, un efecto muy rápido de calentamiento tisular, lo que será de gran aplicación en cirugía como laser-bisturí, su alto efecto térmico le permite volatilizar con gran rapidez el tejido irradiado, empleándose con gran frecuencia en cirugía oncológica, neurocirugía, dermatología, etc.

### El láser de argón

Es un tipo de laser de átomos ionizados. Emite con una longitud de onda de 488 nm (azul) y 514 nm (verde). Por esto tendrá una absorción selectivamente alta por el tejido hemático por lo que utilizándolo en potencias de entre 5 y 25 watts, le permitirá una actividad coagulante significativa sobre lesiones muy irrigadas o pigmentadas, en dermatología; nervios, angiomas planos, tatuajes; en oftalmología, tratamiento de diversas lesiones en retina.

### El láser de Neodimio-Yag



Junto con el de CO<sub>2</sub> y el de argón, es otro de los tres típicos láseres quirúrgicos. Emite en una longitud de onda de 1,060 nm y por lo tanto se incluye en la esfera del infrarrojo cercano. Sus potencias están próximas a los 100 watts, siendo un clásico laser de coagulación en cirugía general. Su transmisión por fibra óptica adaptable a diversos endoscopios le ha permitido un amplio campo de aplicación en cirugía endoscópica, urología, gastroenterología, neumología, neurocirugía, etc.

#### El láser de Diodo

Es una de las formas más recientes y de gran actualidad para la producción de radiación laser, debido a las características intrínsecas de los semiconductores. Como es sabido, un material semiconductor se transforma en un diodo con la creación de una unión entre el material P (+) y el material N (-), dentro de un cristal durante el proceso de manufactura. Los electrones solo pueden pasar del uno al otro lado en una dirección. Mediante el manejo de una corriente eléctrica continua, aplicando el polo negativo al lado N y el positivo al lado P, se puede conseguir la inversión de la población, la descarga energética de los electrones de modo sincrónico y la aparición de la radiación láser en la superficie de contacto. Estos láseres son compactos, sencillos y muy eficaces. Su rendimiento en relación a la corriente de alimentación llega a ser cercano al 100%. Emiten generalmente en la gama del rojo e infrarrojo. Aunque estos láseres entraron en funcionamiento en 1962. Actualmente son útiles en la práctica médica. Como ejemplo, equipos comerciales de la marca Omega los cuales son utilizados en el Instituto Nacional de Rehabilitación, en la ciudad de México, dejan ver en sus catálogos [202] equipos de TLBI con potencias menores a 100 mW, los cuales usan diodos como medio de emisión láser en el rango de 600 a 1000 nm [203] [204] [205].

### 3.9 Primeras aplicaciones de la Terapia láser de baja intensidad

Las primeras publicaciones sobre la TLBI aparecieron hace más de 30 años. Desde entonces, aproximadamente más de 2000 estudios han sido publicados en este aún controversial tema [206]. En los años 1960 y 1970, los médicos en Europa del Este, y especialmente en la Unión Soviética y Hungría, desarrollaron activamente la bioestimulación láser. Sin embargo, los científicos de todo el mundo albergan un escepticismo abierto acerca de la credibilidad de los estudios que indican que la radiación del láser de baja intensidad actúa directamente sobre un organismo a nivel molecular. Los partidarios de los países occidentales, como Italia, Francia y España, así como Japón y China también adoptaron y desarrollaron este método, pero fuera de la medicina convencional [15] [207]. En 1967, pocos años después de que el primer láser de trabajo fue inventado, en Hungría, Endre Mester quien es considerado el padre de la



biofotoestimulación [208], quiso probar si la radiación láser podría causar cáncer en ratones. Por lo que afeitó el pelo dorsal de varios ratones, los dividió en dos grupos, y a uno de los grupos les aplico un tratamiento con un láser de rubí de baja potencia (694nm). No consiguiendo el cáncer y para su sorpresa el pelo en el grupo tratado se regenero en un menor tiempo comparado con el grupo no tratado, siendo esta la primera demostración de " bioestimulación láser". Mester pronto aplicó sus descubrimientos en pacientes humanos, aplicando el láser en el tratamiento de pacientes con úlceras en la piel que no sanan. Desde entonces, tratamientos médicos con fuentes coherentes de luz (láser) o fuentes de luz no coherente que consisten en lámparas filtradas o diodos emisores de luz (LED) se han extendido en todo el mundo.

Actualmente, la TLBI, es también conocida como [1]:

- Láser frío
- Láser suave
- Láser de bioestimulación
- Láser de fotobiomodulación
- Láser Blando
- Láser de acupuntura

La TLBI en nuestros días es ahora un procedimiento terapéutico que se utiliza para [2] [182] [12] [1]:

- 1) reducir la inflamación, edema y trastornos articulares crónicos
- 2) para promover la curación de heridas
- 3) para el tratamiento de trastornos neurológicos y del dolor.

### 3.10 Controversia de la Terapia láser de baja intensidad

La TLBI se practica de forma rutinaria como parte de la terapia física y la investigación. Aunque TLBI ahora se utiliza para tratar una amplia variedad de dolencias, su uso como terapia sigue siendo controvertido por dos razones principales: en primer lugar, sus mecanismos bioquímicos subyacentes siguen siendo poco conocidos, por lo que su uso es en gran medida empírico. En segundo lugar, un gran número de parámetros tales como la longitud de onda, frecuencia, potencia, duración de pulso, y el diámetro del spot de la luz aplicada, deben ser elegidos para cada tratamiento. Una opción menos que óptima de parámetros puede resultar en reducción de la eficacia del tratamiento, o incluso un resultado



terapéutico negativo. Como resultado, muchos de los resultados publicados en la TLBI incluyen resultados negativos simplemente debido a una elección inapropiada de la fuente de luz y la dosis. [209] [210] [211] [212]. El escepticismo acerca de los beneficios de los equipos de TLBI, no permitía su autorización como equipo terapéutico, estos equipos se autorizaron para su comercialización por la FDA en 1999, a través del proceso de notificación previa a la comercialización / 510 (k), autorizándolos solo como dispositivos complementarios para el alivio temporal del dolor, algunos indicados para su uso en el alivio temporal de la mano y dolor en la muñeca, asociados con el síndrome del túnel carpiano. Estas autorizaciones se basaron en la presentación de datos clínicos para apoyar tales afirmaciones, en el 2002 y 2007 se aprobó su uso también para el dolor de cuello y regeneración de cabello en hombres y mujeres [213]. En la actualidad son muchos los estudios que demuestran los efectos benéficos de la TLBI, por lo que las investigaciones recientes se centran en resolver 2 preguntas principalmente a nivel biológico [212]:

1. ¿cómo la energía de los láseres terapéuticos funcionan a nivel celular y del organismo?
2. ¿cuáles son los parámetros de la luz óptima para los diferentes usos de estas fuentes de luz?

Teniendo en cuenta que los niveles óptimos de densidad de energía entregada en la TLBI son bajos en comparación con otras aplicaciones del láser que se practican para ablación, corte y coagulación térmica de tejido. En general, las densidades de potencia utilizadas para la TLBI son menores que las necesarias para producir un calentamiento del tejido, menos de  $100 \text{ mW/cm}^2$  dependiente de la longitud de onda, tipo de emisión (continua o pulsada) y del tipo de tejido [1] [2] [182] [12] [1]. En la actualidad el uso de la TLBI en fisioterapia y rehabilitación es utilizada por varias especialidades médicas, entiéndase fisioterapia como forma alternativa terapéutica no farmacológica, para paliar síntomas de múltiples dolencias, tanto agudas como crónicas, mediante el uso de calor, frío, luz, agua, masaje y electricidad, a sí mismo la rehabilitación es la acción de "habilitar de nuevo o restituir a alguien o algo a su antiguo estado". Existen muchos casos tributarios de la TLBI, aunque las mejorías atribuidas a esta terapéutica no han sido del todo comprobadas. Diversas explicaciones se han dado a la TLBI, entre ellas se encuentran un efecto placebo y/o térmico. Los efectos de la TLBI en diversas áreas de la salud aún se encuentran en proceso de investigación, incluyendo el metabolismo celular [212].

### 3.11 Aplicaciones médicas con Terapia láser de baja intensidad

En la actualidad la TLBI es utilizada por los fisioterapeutas para tratar una amplia variedad de dolores musculoesqueléticos agudos y crónicos, por los dentistas para tratar la



inflamación de los tejidos orales y para curar diversas ulceraciones, por dermatólogos para tratar el edema, úlceras indolentes, quemaduras y dermatitis, por los reumatólogos para aliviar el dolor y tratar inflamaciones crónicas y enfermedades autoinmunes, en las clínicas de medicina deportiva y rehabilitación para reducir la hinchazón y hematoma, aliviar el dolor, mejorar la movilidad, y tratar las lesiones de tejidos blandos agudos y por otros especialistas, como la medicina veterinaria especialmente en centros de formación de caballos de carreras. Varios libros ofrecen detalles de las aplicaciones clínicas y técnicas utilizadas [206] [214] [215] .

A continuación se mencionan algunas de las aplicaciones de la TLBI en diferentes ámbitos médicos.

- **Dermatología:** La fácil accesibilidad de la piel a la iluminación y los resultados visibles de la terapia han dado lugar a varias indicaciones dermatológicas siendo investigadas por la TLBI.
- **Regeneración del cabello:** Desde la primera publicación pionera de (Mester et al. 1968) informando de la estimulación del crecimiento del pelo en ratones, no ha habido prácticamente estudios de seguimiento sobre la estimulación TLBI para el crecimiento del cabello en modelos animales. Sólo ha habido unos pocos informes en la literatura que contiene algunas observaciones de crecimiento del cabello inducida por la TLBI en pacientes, mejora o tratamiento de cualquier tipo de alopecia, informes que indican mayor flujo sanguíneo en el cuero cabelludo, estudios doble ciego indicando mejoras en los grupos tratados con TLBI, y la realización de un dispositivo clínico láser haircomb diseñado para entregar 665 nm de luz láser en el cuero cabelludo de los hombres con alopecia androgénica.
- **Terapia para Acné:** El acné vulgaris es uno de los trastornos dermatológicos más comunes encontrados en la práctica cotidiana. Recientemente, ha habido algunos informes que una combinación de luz azul y luz roja es efectiva en el tratamiento del acné, debido a que la porfirina producida por acné, *Propionibacterium* absorbe luz azul que mata a las bacterias y la luz roja a 633 nm ejerce una acción inflamatoria por biofotomodulación para disminuir la severidad de las lesiones de acné.
- **Reducción de arrugas:** Se tienen reportes de formación de colágeno nuevo formado 12 semanas después del tratamiento con un láser pulsado de pigmento a 585 nm, así como una reducción significativa de arrugas (máximo: 36%) y aumento en la elasticidad de la piel (máximo: 19%) en comparación con el valor basal y grupos tratados en la cara con TLBI. También se ha encontrado que



fototerapia LED a 633nm es un método eficaz para el rejuvenecimiento y para activar el sistema inmunológico local de la piel. El uso de un láser LED a 590nm para reducir el eritema facial producido después de someterse a la acción láser fraccional en cara completa con un láser de fibra dopada de erbio a 1550nm.

- Curación de Heridas: Durante muchos años la TLBI ha sido probada en cuanto a si puede estimular la cicatrización de heridas en una variedad de modelos animales, pero la bibliografía contiene una gran cantidad de estudios tanto positivos como negativos. Sin embargo, un meta-análisis de las publicaciones en la TLBI para la cicatrización de heridas [169]. Llegó a la conclusión de que "la terapia con láser es una herramienta eficaz" para promover la curación de heridas.

La lista es larga por lo que a continuación se dará una lista breve de la aplicación TLBI de acuerdo a cada especialización médica:

- En otorrinolaringología: las sinusopatías de causa infecciosa o alérgica, rinitis alérgica, faringitis, amigdalitis, hipoacusia y sordera súbitas, acúfenos de causa vascular, otitis media y traumatismos de la oreja.
- En ginecología: cervicitis, ectopias, bartolinitis, vulvitis, úlcera vulvar, raias, mastitis, displasia mamaria, inflamación pélvica y herpes genital.
- En neurología: parálisis facial, neuralgia del trigémino, neuralgia intercostal y neuritis posherpética.
- En caumatología: úlceras por quemaduras y quemaduras por fricción.
- En angiología: úlcera vascular, trombosis venosa y mal perforante plantar.
- En proctología: fisura anal, trombosis hemorroidal, hemorroides externas y quiste pilonidal operado.
- En estomatología: gingivitis, alveolitis, aftas bucales, posimplantes de dientes, síndrome de la articulación temporomandibular, absceso periodontal y trismo.
- En cirugía: heridas dehiscentes, granuloma a cuerpo extraño, cicatrices y queloides recientes, sufrimiento de piel y cicatrices poscirugía estética, úlceras por presión, forúnculos, abscesos y paroniquia.
- En ortopedia y traumatología: epicondilitis, epitrocleítis, tendinitis, cervicalgia, cervicobraquialgia, bursitis, hombro doloroso, sacrolumbalgia, gonalgia (rodilla dolorosa), fascitis plantar, espolón calcáneo, síndrome posfracturas, ganglión del carpo, túnel carpiano (STC), dedo en resorte, enfermedad de Dupuytren, esguinces, trocanteritis, síndrome del piriforme, dorsalgia, distensión o desgarró muscular, y muchas otras afecciones del sistema osteomioarticular (SOMA) que cursen con inflamación y dolor.





- En Urología: balanitis, orquitis, epididimitis, enfermedad de Peyronie y herpes genital.
- En Dermatología: herpes simple, herpes zoster, acné inflamatorio, acné rosácea, micosis superficial, dermatitis o eczemas, piodermatitis, forúnculos, alopecia areata reciente.
- En medicina tradicional (laserpuntura y laserauriculopuntura): migraña, neuralgias, asma bronquial, estrés, parálisis de Bell, afecciones del SOMA, afecciones ORL y afecciones oculares (glaucoma, miopía, diplopía, conjuntivitis y afecciones del nervio óptico) [206] [214] [215] [3] [1] [182] [212] .

### 3.12 Mecanismos biofísicos y bioquímicos por los que se explican los efectos de la Terapia láser de baja intensidad.

#### 3.12.1 Los fotorreceptores y cromóforos celulares

La primera ley de la Fotobiología establece que para que la luz pueda tener algún efecto en un sistema biológico vivo, los fotones tienen que ser absorbidos por bandas de absorción electrónicas pertenecientes a algunos cromóforo o foto aceptores moleculares. Puede haber uno o más cromóforos que conlleven a la multitud de efectos biológicos en respuesta a la TLBI [1] [11] [190].

#### 3.12.2 Fotobiología y Óptica del Tejido en Terapia láser de baja intensidad

Para entender como interactúa la radiación láser IR cuando es aplicada superficialmente en la piel del paciente, tendremos primero que entender las propiedades ópticas del tejido. Tanto la absorción y el esparcimiento de la luz en el tejido son dependientes de la longitud de onda (ambas mucho más grande en la región azul del espectro que el rojo) y los principales cromóforos (foto aceptores) tisulares que son la hemoglobina y melanina (Figura 3. 10), tienen unas altas bandas de absorción en longitudes de onda más cortas que 600 nm. El agua comienza a absorber de manera significativa a longitudes de onda superiores a 1150 nm [11] [1] [8] . La absorción es el proceso más importante de interacción de la luz, aunque no es el único, Cuando una luz láser choca contra la piel, hay cuatro posibles interacciones: reflexión, esparcimiento,

absorción, transmisión [152] . En el caso de los láseres utilizados en cirugía, la radiación láser absorbida se convierte en mayor o menor medida en calor, que causa elevación de la temperatura local. Dependiendo de la cantidad de calor producido, el tejido puede incluso coagularse o vaporizarse. Es más probable la generación de calor en las proximidades de la superficie del tejido que a mayor profundidad, debido al descenso exponencial de la intensidad del rayo a medida que penetra en el tejido y a la acción inmediata del proceso de absorción. No obstante, la absorción sólo puede producirse en presencia de un cromóforo [8]. La TLBI se aplica en un rango de longitud de onda llamado ventana óptica del tejido cubriendo las longitudes de onda roja e infrarroja cercana (**Figura 3. 11**), donde la penetración eficaz de la luz en el tejido se maximiza ya que la absorción por la melanina, agua y oxihemoglobina es muy pobre, pudiendo ser mayormente absorbida por otras moléculas como COX [1] [152], por lo tanto, aunque la luz azul, verde y amarillo pueden tener efectos significativos sobre las células que crecen en un medio de cultivo ópticamente transparente, el uso de la TLBI en animales y pacientes implica casi exclusivamente la luz roja e infrarroja en el rango de 600 a 1000 nm, con lo cual también se evita un efecto térmico considerable, de ahí el nombre de láser frío, ya que no se registran aumentos de temperatura [216] [152] [1].

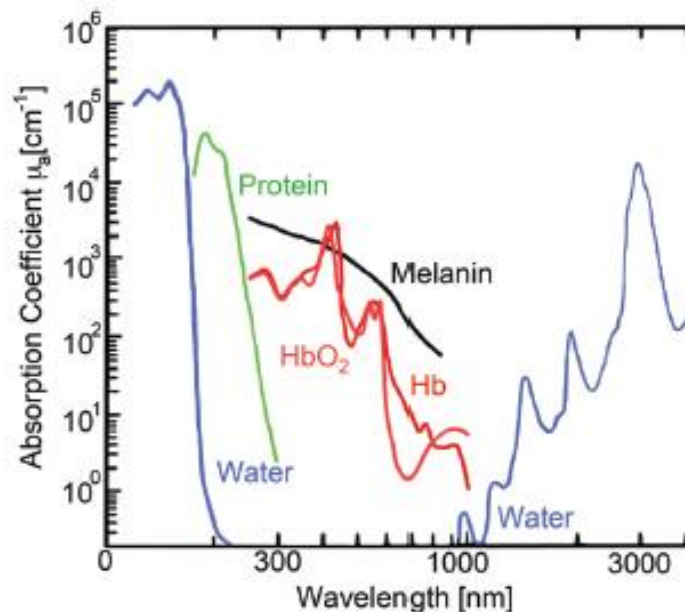


Figura 3. 10 Coeficientes de absorción de componentes típicos absorbentes de luz, en el tejido del melanoma. [217]

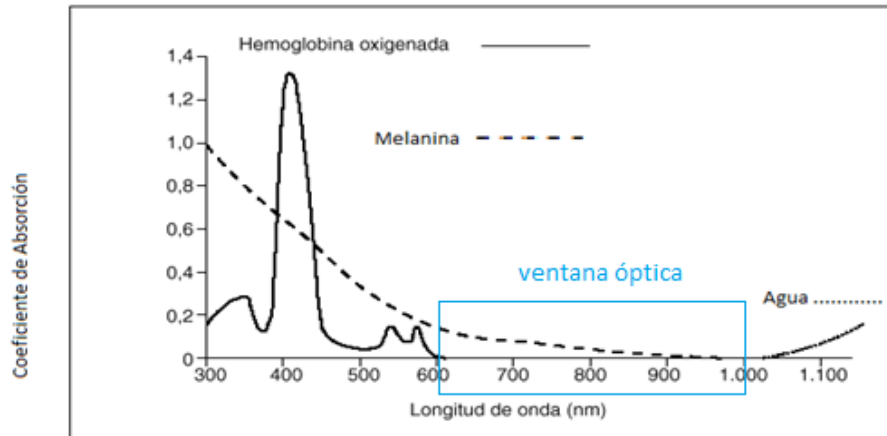


Figura 3. 11 ventana óptica del tejido donde la penetración eficaz de la luz roja e infrarroja 600 a 1000 nm en el tejido se maximiza ya que la absorción por la melanina, agua y oxihemoglobina es muy pobre, modificada de [152] .

La absorción de la radiación láser por las moléculas fotorreceptoras desencadenaría todo un conjunto de respuestas en las células de la zona tratada. Tras la absorción de la luz por algún cromóforo se pueden producir una serie de procesos que se dividen en radiativos y no radiativos [218] [219] [16] [220]. En los procesos radiativos, los cromóforos, después de su excitación vuelven a su estado inicial debido a la emisión de luz, procesos como la fluorescencia. En los procesos no radiativos, la energía de los fotones absorbidos se convierte en otro tipo de energía, dando lugar a fenómenos fotoquímicos o térmicos [16]. En el caso de efectos térmicos dependientes de la longitud de onda, e intensidad del láser, se produce un calentamiento de la zona irradiada y de las zonas adyacentes y puede dar lugar a una hipertermia, desnaturalización de proteínas, fotocoagulación, vaporización, carbonización, etc; Tal es el caso de los láseres empleados en cirugía de tipo ablación cutánea 10600 nm potencias superiores a 40 W [8]. Se dice que los efectos de la TLBI son mayormente bioquímicos y consisten en el aumento del metabolismo celular bien por activación de la cadena respiratoria, bien por activación de fotorreceptores no mitocondriales. Cuando la luz absorbida se transforma en energía química, modifica algún cromóforo de forma transitoria o permanente y este hecho activa todos los procesos fotobiológicos inherentes a la TLBI (600 a 1000 nm con potencias menores de 100 mW) [219] [220]. Actualmente las investigaciones se centran en la enzima COX oxidasa, en especies reactivas del oxígeno, y especies reactivas del óxido nítrico que interactúan con la cadena respiratoria celular [218] [219] [80] [1] [212]. Así mismo se dice que los tejidos que fisiológicamente se encuentran en condiciones patológicas, presentan una mejor respuesta a la aplicación de la TLBI [221] [9]. La (Figura 3. 12) muestra las propiedades ópticas de la luz láser cuando choca contra la piel [152].

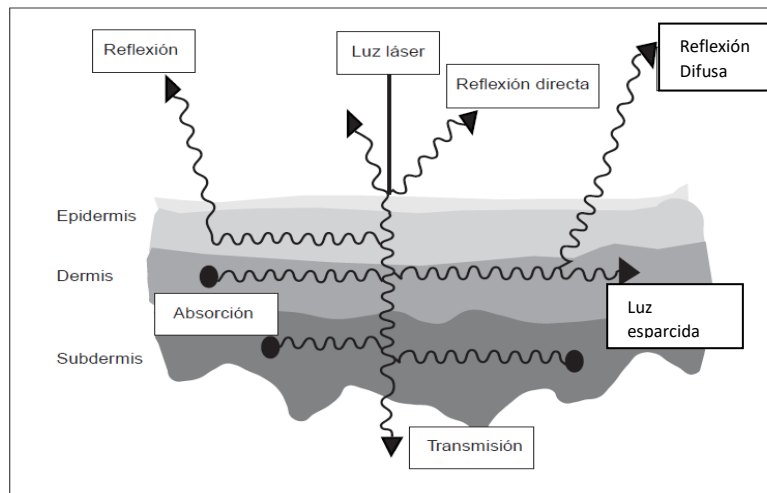


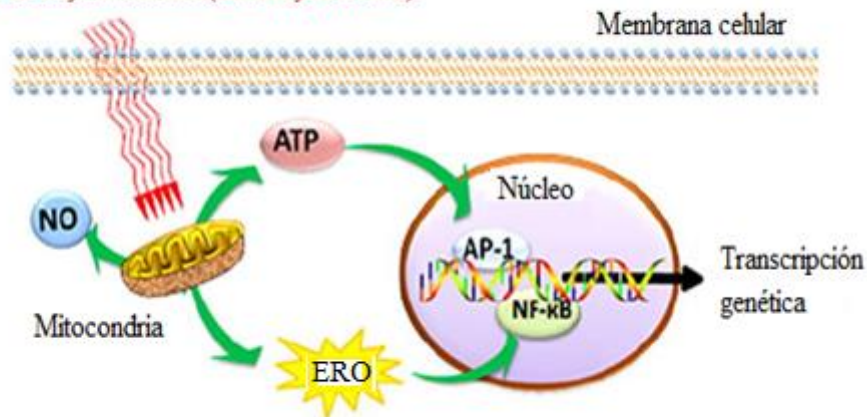
Figura 3. 12 Cuando una luz láser choca contra la piel hay cuatro posibles interacciones, reflejadas en este diagrama modificada de [152].

Solamente el 4-7% de la luz es reflejada por la piel. Ni la luz reflejada ni la luz transmitida tiene efecto tisular [222]. Las longitudes de onda por debajo de 300 nm tienen una fuerte absorción por las proteínas, la melanina, el ácido urocánico y el ADN. Las longitudes de onda mayores de 1300 nm poseen una penetración superficial a pesar de su gran longitud de onda, teniendo una fuerte absorción por el agua, que es el cromóforo dominante al final del espectro [223]. Para tener una idea de la dificultad de adecuar la longitud de onda al cromóforo específico, tomemos el ejemplo de la hemoglobina. Como se puede observar en la (Figura 3. 11), la hemoglobina tiene un pico de absorción a los 420 nm, pero la longitud de onda es demasiado corta para el tratamiento de lesiones vasculares cutáneas; además, la penetración a esta longitud de onda es de sólo 100  $\mu\text{m}$ , que es la región de la unión dermoepidérmica. Para obtener un efecto biológico en los vasos dérmicos, es necesario penetrar más profundamente con una longitud de onda mayor. El pico de absorción de la hemoglobina a 577 nm es una opción mucho mejor, ya que esta longitud de onda penetra más profundamente y es menos absorbida por la melanina epidérmica, dando lugar a menos alteraciones de la pigmentación, posteriores al tratamiento, observados comúnmente con el láser de argón, el cual tiene una longitud de onda cercana a los 400 nm, aun cuando la absorción de la luz láser por la hemoglobina es sensiblemente menor que el pico a 420 nm [152].

### 3.12.3 Mitocondrias y Terapia láser de baja intensidad

Dentro de la célula, hay una fuerte evidencia para sugerir que la TLBI actúa sobre la mitocondria [224], aumentando la síntesis de Adenosintrifosfato (ATP) [225], modulando la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), e induciendo factores de transcripción [226] [212]. Varios factores de transcripción son regulados por cambios en el estado redox celular, entre estos el factor-1 redox, activador dependiente de la proteína-1 (AP-1) (un heterodímero de c-Fos y c-Jun), factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), p53, activación del factor de transcripción / proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP (ATF / CREB), el factor inducible por hipoxia (HIF) -1, y el factor HIF. Estos factores de transcripción entonces causan la síntesis de proteínas que provocan más efectos en cascada, tales como el aumento de proliferación y migración celular, modulación en los niveles de citoquinas, factores de crecimiento, mediadores inflamatorios, y el aumento de oxigenación tisular [227] [1]. La **(Figura 3. 13)** muestra los mecanismos celulares y moleculares propuestos de la aplicación de radiación láser IR, donde se muestra la absorción de radiación con longitud de onda (600-1000 nm) por los cromóforos o fotoaceptores localizados en zonas específicas de la mitocondria celular, lo cual provocara que durante el proceso de la respiración celular en las mitocondrias se incremente la producción de ATP, se generen especies reactivas de oxígeno (ERO); el óxido nítrico sea liberado del COX y todas estas respuestas citosólicas puedan a su vez inducir cambios transcripcionales a través de la activación de factores de transcripción (por ejemplo, NF- $\kappa$ B y AP1) [227] [1] [2].

Terapia láser de baja intensidad (Infrarrojo cercano).



**Figura 3. 13** Mecanismos celulares por la aplicación de radiación roja e infrarroja emitida por los equipos de TLBI [2].



### 3.12.4 Terapia láser de baja intensidad (TLBI) y el COX oxidasa (COX)

Se ha propuesto que la radiación IR es la causante de la alteración de las propiedades redox a nivel celular por la fotoexcitación de la molécula COX oxidasa (COX), alterando consecuentemente la relación del flujo de electrones en la cadena respiratoria, esta hipótesis surge porque espectros de absorción obtenidos para COX en diferentes estados de oxidación, se registraron y se encontraron muy similares con los espectros de acción para las respuestas biológicas a la radiación en luz. Se propuso que COX es el fotoceptor primario de la radiación en el rango cercano al infrarrojo, en células de mamífero [228] [1] [2] [218] [219] [16] [220]. La mayoría de los citocromos son muy difíciles de purificar pues están embebidos en las membranas, excepto (COX) que puede ser aislado mediante disoluciones salinas [229], lo cual se muestra en una gráfica de absorbancia (Relación logarítmica entre la intensidad de la luz que incide sobre una muestra y la intensidad de esa misma luz que es transmitida a través de esa muestra, la absorbancia a su vez puede ser modificada por la concentración de la muestra, todo esto ya explicado en el capítulo 2.6 ) vs longitud de onda, en la **Figura 3. 14**. En la membrana interna mitocondrial de animales superiores, hay por lo menos 5 citocromos: b,c,c1, a, a3.

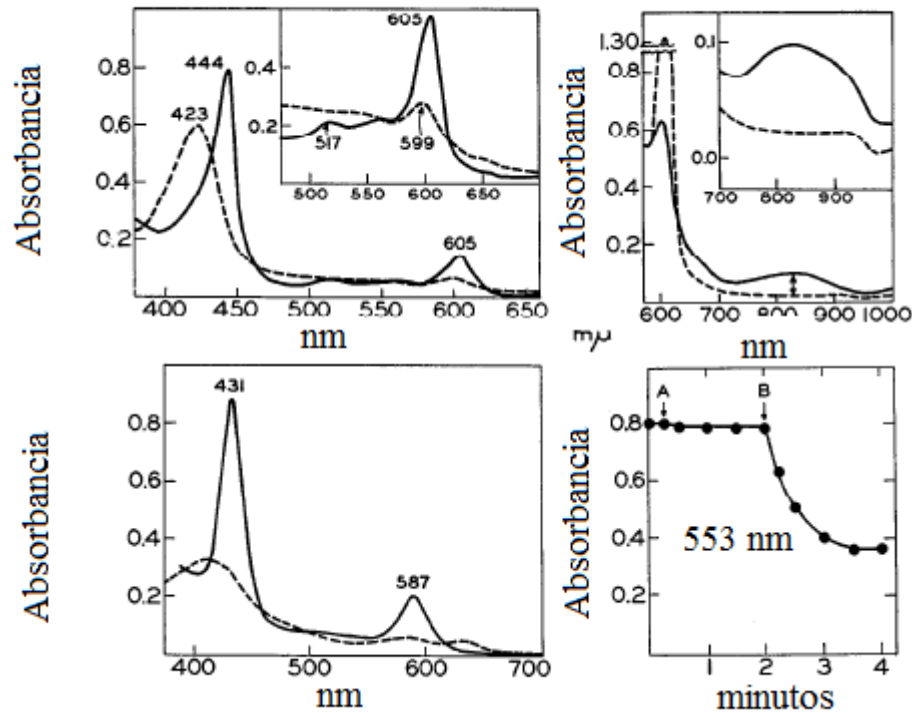


Figura 3. 14 Espectros de absorción del citocromo oxidasa en diferentes soluciones para su purificación, la línea punteada representa Cox en disolución, la figura en el tiempo representa que diferentes concentraciones de Cox fueron añadida.

Basados en espectros de acción, asociados a Cox y radiación IR, varias longitudes de onda pueden ser utilizadas alrededor de 404, 620, 680, 760 y 820 nm [230]. Experimentos in vitro indican que la irradiación de infrarrojos invirtió la reducida actividad de COX producida por el bloqueo de voltaje dependiente de canales de sodio con tetrodotoxina sobre-regulando la actividad de COX en células neuronales primarias. Se ha demostrado que las neuronas de la retina de rata al ser irradiadas por radiación cercana al infrarrojo son protegidas del daño inducido por intoxicación de ácido fórmico, el cual inhibe Cox. La radiación R e IR mayormente, incrementa la actividad de COX con lo cual un aumento polarográficamente medido en el consumo (absorción) de oxígeno fue observado en la mitocondria iluminada [1].



### 3.12.5 Aumento de ATP por aplicación de radiación IR

Varios estudios describen aumentos de ATP por la radiación IR en células, entre estos, algunos basados con láser de He-Ne aplicado en células Hela (células cultivadas de cáncer cérvico-uterino), donde encuentran aumentos en la producción de ATP mediante técnicas de bioluminiscencia con luciferin-luciferasa en diferentes tiempos (5-45 min) después de la irradiación [231]. Otros experimentos realizados en mitocondrias aisladas de hígado de rata, encuentran aumentó en el potencial electroquímico de protones y la síntesis de ATP, algunos más mencionan aumentos de ARN y síntesis de proteínas después de aplicaciones de radiación IR en  $5\text{J}/\text{cm}^2$ . La radiación de las mitocondrias con luz en longitudes de onda como 633 nm 660 nm, 650 nm, 725 y 820 nm han mostrado aumentos en el consumo de oxígeno, potencial de membrana, y aumento de la síntesis de NADH y ATP, así como aumentos de la tasa de intercambio ADP / ATP [1].

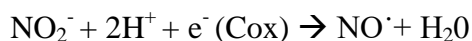
### 3.12.6 Aumento de ERO y ERN por aplicación de radiación IR

La forma precisa en que la luz afecta COX no se conoce todavía. La observación de que el  $\text{NO}^{\cdot}$  es liberado de las células durante la aplicación de radiación IR ha llevado a especular que Cox y la liberación de  $\text{NO}^{\cdot}$  están vinculados por dos vías posibles. Es posible que la radiación IR puede causar fotodisociación de  $\text{NO}^{\cdot}$  desde Cox. La respiración celular es regulada por la producción de  $\text{NO}^{\cdot}$ , este inhibe Cox desplazando el oxígeno y disminuye la actividad de la cadena de la CTE y de este modo la producción de ATP. La radiación IR disocia (separa) el  $\text{NO}^{\cdot}$  de Cox, proceso que provocaría la aceleración de la CTE, provocando el aumento de la producción de ATP. Una explicación alternativa o paralela ha sido propuesto recientemente proponiendo que la radiación IR aumenta la biodisponibilidad de  $\text{NO}^{\cdot}$  [2]. La producción elevada de  $\text{NO}^{\cdot}$  esta relacionada con cuadros inflamatorios agudos [99]. Estudios clínicos, relacionan el  $\text{NO}^{\cdot}$  con el aumento de la circulación y vasodilatación local, la disminución del dolor, disminución de la inflamación, angiogénesis y síntesis de colágeno. El  $\text{NO}^{\cdot}$  es el vasodilatador más potente del cuerpo y es la sustancia responsable de alivio del dolor inducido por la morfina [232]. El Óxido nítrico es así como las ERO un radical libre. Se ha detectado que la TLBI produce cambios en el potencial redox de las células en general en la dirección de mayor oxidación, esto, dado que, aumentos de la producción de aniones superóxido, con el consiguiente aumento de la concentración del producto de su dismutación, peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) son





detectados después de radiación IR [233]. Las especies reactivas de oxígeno (ERO) primeramente reportadas por Harman 1956 son iones o muy pequeñas moléculas y abarcan una variedad de metabolitos parcialmente de oxígeno reducidos (por ejemplo, aniones superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo) que poseen reactividades más altas que el oxígeno molecular. ERO y especies reactivas de nitrógeno ERN como  $\text{NO}^\bullet$  están involucradas en las vías de señalización de las mitocondrias al núcleo [2] [234]. La combinación de los productos del potencial de reducción y la capacidad reductora de los pares redox con enlaces presentes en las células y tejidos representan el medio ambiente redox (estado redox) de la célula, los cuales incluyen adenina nicotinamida dinucleótido  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ . Se ha encontrado que la iluminación con radiación R e IR aumenta la generación de ERO y la actividad celular redox [17]. Varios laboratorios [235] han demostrado generación de diversos ERO después de la TLBI en células usando sondeo fluorescente [236] o ensayos para detectar el peróxido de hidrógeno [237]. La posible reacción que puede ser llevada a cabo involucra a Cox como un posible reductor el cual a partir de nitritos  $\text{NO}_2^-$  y radiación R e IR forma  $\text{NO}^\bullet$  [2].



### 3.12.7 Radiación IR, ERO y factores de transcripción

Como se discutió anteriormente, se propone que la radiación IR proporcionada por equipos de TLBI incrementa la formación de ERO en células in vitro. Las ERO están implicadas en las vías de señalización iniciadas después de que fotones son absorbidos por la mitocondria en las células. A si mismo se ha reportado utilizando indicadores de luciferasa que NF- $\text{K}\beta$  es activado en fibroblastos embrionarios de ratón tratados con láser a 810 nm con un patrón de respuesta a la dosis bifásica y un máximo de activación 6 h después de  $0.3 \text{ J/cm}^2$ . La ruta NF-kappa  $\beta$  es un regulador clave de mediadores de la inflamación en células de la piel. A través de su capacidad reguladora, los procesos pueden resultar en un daño o reparación del ADN, la ruta de NF-kappa  $\beta$  puede ser una vía primaria que une la inflamación y el daño en el ADN. Otros experimentos también utilizan radiación IR o peróxido de hidrógeno para activar la NF-K  $\beta$ , el cual luego bloquean por la adición de antioxidantes, lo cual sugiere que la TLBI produce ERO que entonces activan NF- $\text{K}\beta$ . La gama de genes que son sensibles a NF- $\text{K}\beta$  incluyen muchos implicados en la supervivencia celular, proliferación, migración, y síntesis de colágeno de la piel, lo cual da



peso a la hipótesis de que algunos de los efectos celulares de la radiación IR están mediados por la activación de ERO inducida por NF-K $\beta$  [1] [79] [238] [234].

### 3.12.8 Radiación IR, proliferación celular, factores de crecimiento, migración y adhesión celular

La aplicación de radiación IR se ha demostrado para mejorar la proliferación celular *in vitro* en varios tipos de células: fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales y linfocitos. El mecanismo de proliferación que la radiación IR provoca en las mitocondrias, implica la activación JNK/AP-1 y aumentos de la liberación del factor de crecimiento. El término factor de crecimiento se refiere a una sustancia natural capaz de estimular el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular, tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), transformación del factor de crecimiento beta (TGFr $\beta$ ), y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que desempeñan un papel esencial en la sanación de heridas y en la reparación de tejidos. En un modelo oral de sanación en extracción de dientes *in vivo*, un aumento de la expresión TGF- $\beta$  se observó inmediatamente después de la irradiación láser. La expresión génica de PDGF y TGF- $\beta$  se incrementaron significativamente en las mucosas y tejidos gingivales de ratas con láser de He-Ne de 7.5 J/cm<sup>2</sup>. A si mismo se ha encontrado que láser de 0.5 J/cm<sup>2</sup> en 635 nm estimulaba la secreción de VEGF y el factor de crecimiento nervioso a partir de células madre de médula. La migración y la adhesión celular se pueden mejorar mediante la aplicación de radiación IR. Se ha observado que la radiación IR proporciona un microambiente para inducir repigmentación en el vitíligo. Estimulando la migración, la proliferación, reparación y liberación mitógena para el crecimiento de melanocitos [1]. Varios informes [239] han descrito el uso de la TLBI para "sanar" una herida (rasguño) hecho en una monocapa de células que crecen en un sustrato plástico en cultivo celular. Se ha planteado que la radiación R e IR activa algunas vías de señalización en las interacciones adhesivas entre células y matrices extracelulares [240].

### 3.12.9 Radiación IR y anti-apoptosis en cultivo de tejidos

Una observación importante fue reportada cuando la radiación IR permitió a células vivir bajo condiciones de deficiencia nutricional. Se propuso que la radiación IR proveería una biomodulación positiva y actuaría para mantener la homeostasis celular cuando las células se mantuvieran bajo la condición de estrés nutricional, lo cual causaría la apoptosis



[241]. Un aumento de la expresión anti-apoptótica proteína Bcl-2, y una expresión reducida de proteína pro-apoptótica BAX fue observada por primera vez. Estos cambios fueron acompañados por una reducción en la expresión de p53 y la inhibición de p21 quinasa dependiente de ciclina, lo cual implica la regulación de estos factores como parte de la función protectora de la radiación IR contra la apoptosis [242]

### 3.12.12 Radiación IR y los mediadores inflamatorios

Los mediadores inflamatorios son moléculas difusibles solubles que actúan localmente en el sitio del daño tisular, la infección, y en sitios más lejanos, durante las infecciones y enfermedades inflamatorias sistémicas. Se ha encontrado que la radiación IR induce un efecto anti-inflamatorio en ratas, caracterizado por la inhibición de la afluencia total de leucocitos, exudación, proteína total, NO<sup>·</sup>, interleucina (IL)-6, proteína-1 quimiotáctica macrófaga, IL-10, y TNF- $\alpha$ , de una manera dependiente de la dosis, en la que 2.1 J es más eficaz que 0.9 y 4.2 J. La radiación IR con equipo de TLBI a 810 nm fue altamente eficaz en el tratamiento inflamatorio de artritis en modelo de ratones y curiosamente un efecto anti-inflamatorio fue anulado por los esteroides antagonistas del receptor de la mifepristona, el cual es utilizada para tratar tumores cerebrales, endometriosis, fibroides y para inducir el parto en mujeres embarazadas [1].

### 3.12.13 Radiación IR, Síntesis de colágeno y Miofibroblastos

El colágeno es la proteína principal del tejido conectivo y la proteína más abundante en mamíferos. La radiación IR se ha demostrado para estimular la proliferación celular del músculo liso, manteniendo la viabilidad de fibroblastos humanos (HS68) y aumentando la síntesis de colágeno. Células estimuladas con TLBI mostraron un mayor crecimiento de fibroblastos, secreción del factor (bFGF), producción del procolágeno tipo I de péptido C, y síntesis de colágeno de tipo I. Se ha informado que la TLBI sobre regula el factor de crecimiento beta (TGF- $\beta$ ) el cual es un factor de crecimiento pleiotrópico responsable (entre otros) para inducir la síntesis de colágeno a partir de fibroblastos. Los miofibroblastos se encuentran sub epitelialmente en muchas superficies de la mucosa, en el tejido de las heridas, están implicados en el fortalecimiento de las heridas por la deposición extracelular de fibras de colágeno, ayudando a la cicatrización de la herida por contracción intracelular. Se ha informado que la radiación IR reduce la reacción inflamatoria, aumenta la deposición de colágeno, y provocar una mayor proliferación de miofibroblastos en



heridas cutáneas experimentales. En lesiones irradiadas por láser, las células positivas-alfa actina de músculo liso predominaron, lo cual correspondió a un mayor número de miofibroblastos [1].

### 3.12.15 Radiación IR y Modulación Neuronal

La neuromodulación es el proceso en el que varias clases de neurotransmisores en el sistema nervioso regulan diversas poblaciones de neuronas (una neurona puede utilizar diferentes neurotransmisores para conectar con varias neuronas). La radiación IR es ampliamente utilizada para afectar a las neuronas tanto para estimular e inhibir la actividad neuronal. Se ha demostrado que la irradiación láser aplicada a la piel intacta produce un efecto directo localizado en la conducción subyacente de nervios [243]. Se menciona que el láser de onda continua a 830 nm bloquea el flujo axonal rápido y reduce el potencial de membrana mitocondrial (PMM), en neuronas. La disminución de PMM fue significativa, ocurriendo una disminución del ATP disponible el cual se requería para la función nerviosa, incluyendo el mantenimiento de los microtúbulos y motores moleculares, que son responsables del flujo axonal rápido. El bloqueo neural inducido por láser es una consecuencia de tales cambios y proporciona un mecanismo para una base neural de alivio del dolor. [244]

### 3.13 Tratamientos láser precauciones y contraindicaciones

La seguridad es muy importante cuando se utilizan láseres. Todo el personal debe utilizar protección ocular adecuada para evitar lesiones corneales o retinianas, lo ideal es mantener las superficies reflectantes (p. ej., instrumentos metálicos) lejos del campo tratado; si no fuera posible, debe cubrirse el campo con paños húmedos. Podemos dividir las contraindicaciones en absoluta y relativas. En la absoluta está la retina, la proyección directa sobre los ojos puede ocasionar daño irreparable, que pudiera conducir incluso a la ceguera. Las radiaciones del láser de baja potencia traspasan la córnea, el cristalino y la parte media del ojo, absorbiéndose o depositándose en la retina. Las relativas son procesos neoplásicos o preneoplásicos (Formación patológica de un tejido, cuyos elementos componentes sustituirán a los de los tejidos normales), infecciones bacterianas, fotosensibilización, irradiaciones sobre la zona tiroidea, embarazo, epilepsia, marcapaso. Como su nombre lo dice, en estos tipos de afección generalmente no existe un acuerdo unánime en relación con emplear el láser o no. En los procesos bacterianos las acciones antiinflamatorias del láser y la vasodilatación de la microcirculación sanguínea pueden producir una diseminación de la infección, agravando el proceso. De acuerdo con estudios



realizados no se ha podido demostrar que la TLBI tenga acción antibacteriana directa, pero actúa activando los naturales mecanismos de defensa del organismo y aumentando la actividad fagocitaria. Se supone que el láser produce un incremento de neutrófilos, fagocitos, con disminución del número de bacterias. Teniendo esto en cuenta, debe utilizarse combinando el tratamiento con antibiótico. Los efectos secundarios producidos por tratamiento con láser pueden ser: astenia (percepción de debilidad muscular, a menudo con malestar general y fatiga), mareos, sudoración, diarreas, vómitos [245] [190].

En general las precauciones para la aplicación de la TLBI son [181]:

- No proyectar el rayo sobre el ojo ni su cercanía, tanto para el paciente como para el operador.
- Evitar las superficies reflectantes como espejos o superficies con brillo metálico.
- Usar lentes especiales para estos tipos de radiaciones.
- Que la pared no tenga azulejos y que estén pintadas de colores mates.
- Evitar el uso de pomadas o grasas en la piel antes del tratamiento, para evitar reflexiones y lograr una mejor absorción.
- Conocer los rangos y las medidas de protección de los equipos.
- En los embarazos no ha existido peligro documentado de que el láser hubiera afectado al feto, pero si hubiera cualquier problema posterior, podría achacarse al láser
- Formas, frecuencia y dosimetría en la aplicación del láser

### 3.14 Seguridad de acuerdo a normas

Generalmente los equipos de terapia laser cumplen con la norma (Deseable) ISO 9001-2000 o NMX-CC-9001-IMNC-2000, producto extranjero:(FDA, CE o JIS) y para producto nacional: Certificado de Buenas Prácticas de Manufactura (COFEPRIS) [246].



## Capítulo 4

# Materiales y métodos.

### 4.1 Animales:

Se utilizaron 20 ratas de la cepa Wistar , entre 22 y 30 días de nacidas, entre 47 y 55 gramos de peso, tratadas de acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio), las cuales fueron proporcionadas por el bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

Las ratas fueron utilizadas en 2 protocolos diferentes.

- 1) Inducción de fluorescencia con LUV de manera continua (FMC)
- 2) Inducción de fluorescencia con LUV de manera intermitente (FMI)

En cada protocolo se utilizaron 10 ratas, divididas en dos grupos, las células del primer grupo (n=5) se trataron con radiación láser IR, y las células del segundo grupo (n=5) sirvieron como testigo, es decir no se les aplicó radiación láser, aplica en ambos protocolos.

### 4.2 Obtención de la muestra

La muestra consiste en células mononucleares de sangre periférica de rata (CMNSPR) en solución fosfato 0.5  $\mu$ M, en el interior de las células encontramos la molécula fluorescente de interés NADH y NADPH. Las células son extraídas de sangre periférica, por punción cardíaca, para lo cual, se extraen 2.0 ml de sangre por cada rata, el volumen obtenido de células en esos 2.0 ml de sangre es diluido en 1.5 ml de una solución de mamífero conocida como Solución Salina Amortiguada por Fosfato (PBS: Phosphate Buffered Saline) la cual es isotónica y no-tóxica para las células de los mamíferos. Para la

obtención de células monocitos, se utilizó un procedimiento llamado Ficoll hypaque, el cual es una técnica de centrifugación por gradiente de densidad para separar células mononucleares de sangre periférica de otras células de la sangre. Durante la centrifugación se van formando varias capas, el sedimento que está formado principalmente por granulocitos y eritrocitos ha migrado a través del gradiente de densidad que es mayor al del ficoll hypaque, encima estaría otra capa que sería el ficoll hypaque que es menos denso, y encima estaría otra capa fina opalescente que contendrá las células de interés y finalmente sobre esa capa estaría las plaquetas y el plasma.

#### 4.2.1 Material para obtención de la muestra

Material para la obtención de cada muestra de CMNSP (**Figura 4. 1**).

- Sangre de rata Wistar (2 ml), extraída en heparina al 10% como anticoagulante.
- 2 ml de Ficoll-Paque Plus®.
- 10 ml de solución PBS.
- 4 Pipetas Pasteur estériles de plástico.
- 4 Pipetas serológicas graduadas estériles para pipeteador.
- 6 Puntas estériles con filtro para micropipeta.
- 4 Tubos cónicos estériles con tapón a rosca, tipo Falcón, de 10 ml.
- 1 Frasco vacío para residuos 100 ml.
- 3 jeringas de 3 ml.
- 1 centrífuga
- 4 tubos de centrifugación
- 1 balanza granataria
- 1 Cubeta de cuarzo de 3 ml

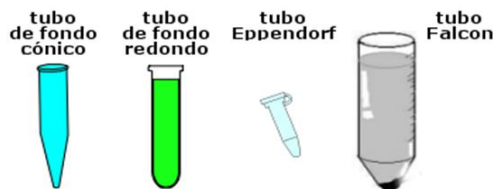


Figura 4. 1 Algunos tubos necesarios para centrifugación



## 4.2.2 Técnica para obtención de la muestra

Técnica:

1. Se obtiene 2.0 ml de sangre de una jeringa de 3 ml de rata Wistar con anticoagulante (heparina) al 10%.
2. Una vez obtenido la muestra se diluye con 2.0 ml de PBS, y se deposita en un tubo de centrifugación con la sangre recolectada quedando en una relación 1:1. Posteriormente se colocan 2.0 ml de Ficoll como gradiente de densidad; se pesa en la balanza, y se iguala el peso en otro tubo de centrifugación con agua para que posteriormente durante la centrifugación se tenga un balance de tubos.
3. Se colocan los tubos de centrifugación en la centrifuga y se ajustan los parámetros a 600 g, durante 15 min.
4. Al final se obtienen cuatro fases, donde la que más nos interesa es la de células mononucleares.
5. Se recolecta la capa con una pipeta Pasteur y se deposita en un volumen arbitrario de PBS (1 ml), se deposita finalmente en un tubo de ensayo para posteriormente centrifugarlo.
6. Se centrifuga durante 15 min, a 400 g (“número de ges”, porque se mide empleando como unidad la aceleración de la gravedad,  $g$ ).
7. Una vez acabada la centrifugación se obtiene una pastilla de células. Se tira el líquido donde está la pastilla y lo que queda de líquido se resuspende con una pipeta Pasteur.



8. Se recolectan con la pipeta Pasteur, poniéndose en una nueva solución de 1.5 ml de solución de mamífero.
9. Se deposita en una celda de cuarzo (**Figura 4. 3**) la nueva solución y se pone en un fluorómetro.

En la (Figura 4. 2) se presenta el procedimiento de extracción de sangre y obtención de células. El total de ratas para este experimento fue de 10, de las cuales 5 fueron tratadas y 5 no fueron tratadas con radiación láser IR.

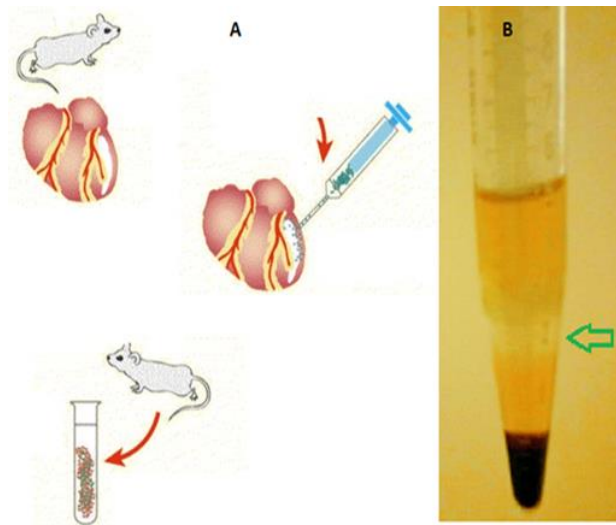


Figura 4. 2 (A) Proceso de extracción de sangre en ratas de la cepa Wistar, 4.2 (B) Capa de células mononucleares

Las células en solución, son colocadas en una cubeta de cuarzo de 3.5 ml la cual se utiliza porque no ofrece absorción en la zona del UV y en la zona del IR, se coloca la celda en la estructura para medir fluorescencia anteriormente descrita.



Figura 4. 3 Células en solución Fosfato 5  $\mu\text{M}$ , contenidas en cubeta de cuarzo 3 ml, mientras se radian con láser Nd-Yag

### 4.3 Preparación de disoluciones.

Una disolución es una mezcla homogénea a nivel molecular o iónico de dos o más sustancias que no reaccionan entre sí, cuyos componentes se encuentran en proporciones variables. También se puede definir como una mezcla homogénea formada por un disolvente y por uno o varios solutos [247]. Un ejemplo común podría ser un sólido disuelto en un líquido, como la sal o el azúcar disuelto en agua; o incluso el oro en mercurio, formando una amalgama. También otros ejemplos de disoluciones son el vapor de agua en el aire, el hidrógeno en paladio o cualquiera de las aleaciones existentes.

Para el cálculo de algunas diluciones definiremos las siguientes variables:

Se define la molaridad (M) de una disolución como el número de moles de soluto presentes en un litro de disolución

PM =Peso Molecular

v=volumen

m= masa del soluto en gramos

M=molaridad

### 4.3.1 Preparación de Coumarina en etanol.

Los estudios de espectroscopia actual involucran a soluciones orgánicas y su fluorescencia. Su uso justificado se debe a que son: de fácil adquisición, relativamente económicas, sus espectros de fluorescencia se encuentran adentro del espectro visible, los tiempos de relajación y la vida media de los estados de energía que intervienen en el fenómeno de fluorescencia son del orden de nanosegundos, fácilmente excitables con fuentes pulsadas monocromáticas incluyendo las de tipo láser también en el orden temporal de nanosegundos, pudiendo crear incluso otras fuentes de luz láser de pigmento, sintonizables, con sustancias orgánicas como la cumarina y la rodamina. Las cumarinas, o benzo- $\alpha$ -pironas son una amplia e importante variedad de compuestos químicos de tipo cíclico. Su estructura de definición consiste en anillos acoplado de pirona y benceno. La estructura de la cumarina padre se ilustra en la (Figura 4. 4 a). Las cumarinas son comunes en la naturaleza y fue en 1820 que se logró aislar la primer cumarina a partir de una variedad específica de frijol. El estudio de las cumarinas data de mediados del siglo XX y, por tanto, mucho se sabe de su emisión fluorescente y de su fosforescencia, entre ellas la cumarina 460 (C1) cuya estructura química se ilustra en la (Figura 4. 4 b) [248] [249].

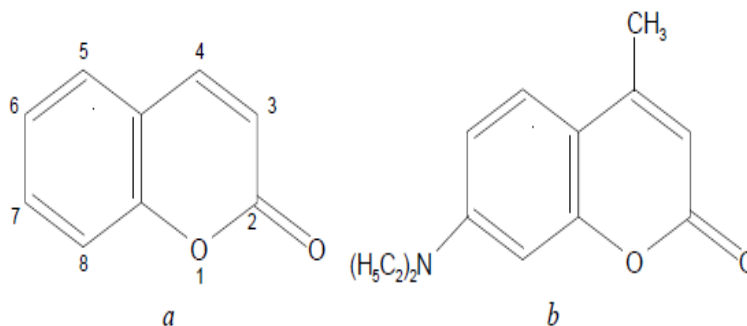


Figura 4. 4 Estructura química y numeración esquemática de la Cumarina, a) Molécula de la cumarina padre, b) Molécula de la cumarina 460 C1.



La cumarina 460 tiene una emisión de fluorescencia en 460 nm cuando es excitada con radiación uv a 355 nm, propiedad que comparte con la fluorescencia de la molécula NADH la cual es de interés en el presente trabajo. El costo de la cumarina es mucho menor que el NADH que en su forma comercial es conocido como  $\beta$ -NADH, por lo que para las pruebas de nuestros instrumentos de trabajo como el espectroscopio Avantes, así como pruebas con nuestro arreglo experimental para la obtención de los mejores resultados, en cuanto al enfoque de la señal de fluorescencia, a pruebas de emisión y estabilidad del láser Nd- Yag, se utilizó cumarina 460 en lugar de NADH intracelular o  $\beta$ -NADH. Se prepara una solución 50  $\mu$ M de Cumarina 460 en etanol, simulando la concentración de la molécula fluorescente NADH (460 nm) reportadas en células en vivo (5 a 50  $\mu$ M) [36] [250]. Para preparar la solución de C1 (molécula:  $C_{14}H_{17}NO_2$ ) [251] se dispone de un matraz aforado de 100 ml de capacidad, una báscula analítica Explorer OHAUS, alcohol étilico (Etanol) a 99.9% de pureza, el cual es el disolvente de la solución, y el polvo blanco y cristalino C1, el soluto. A continuación se detallan los cálculos para la preparación de una disolución  $50 \times 10^{-6} M$  de Cumarina (soluto) en etanol (disolvente).

Datos de catálogo de la Cumarina reportan [251] .

$$PM_{\text{Cumarina 460}} = 231.35 \text{ g/M}$$

Así pues, se dice que una disolución es 50  $\mu$ M ( $50 \times 10^{-6}$  molar) cuando contiene 50  $\mu$ M moles de soluto por cada litro de disolución.

Transformemos estos moles (50  $\mu$ M) en masa:

$$m = PM * M$$

$$m = 231.35 \text{ g/M} * 50 \times 10^{-6} M = 0.01156 \text{ g}$$

Como vemos, cada litro de disolución tendrá que contener 0.01156g de cumarina.

Queremos preparar un volumen equivalente a 100 ml. En ese supuesto, tomaríamos un matraz aforado de ese volumen, y calcularíamos la masa de cumarina necesaria para preparar dicho volumen

Aplicando una regla de 3.

$$0.01156 \text{ g} \rightarrow 1L$$

$$X \text{ (g)} \rightarrow 0.1L$$

$$X(g) = (0.01156 \text{ g} * 0.1L / 1L) = 0.001156 \text{ g}$$



Por lo tanto requerimos 1.156 mg de Cumarina para 100 ml de etanol.

Para preparar una solución: 5  $\mu$ M

$$m = 231.35 \text{ g/M} * 5 \times 10^{-6} \text{ M} = 0.001156 \text{ g}$$

$$0.001156 \text{ g} \rightarrow 1 \text{ L}$$

$$X \text{ (g)} \rightarrow 0.1 \text{ L}$$

$$X \text{ (g)} = (0.001156 \text{ g} * 0.1 \text{ L} / 1 \text{ L}) = 0.0001156 \text{ g}$$

Por lo tanto requerimos 0.115 mg de Cumarina para 100 ml de etanol.

### 4.3.2 Preparación $\beta$ -NADH

$\beta$ -NADH es un producto comercial, destinado a la investigación, en el caso del presente trabajo, se utilizara en sustitución y como punto de comparación del NADH de CMNSPR.

Se desea saber si existe diferencia entre:

- 1) La fluorescencia presentada en  $\beta$ -NADH en disolución trizma, MES, NAOH, sin y con aplicación de radiación láser IR.
- 2) La fluorescencia presentada en  $\beta$ -NADH en disolución trizma, MES, NAOH, sin y con aplicación de RLCIR contrastada con la fluorescencia presentada en NADH intracelular con y sin radiación láser IR.

Se prepara una solución 50  $\mu$ M de  $\beta$ -NADH en disolución trizma, MES, NAOH, simulando la concentración de la molécula fluorescente NADH (460 nm) reportadas en células en vivo 5 a 50  $\mu$ M [36] [250].

Consideraciones previas [252].

$\beta$ -NADH ( $\beta$ -Nicotimamida Adenina Dinucleotido reducido)



Números de catálogo: N1161, N6005, y N8129 (Sigma-Aldrich)

Formula Molecular:  $C_{21}H_{27}N_7Na_2O_{14}P_2$

Peso Molecular: 709.40 g/M

Propiedades Fluorescentes:

Longitud de onda de excitación = 340 nm

Longitud de onda de emisión = 460 nm

Este producto es soluble en NaOH a 0.01 M (100 mg / ml).

El agua sola no debe utilizarse para preparar soluciones ya que tiende a ser ácida y descompondría el  $\beta$ -NADH. Si las soluciones deben ser almacenados durante algun largo periodo de tiempo, amortiguadores (buffers) de fosfato debe evitarse ya que acelera la destrucción del  $\beta$ -NADH. Amortiguadores Trizma y MES a (0.01 M, pH 8,5) son una mejor opción. Puesto que las soluciones  $\beta$ -NADH son susceptibles a la oxidación incluso a bajas temperaturas, las soluciones deben ser preparado en concentraciones no mayores de 5 mM, en una pH de 9-11, y debe ser almacenado a 4 ° C. La presencia de la luz y los metales pesados pueden acelerar los procesos de oxidación. La congelación de  $\beta$ -NADH a temperaturas menores de -40 ° C, permite que soluciones mas concentradas puedan ser preparadas y almacenadas por años sin perder su actividad [252].

A continuación se detallan los cálculos para la preparación de una disolución  $50 \times 10^{-6}$  M de  $\beta$ -NADH (solute) en trizma y MES (disolvente).

Transformemos estos moles (50  $\mu$ M) en masa:

$$m = PM * M$$

$$m = 709.40 \text{ g/M} * 50 \times 10^{-6} \text{ M} = 0.03547 \text{ g}$$

Cada litro de disolución de MES y Trizma tendrá que contener 0.03547 g de  $\beta$ -NADH.

Para 100 ml

$$0.03547 \text{ g} \rightarrow 1\text{L}$$

$$X \text{ (g)} \rightarrow 0.1\text{L}$$



2017

$$\underline{X(g)} = 0.003547 = 3.5 \text{ mg}$$

**Para 5  $\mu\text{M}$  de  $\beta\text{-NADH}$** 

$$m = 709.40 \text{ g/M} * 5 \times 10^{-6} \text{ M} = 0.003547 \text{ g}$$

$$\underline{X(g)} = 0.0003547 = 0.35 \text{ mg}$$

Para la preparación del disolvente NaOH a 0.01 M (100 mg / ml), nos piden la preparación de ambos MES y Trizma a 0.01M

$$PM_{\text{MES}} = 217 \text{ g/M}$$

$$PM_{\text{TRIZMA}} = 121.14 \text{ g/M}$$

Transformemos estos moles (0.01 M) en masa para ambos:

$$m = PM * M$$

$$m_{\text{MES}} = 2.17 \text{ g}$$

$$m_{\text{TRIZMA}} = 1.2114 \text{ g}$$

Cada litro de disolución de NaOH a 0.01 M (100 mg / ml) tendrá que contener 2.17 g de MES y 1.2114 g de Trizma

Realizando el cálculo para 100 ml, por regla de 3 tendremos:

MES

$$2.17 \text{ g} \rightarrow 1\text{L}$$

$$X_{\text{MES}}(g) \rightarrow 0.1\text{L}$$

$$\underline{X_{\text{MES}}(g)} = (2.17\text{g} * 0.1\text{L}/1\text{L}) = 0.217 \text{ g}$$

TRIZMA

$$1.2114 \text{ g} \rightarrow 1\text{L}$$

$$X_{\text{TRIZMA}}(g) \rightarrow 0.1\text{L}$$

$$\underline{X_{\text{TRIZMA}}(g)} = (1.2114\text{g} * 0.1\text{L}/1\text{L}) = 0.12114 \text{ g}$$

Dadas las especificaciones del disolvente NaOH a 0.01 M (100 mg / ml), y deseando preparar 100 ml de NAOH en agua, utilizaremos 1000 mg de NAOH en 100 ml de agua potable (PH $\rightarrow$ 6.5-11)

#### 4.4 Tipos de Láser utilizados:

Se utilizaron dos tipos de láser:

- 1) Láser Nd-Yag: (acrónimo del inglés neodymium-doped yttrium aluminium garnet) es un dispositivo de emisión láser de estado sólido que posee óxido de itrio y aluminio cristalino cuya red hace de anfitrión ya que está dopada con neodimio que hace de huésped formando la especie (Nd:Y<sub>3</sub>Al<sub>5</sub>O<sub>12</sub>), una variedad de granate, su emisión característica posee una longitud de onda de 1064 nanómetros, es decir, emite en el infrarrojo.

Para la excitación de la molécula NADH, NADPH se utilizó un láser pulsado (8 ns) de Nd-YAG (**Figura 4. 5**), marca Lumonics, modelo HY-1200, a una frecuencia de 20 Hz con una potencia en el uv de 235 mW, triplicado en frecuencia, cuya longitud de onda de emisión a 355 nm coincide con uno de los picos de absorción de la molécula fluorescente NADH.



**Figura 4. 5** Láser Nd-YAG (Estructura interna).



- Este láser es necesario para poder realizar el seguimiento de la producción o pérdida de energía en el interior de las células, proceso conocido como metabolismo celular, ya que la longitud de onda a la que emite coincide con uno de los picos de absorción máxima de las moléculas NADH, garantizando con ello la excitación de los electrones en estado basal a estado excitado de la molécula y a su regreso la emisión de fluorescencia.
- La duración de los pulsos es muy pequeña 8 ns, pero la potencia de los mismos es grande 235 mW, es decir pulsos de alta potencia de muy corta duración. Para la generación de la fluorescencia aplicamos 20 de estos pulsos cada segundo (**Figura 4. 6**).

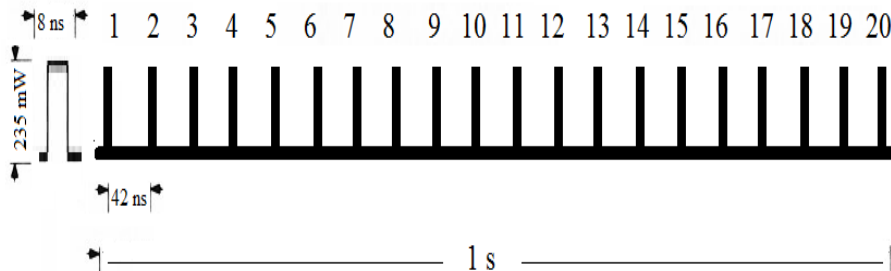


Figura 4. 6 Modo de emisión pulsada del láser Nd-YAG.

## 2) Láser terapéutico Infrarrojo:

Para la aplicación de la terapia láser, en las células mononucleares de sangre periférica, se utilizó un láser terapéutico, infrarrojo, tipo diodo, continuo, a una longitud de onda de 790 nm, y una potencia de salida de 90 mW, marca Medingenium, servicios en tecnología médica (**Figura 4. 7**).



Figura 4. 7 Láser terapéutico infrarrojo 790 nm

La (Figura 4. 8) resenta la manera continua de aplicación del láser durante 40 minutos de tratamiento.

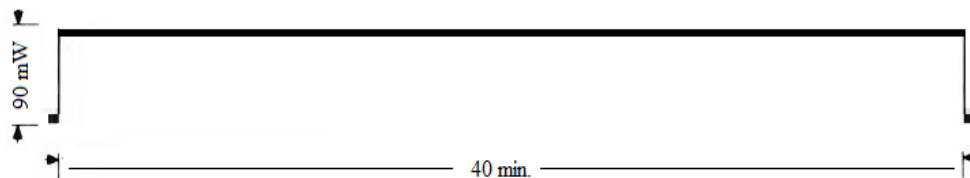


Figura 4. 8 Modo continuo de aplicación del láser durante 40 minutos del tratamiento

## 4.5 Estructura para medición de fluorescencia

La estructura para poder medir la fluorescencia de la muestra celular de ratas de la cepa Wistar se basa en un arreglo focal óptico conocido como 2F, en donde la muestra y la imagen se ubican 2 veces la distancia focal de la lente y en lados opuestos de la misma (Figura 4. 9). Este tipo de arreglo permitio amplificar la intensidad de la fluorescencia emitida por la muestra, lo cual evito el uso de un fotomultiplicador (amplificador de luz).

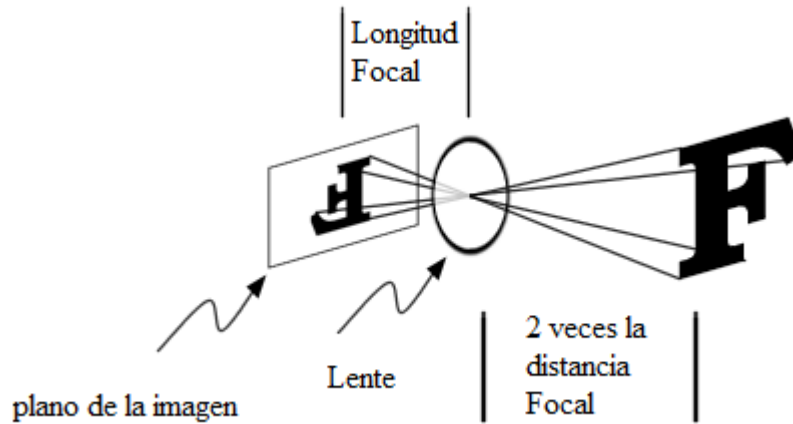


Figura 4. 9 Amplificación de fluorescencia mediante un arreglo focal cercano al 2F

El arreglo focal consta de un tubo de lente apilable  $\varnothing=1$  ", 3" de profundidad, con ranuras laterales las cuales proporcionan un medio rápido y fácil para la construcción de conjuntos ópticos complejos y ajustar la óptica sin necesidad de desmontar la instalación. La (Figura 4. 10) representa el arreglo y tipo de lentes para lograr de manera sencilla un arreglo 2F, la fuente emisora de luz se coloca frente al eje óptico, esta es conducida a una fibra óptica mediante una serie de lentes, las cuales concentran la luz a una fibra óptica.

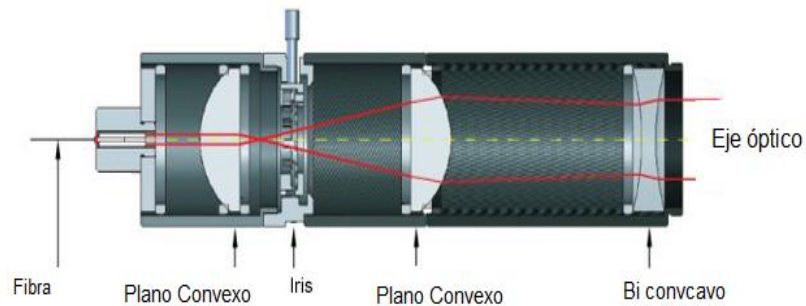


Figura 4. 10 tubo de lente apilable para obtener un arreglo 2F

## 4.6 Sistema de captura de espectros de fluorescencia

Para la obtención de los espectros de fluorescencia se utilizó el espectrómetro AvaSpec-2048-USB2-UA-50 (**Figura 4. 11**), con conector de fibra óptica (SMA905) de 50  $\mu\text{M}$ , resolución en amplitud (unidades arbitrarias) de 2048 píxeles, resolución en longitud de onda 2.4 nm, rango de longitud de onda de 200 a 1100 nm lo cual nos permite capturar espectros situados en el ultravioleta, visible e Infrarrojo, utiliza un software de interface AvaSoft 7.5 para interface USB2.

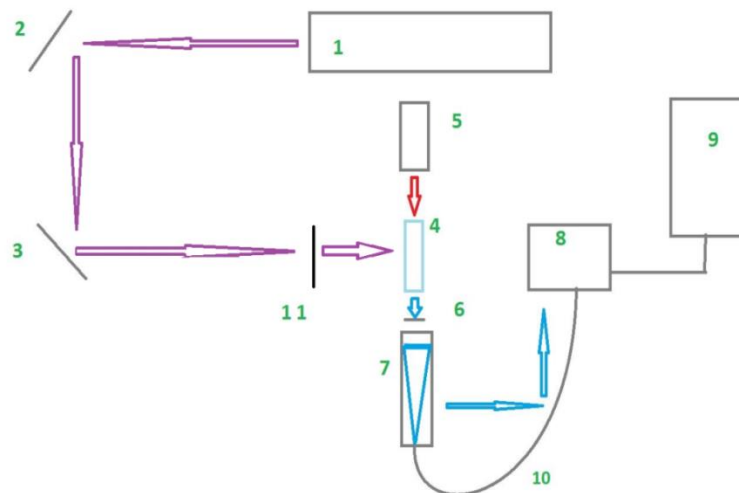


**Figura 4. 11** espectrómetro AvaSpec-2048-USB2-UA-50

Para la excitación de las moléculas se utilizó un láser pulsado (8 ns) de Nd-YAG a una frecuencia de 20 Hz con una potencia en el uv de 235 mW, triplicado en frecuencia, cuya longitud de onda de emisión a 355 nm coincide con uno de los picos de absorción de la molécula de NADH. Para radiar las células se utilizó un láser terapéutico infrarrojo continuo a 790 nm, 90 mW. En la (**Figura 4. 12**) se presenta un diagrama a bloques del arreglo experimental completo para obtener fluorescencia de la molécula NADH intracelular, las flechas indican el camino del haz láser: en morado láser UV a una longitud de onda de 355nm necesario para excitar y provocar fluorescencia en la molécula NADH, en azul turquesa la respuesta en fluorescencia en rango de longitud de onda 350-600 nm donde se encuentra el espectro del NADH, en rojo láser a 790 nm, longitud de onda para estimular el metabolismo celular, radiación utilizada en equipos de TLBI. En el plano de la imagen se coloca una fibra óptica que conduce la señal a un monocromador marca Avantes el cual contiene un arreglo de fotodiodos para captar varias longitudes de onda, programado para un tiempo de integración de 500 ms, a 1 promediación por segundo, la señal digital que nos entrega el monocromador la procesamos mediante un software comercial que utiliza lenguaje de alto nivel, en un entorno interactivo para el cálculo numérico, la visualización y la programación llamado Matlab. El sistema de detección tipo CCD Avantes nos entrega un archivo con formato txt con los espectros de fluorescencia (segundo a segundo durante 40 minutos), estos espectros muestran la longitud de onda de emisión de fluorescencia (eje x) y la IF en unidades arbitrarias (eje y), los espectros son procesados con el software Matlab.

Partes del arreglo experimental

- 1) Láser Nd-YAG, pulsado (duración de pulso 8 ns), longitud de onda ( $\lambda=355$  nm), frecuencia ( $f=20$ hz), potencia ( $w=235$  mW)
- 2) Primer espejo: 45 grados, reflejo de luz 355 nm
- 3) Segundo Espejo: 45 grados, reflejo de luz 355 nm
- 4) Celda de cuarzo de 3.5 ml conteniendo 1.5 ml de muestra celular con un aproximado de 2,000,000 células/ml, en un medio de suspensión PBS, concentración 0.5  $\mu$ M
- 5) Láser terapéutico, de emisión continua, a longitud de onda  $\lambda=790$  nm, potencia ( $w=90$  mw), diámetro del haz incidente ( $\Phi=1.0$  cm)
- 6) Filtro para U.V actúa 50% de atenuación en menos de 355 nm
- 7) Soporte y tubo de lente apilable, para un arreglo cercano a 2F entre una lente biconvexa interna en el tubo, la muestra (4) y la fibra óptica (10)
- 8) Sistema de detección tipo ccd marca AVANTES, AvaSpec-2048-USB2-UA-50, con conector de fibra óptica (SMA905) de 50  $\mu$ M, programado para un tiempo de integración de 500 ms, 1 promediación
- 9) Laptop Core™2 Duo, Con software comercial Avasoft 7.5 para USB2, MATLAB® versión 7.10.0.499 (r2010a)
- 10) Fibra óptica multimodo, diámetro del núcleo 400 +/- 30 Microns
- 11) Filtro de densidad neutral 30% de atenuación.



**Figura 4. 12** Arreglo experimental a bloques para obtener fluorescencia de la molécula NADH intracelular, las flechas indican el camino del haz láser, en morado 355 nm longitud de onda necesaria para provocar fluorescencia en la molécula NADH, en azul turquesa 350-600 nm longitud

donde se encuentra el espectro del NADH, en rojo láser a 790 nm longitud de onda para estimular el metabolismo celular.

En la (Figura 4. 13) se muestra parte del arreglo experimental y la fluorescencia de color azul del NADH de CMNSPR.

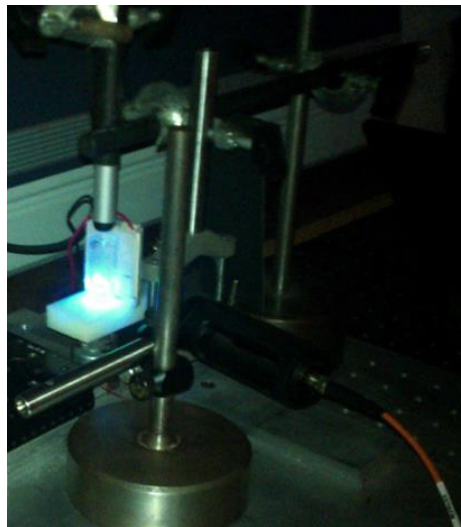


Figura 4. 13 Fluorescencia de color azul del NADH de CMNSPR

#### 4.7 Estimulación láser para la obtención de fluorescencia

El láser Terapéutico cercano al infrarrojo, se utilizó con el fin de inducir un cambio en el metabolismo celular ya que su acción terapéutica está referida a una mayor generación: de ATP, de especies reactivas de oxígeno, de liberación de óxido nítrico, de actividad del COX, todas ellas involucradas con la cadena de transporte de electrones, y el estado redox de la molécula NAD a NADH.

El láser UV se utiliza para lograr la fluorescencia de NADH de CMNSPR, sin embargo, la luz ultravioleta está referida como un tipo de radiación ionizante, también referida para la generación de especies reactivas de oxígeno, pudiendo interactuar conjuntamente con el láser terapéutico, “algo no deseable”, por lo que la obtención de la fluorescencia la manejamos de 2 maneras.

### 1) Fluorescencia de forma continua

En este modo el láser de LUV permanece irradiando la muestra con células mononucleares de sangre periférica durante 40 o 30 minutos que es lo que dura el registro, aplica para las 2 condiciones con y sin aplicación de radiación IR. En la (**Figura 4. 14**) se representa la forma de aplicación de ambos láser, el láser infrarrojo lo representamos con una línea roja continua, el ultra violeta con una línea azul continua, en ambos casos la luz ultra violeta permanece siempre interactuando con la muestra, lo cual es necesario para provocar la fluorescencia de la molécula. El transcurso del tiempo se representa con líneas de color negro, cuando es condición sin radiación IR no se coloca la línea roja.

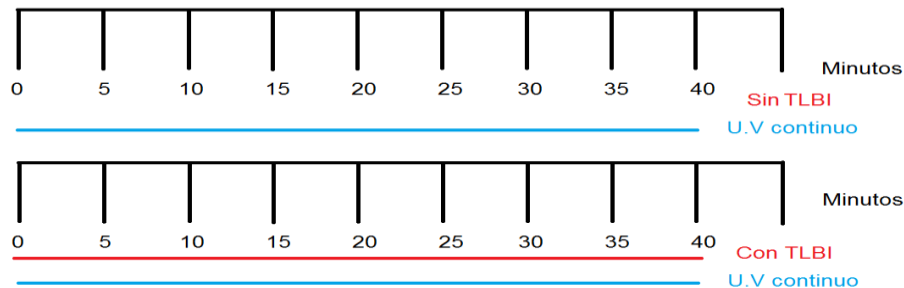


Figura 4. 14 Representación en el tiempo de la exposición de la muestra a la luz UV continua e infrarroja continua con y sin aplicación de radiación IR.

### 2) Fluorescencia de forma intermitente

En este modo el láser de LUV permanece irradiando la muestra mononucleares de sangre periférica solo 10 segundos, cada 5 minutos, durante 30 o 40 minutos que es lo que dura el registro, aplica para las 2 condiciones con y sin aplicación de radiación láser IR. En la (**Figura 4. 15**

Figura 4. 15) se representa la forma de aplicación de ambos láser, el láser infrarrojo lo representamos con una línea roja continua, el ultra violeta con una línea azul discontinua, y el transcurso del tiempo con líneas de color negro, cuando es condición sin radiación láser IR no se coloca la línea roja.



Figura 4. 15 Representación en el tiempo de la exposición de la muestra a la luz UV pulsada, con y sin radiación infrarroja continua.

### 4.8 Dosis de exposición

En la (Tabla 4. 1 y Tabla 4. 2) se muestran las dosis de exposición para los 2 tipos de láser empleados en este trabajo, Láser Nd-Yag tipo pulsado, Láser Terapéutico cercano al infrarrojo tipo continuo. Para esto se realizaron los siguientes cálculos:

$$D.E \text{ (Nd-Yag)} = (\text{potencia})(\text{frecuencia})(\text{tiempo en segundos})(\text{duración de pulso})$$

$$D.E \text{ (Terapéutico)} = (\text{potencia})(\text{tiempo en segundos})$$

Laser Nd-Yag (neodymium-doped yttrium aluminium garnet) 355 nm, 235 mW, Duración de pulso 8ns, f=20 Hz Dosis de exposición (Joules)		
Tiempo	Fluorescencia Continua	Fluorescencia Intermitente
10 (segundos)	0.000000376	0.000000376
5 (Minutos)	0.00001128	0.000000752
10 (Minutos)	0.00002256	0.000001128
15 (Minutos)	0.00003384	0.000001504
20 (Minutos)	0.00004512	0.00000188
25 (Minutos)	0.0000564	0.000002256
30 (Minutos)	0.00006768	0.000002632
35 (Minutos)	0.00007896	0.000003008
40 (Minutos)	0.00009024	0.000003384
Rango :	376 nJouls-90.24 μJouls	376 nJoul-3.384 μJouls

Tabla 4. 1 Dosis de exposición a diferentes tiempos Laser Nd- Yag 355 nm, modo de Fluorescencia continuo e intermitente





Laser Terapeutico cercano al infrarrojo, 790 nm, 90 mW Dosis de exposición (Jouls)	
Tiempo	Emisión Continua
10 (segundos)	0.9
5 (Minutos)	27
10 (Minutos)	54
15 (Minutos)	81
20 (Minutos)	108
25 (Minutos)	135
30 (Minutos)	162
35 (Minutos)	189
40 (Minutos)	216
Rango :	0.9 Jouls- 216 Jouls

Tabla 4. 2 Dosis de exposición a diferentes tiempos Laser terapéutico, continuo infrarrojo

## 4.9 Obtención y promediación de espectros

Se presentan 2 tipos de espectros de fluorescencia: continuos y promediados, a continuación describimos estos tipos de espectros.

### 1) Espectros de manera continua

Son graficas de IF vs longitud de onda, cada espectro es tomado de forma continua, un espectro por segundo, en un lapso de 40 o 30 minutos tendremos de (60 segundos x 40 minutos = 2400 espectros) a (60 segundos x 30 minutos = 1800 espectros) .

### 2) Espectros promediados

Estos espectros son graficas de IF vs longitud de onda, los espectros obtenidos de forma continua son promediados cada 5 minutos, equivalentes a  $60 \times 5 = 300$  espectros promediados, en lapsos de 30 minutos, tendremos hasta 6 espectros promediados, cada uno representando un intervalo de tiempo de 5 minutos es decir 5, 10, 15, 20, 25, 30 minutos.

El proceso para la representación de espectros longitud de onda e IF es la siguiente:

1. Los espectros son obtenidos por el sistema AVANTES



2. Los espectros son convertidos a formato de excel en las opciones del software de AVANTES (File→Convert Graph→to Excel)
  - a. Para hacer los datos compatibles con MATLAB se requiere sean guardados desde Excel como archivos de texto tabulado (nombre.txt)
  - b. Importar el archivo a MATLAB, para ello abra MATLAB (ImportData→nombre.txt, “excluir las primeras 6 filas ya que son cabeceras del archivo” )
  - c. El archivo contendrá 1620 renglones, cada renglón corresponde a un valor de longitud de onda, así mismo contiene un número dependiente del tiempo de columnas, un espectro de cada columna es equivalente en tiempo a 1 segundo, por lo que si tomamos 30 minutos obtendremos  $30 \text{ minutos} \times 60 \text{ segundos} = 1800 \text{ espectros} = 1801 \text{ columnas}$ , ya que la primera columna contiene los datos del eje x= El valor correspondiente a la longitud de onda.
3. Los espectros guardados en un archivo de tipo excel \*.xls son procesados y graficados en MATLAB bajo el siguiente proceso:
  - a) los espectros son obtenidos de manera continua por el sistema AVANTES, y son guardados previamente con el nombre de “data.txt”.
  - b) los espectros se pueden graficar con el procesamiento en MATLAB, de uno en uno, o se puede realizar la promediación de espectros obtenidos cada 5 minutos, para una mejor representación en el tiempo.

A continuación se presenta el código para la graficación de espectros:



#### 4.9.1 Programas para la graficación de espectros

##### A) GRAFICANDO ESPECTROS OBTENIDOS DE MANERA CONTINUA

```
c) %VARIABLES
d) MAX=1620;
e) GI=data; %GI CONTIENE TODOS LOS DATOS.
f) col=2; %PUNTO PARA NO TOMAR LA PRIMERA COLUMNA QUE ES (λ)
g) [X,Y] = size(GI);
   %figure(1) GRAFICANDO TODOS LOS DATOS
h) subplot(3,2,1);
i) plot(GI(138:MAX,1),GI(138:MAX,col:Y))%nadh
   % legend('NADH ')
j) xlabel('Longitud de onda (nm)')
k) ylabel('Unidades arbitrarias')
l) title('Fluorescencia de NADH')
m) grid('on')
```

##### B) GRAFICANDO ESPECTROS PROMEDIO

Los espectros obtenidos de forma continua fueron promediados cada 5 minutos durante 40 minutos

```
n) %ELIMINANDO EL OFFSET DEL ESPECTRO
o)
p) B=GI(1:X,2:Y);
q) OFFSET=min(B(150:209,1:Y-1));
r) for ki=1:Y-1
s) D(:,ki)=B(1:X,ki)-OFFSET(ki);
t) End

u) %GRAFICA PROMEDIO
v) promed=mean(D');
w) transp=(promed');
x) subplot(3,2,2);
y) plot(GI(144:MAX,1),transp(144:MAX,1),'b')%nadh
z) xlabel('Longitud de onda (nm)')
aa) ylabel('Unidades Arbitrarias')
bb) title('Fluorescencia de NADH')
cc) grid('on')
```



## 4.10 Gráficas de IF en función del tiempo

Una forma de representar los datos fue mediante gráficas de IF en función del tiempo, las cuales se obtuvieron para 3 longitudes de onda 440, 460 y 470 nm, ya que experimentos previos marcaban estas longitudes de onda con los picos máximos y de mayor cambio. Partiendo de los espectros continuos se obtuvieron picos máximo en IF, en las siguientes longitudes de onda: 440 +/- 1 nm; 460 +/- 1 nm y 470 +/- 1 nm. Estos picos máximos posteriormente fueron graficados como IF con respecto al tiempo. Se obtuvo el pico máximo en un rango cercano a la longitud de onda deseada (440, 460 o 470 nm) ya que la resolución del sistema AVANTES no da valores exactos para estos valores, ver tabla de valores (posición) y correspondencia de longitud de onda (**Tabla 4. 3**).

Valor en la tabla	Correspondencia longitud de onda
445	439.419
446	440.004
447	440.59
480	459.894
481	460.479
482	461.063
497	469.824
498	470.408
499	470.991

**Tabla 4. 3** Tabla de correspondencia al pico máximo en IF cercana a la longitud de onda deseada (440, 460, 470 nm).

### 4.10.1 Programas para la graficación de IF en el tiempo

Para la obtención de gráficas de intensidad de fluorescencia y longitud de onda se desarrollo un programa en MATLAB, el siguiente código grafica la máxima IF en el tiempo en longitudes de onda 440 +/- 1 nm; 460 +/- 1 nm y 470 +/- 1 nm.

GRAFICACIÓN DE IF EN EL TIEMPO

```
P440=max(D(445:447,1:Y-1));  
P460=max(D(480:482,1:Y-1));  
P470=max(D(498:500,1:Y-1));
```



```
figure (3)
subplot(2,1,1);
plot(P440, 'b');
hold on;
subplot(2,1,1);
plot(P460, 'g');
hold on;
subplot(2,1,1);
plot(P470, 'c');
grid on
```

#### 4.11 Prueba del sistema de espectroscopia Avantes

Se realizó una prueba con el sistema de obtención de espectros Avantes para verificar que este trabajara correctamente en un amplio espectro de longitudes de onda, por lo que se obtuvo la medición indirecta de la luz emitida por un foco de 100 W.

Se sabe que las lámparas incandescentes, no emiten en el ultravioleta pero si en el infrarrojo cercano, el espectro producido, es continuo y la luz es amarillenta. Ya que la lámpara incandescente tiene un amplio espectro de emisión continuo, logrando contener todas las longitudes de onda en la parte que emite del espectro visible e infrarrojo [253].

Para evaluar de una manera rápida nuestro instrumento de medición AvaSpec-2048, obtuvimos el espectro que nos entrega un foco de 100 watts bajo el siguiente arreglo experimental:

Se colocó una lámpara con un foco incandescente de 100 watts con la parte emisora apuntando al techo blanco del laboratorio de óptica de la UAMI, de igual manera se coloca el sensor (fibra óptica) del AvaSpec-2048 tratando de captar la luz reflejada, de esta manera se atenúa la luz emitida por el foco, y no se daña el detector del sistema AVANTES (**Figura 4. 16**).

##### Material

- 1) Lámpara tipo campana para foco incandescente, con base
- 2) foco de 100 Watts marca philips (lámpara incandescente de filamento de tungsteno también conocido como wolframio)

- 3) Sistema de detección tipo ccd marca AVANTES, AvaSpec-2048-USB2-UA-50, con conector de fibra óptica (SMA905) de 50  $\mu\text{M}$ , programado para un tiempo de integración de 500 ms, 1 promediación
- 4) Fibra óptica multimodo, diámetro del núcleo 400 +/- 30 Microns
- 5) Poste y adaptador para colimador con fibra. Colimador de la serie LC-22, con rango de operación en longitud de onda en 380 a 2200 nm, con apertura de 2.2 cm, y 3.175 cm dentro del alojamiento de aluminio

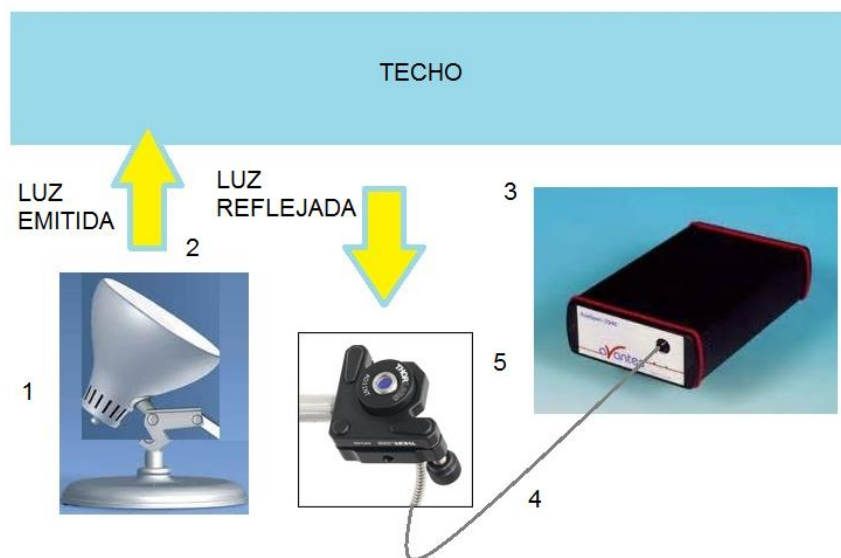


Figura 4. 16 Arreglo para la obtención del espectro de la luz emitida por una lámpara incandescente.

#### 4.12 Prueba de aumentos de temperatura

El metabolismo no es inmune a cambios de temperatura, de hecho el cuerpo humano tiene una temperatura interna estable, que varía ligeramente entre 36 y 37,5 °C, dicha temperatura es una consecuencia de la actividad metabólica del cuerpo. El término metabolismo engloba la suma de todas las reacciones que ocurren en un organismo, muchas de estas reacciones bioquímicas implican un aumento de la temperatura, por lo que se relaciona el término metabolismo con el concepto de temperatura corporal, cuanto más calor se emita, mayor será el metabolismo. En ocasiones, algunos experimentos conllevan a la congelación de las células para detener el metabolismo celular.



La absorción de la radiación electromagnética por algún cromóforo puede ser muchas veces transformada en calor, o en otro tipo de energía.

Aumento de calor puede ser utilizado para fines terapéuticos. El aumento de temperatura sobre el organismo se da por medio de cuerpos materiales de temperatura elevada, por encima de los niveles fisiológicos.

Algunos efectos terapéuticos de la termoterapia son equiparables a los producidos por la TLBI:

- Efecto antiinflamatorio
- Efecto analgésico
- Aumento del metabolismo
- Aumento de la circulación sanguínea.

Por todo ello es fácil sospechar que los efectos terapéuticos producidos por la TLBI, sean de tipo térmico, producto de la absorción de radiación electromagnética por algún cromóforo. Por otro lado la temperatura también influye en la fluorescencia disminuyendo cuando la temperatura aumente y aumentando cuando la temperatura disminuye. Para saber cómo la temperatura influía en nuestro modelo experimental en la muestra de CMNSPR, algunas pruebas fueron realizadas mediante un elemento llamado peltier, el cual siendo un elemento térmico nos permitió calentar muestras de Cumarina y  $\beta$ -NADH a una temperatura cercana a la que tenemos en la sangre, la cual es 37 °C.

Se explicara brevemente el principio de funcionamiento del elemento peltier.

La termoelectricidad es un fenómeno que relaciona calor con electricidad y que es posible en metales de textura cristalina y de poder conductor desigual. Al aplicar o retirar calor a la juntura de estos dos metales se produce una corriente eléctrica que va desde la unión hacia el metal que sea más conductor. “La electricidad desarrollada de esta manera se llama termoelectricidad; es decir, electricidad desprendida por el calor”. Este fenómeno fue observado en 1922 por Thomas Seebeck y por ello se conoce como efecto Seebeck. [254] El opuesto al efecto Seebeck se denomina efecto Peltier donde al circular corriente a través de dos elementos semiconductores, genera calor en la unión de estos. Según sean las características eléctricas térmicas de un módulo Peltier se deberá contar con una fuente capaz de otorgar la corriente necesaria para alcanzar la diferencia de temperatura deseada en las caras de este. Al hacer circular corriente continua a través del módulo Peltier se crea una diferencia de temperatura entre ambas caras. El efecto Peltier es una diferencia de temperatura creado por la aplicación de un voltaje (V) entre 2 electrodos conectados a material semiconductor (**Figura 4. 17**). El calor fluye del lado de baja temperatura hacia el de alta temperatura, enfriando el ambiente del lado frío y calentando el del lado opuesto.

Basta cambiar el sentido de la corriente ( $i$ ) para invertir el flujo de calor. Además, al variar el valor de corriente circulante se logra cambiar la cantidad de calor de bombeo.

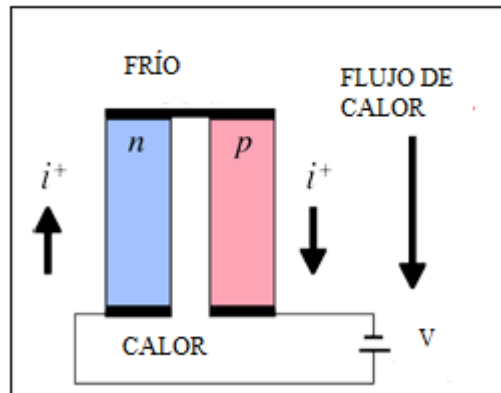


Figura 4. 17 Efecto Peltier: Diferencia de temperatura creado por la aplicación de un voltaje ( $V$ ) entre 2 electrodos conectados a material semiconductor tipo (n-p).

#### 4.12.1 Caracterización del peltier

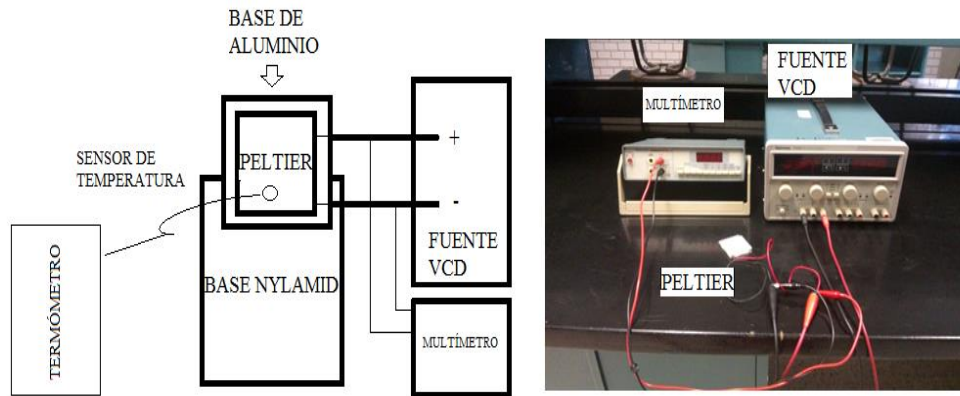
Diferentes pruebas de temperatura fueron realizadas con un peltier previamente caracterizado.

Para la caracterización del peltier, este fue unido a una placa de Aluminio de 50 x 60 mm con un espesor de 4 mm, para ser utilizado como disipador, y fue montado en una base de Nylamid 50x70x10 mm, con ranura de 4 mm, en la (**Figura 4. 18**) se muestra el arreglo experimental.

Material para la caracterización:

- 1) Base de Nylamid 50 x 70x10 mm con ranura a 15 mm de 4 mm
- 2) Multímetro digital Twintex TM199 en modo termómetro con sensor de temperatura, resolución 0.1 °C
- 3) placa de Aluminio de 45 x 60 mm
- 4) Peltier TEC1-12706 (40X40 mm), espesor 4 mm
- 5) Termómetro usb 500calex, electronics piropen, VTLO05974, resolución 0.1 °C
- 6) Fuente de voltaje CD Twintex 2606 (30V/5A, 50V/3A).





**Figura 4. 18** Diagrama a bloques y elementos necesarios para la caracterización del peltier.

### 4.13 Arreglo experimental para pruebas de estabilidad del láser.

En un inicio solo se pensaba analizar la IF del NADH en longitud de onda 460 nm ampliamente documentada, por lo que se diseñó el experimento de la figura (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), el cual se basa en el uso de un fotodiodo s1721 Hamamatsu, el cual sirvió para ver la estabilidad del láser, e iniciar los trabajos de una manera confiable. Primeramente se generó fluorescencia en una muestra de Cumarina 460  $\mu\text{M}$  con el láser Nd-Yag, como ya se menciona este genera pulsos del orden de nanosegundos, lo cual complica su registro, por lo que se realizó un circuito para captar este tipo de pulsos (Figura 4. 19).

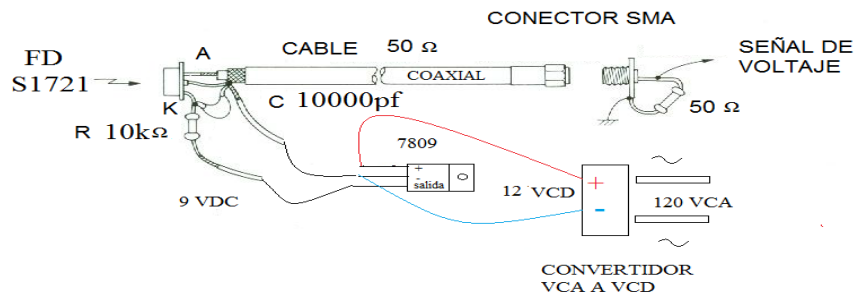


Figura 4. 19 Circuito en configuración ultra rápida para captación de luz S1721 Hamamatsu especificaciones de fotodiodos



La fluorescencia de la muestra fue conducida por una fibra óptica hasta un Monocromador (para separar la longitud de onda a estudiar), la señal que entra al monocromador es conducida a una rendija ajustable. La rendija reflejara la señal a la longitud de onda de interes, para posteriormente salir del monocromador y ser recolectada por el fotodiodo. La señal captada es convertida a una señal de voltaje la cual es integrada y promediada por un boxcar para obtener una mayor relación señal/ruido. La integración y promediación de esta señal será convertida por una tarjeta analogico digital y desplegada en una computadora, a continuación se muestran los componentes que conforman el arreglo experimental (**Figura 4. 20**).

- 1 Láser Nd-YAG, 355 nm, 20hz, 235 mW
- 2 Primer Espejo: 45 grados, reflejo de luz 355 nm
- 3 Segundo Espejo: 45 grados, reflejo de luz 355 nm
- 4 Celda de cuarzo de 3.5 ml conteniendo la muestra de Cumarina 460 50µM
- 5 Fotodiodo
- 6 Monocromador
- 7 Integrador promediador
- 8 Tarjeta A/D
- 9 Laptop Core™2 Duo, Con software MATLAB® versión 7.10.0.499 (r2010a)
- 10 Fibra óptica multimodo
- 11 Filtro para u.v actúa 30% de atenuación en menos de 355 nm

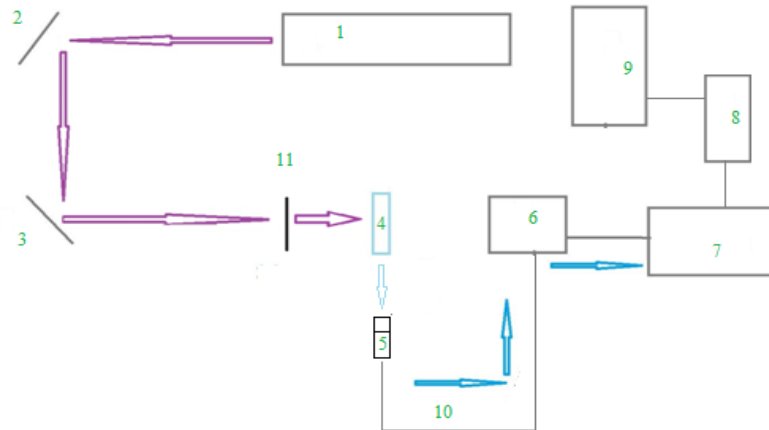


Figura 4. 20 Arreglo experimental para analizar la estabilidad del láser

Para el registro del láser la señal digitalizada se grafico en una computadora mediante un programa realizado en Matlab, cuya interfase se muestra en la (Figura 4. 21). Este programa controla el motor del monocromador ataraves de un puerto serie (convertor USB-serie de steren), para ello requiere saber la velocidad de amstrongs/ minuto, con este dato calcula el tiempo que tardara en adquirir datos a una frecuencia máxima de muestreo de 10 muestras por segundo, se puede omitir la programación del monocromador por indicar al programa el tiempo de adquisición de datos, asi mismo se puede manipular el motor para reversa, adelante y paro, los datos son graficados en tiempo real y guardados en un archivo txt, para su posterior manipulación. El programa se muestra en el anexo técnico de este trabajo.



Figura 4. 21 Interfase del programa para ver IF con un fotodiodo y tarjeta A/D



A continuación se muestra el programa el cual requiere 3 archivos para funcionar (tc08connect.m, tc08disconnect.m, tc08query.m), disponible en librerías de MATLAB.

#### 4.13.2 Material y equipo empleado para ver estabilidad del láser

A continuación mencionaremos detalladamente las partes del diseño experimental:

- 1** Láser Nd-YAG, 355 nm, 20hz, 235 Mw
- 2** Primer Espejo: 45 grados, reflejo de luz 355 nm
- 3** Segundo Espejo: 45 grados, reflejo de luz 355 nm
- 4** Celda de cuarzo de 3.5 ml conteniendo la muestra de Cumarina 460 50 $\mu$ M
- 5** Fotodiodo marca Hamamatsu, modelo S1722-02
- 6** Monocromador marca Pacific Instruments, modelo MP1018B
  - Configuración Czerny-Turner (Figura 2. 25)
  - Rejilla de difracción 1800 líneas
  - Selección de barridos 2,5,10,20,50 y 100 nm/min
  - Resolución de rejilla 0.1 nm
  - Rendija 5 mm
- 7** Integrador promediador
  - Integrador marca Stanford Research System, modelo SR25
  - Integrador de ventana de alta velocidad Tipo NIM
  - Trigger: Externo (dado por el laser Nd-Yag)
  - Promediación (muestras/min) 10
  - Ancho de ventana 100 ns
  - Sensibilidad de la señal 20 mV
  - Retraso 100 ns
- 8** Tarjeta A/D
  - ADC-24
  - Resolución 24-bits
  - 10 muestras por Segundo
  - +/- 2500 mv
- 9** Laptop Core™2 Duo, Con software MATLAB® versión 7.10.0.499 (r2010a)
- 10** Fibra óptica multimodo para microscopio 5mm
- 11** Filtro para u.v actúa 30% de atenuación en menos de 355 nm

## 5.0 Resultados

### 5.1 Prueba de adquisición del sistema de espectroscopia.

La (Figura 5. 1) muestra un espectro de emisión, generado por la luz reflejada en el techo, de una lámpara incandescente Philips de 100 W, la incandescencia es registrado por el sistema de espectroscopia AVANTES , correspondiente al arreglo experimental de la (Figura 5. 1). Esta prueba se realizó ya que se sabe que el espectro de la lámpara incandescente es continuo en un amplio rango de longitud de onda visible e infrarrojo, sin emitir en el ultra violeta.

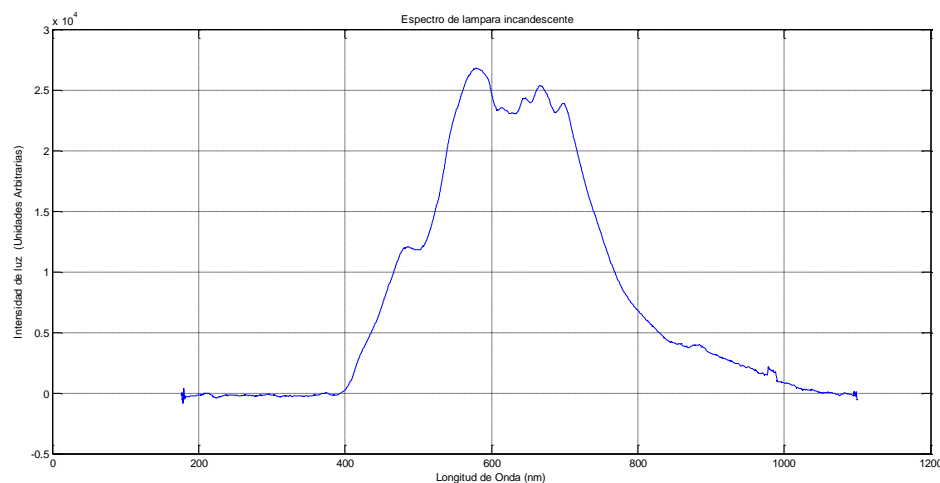


Figura 5. 1 Espectro de emisión continuo, generado por la luz de una lámpara incandescente.

### 5.2 Espectros de fluorescencia de NADH en CMNSPR y $\beta$ -NADH en solución 5 $\mu$ M.

Se grafican espectros de IF con respecto a la longitud de onda, con y sin aplicación de radiación láser IR, en 2 modos de fluorescencia continua e intermitente (MFC y MFI):



- **Modo de fluorescencia continúa (MFC) :**

- 5.2.1 Espectros de fluorescencia en el tiempo, de NADH en CMNSPR, solución 5 $\mu$ M, con y sin aplicación de radiación láser IR, un espectro por segundo durante 40 minutos, 2 casos: uno para cada condición (**Figura 5. 2**)
- 5.2.2 Espectros de fluorescencia promedio de NADH en CMNSPR, solución 5 $\mu$ M, con y sin aplicación de radiación láser IR, 2 casos: uno para cada condición , promedio cada 5 minutos durante 40 minutos (**Figura 5. 3**)
- 5.2.3 Espectros promedio de promedios de fluorescencia de NADH en CMNSPR, solución 5 $\mu$ M, con y sin aplicación de radiación láser IR, 10 casos: 5 para cada condición , promedio cada 5 minutos durante 30 minutos, normalizados (**Figura 5. 4**).
- 5.2.4 Espectros promedio de promedios de la fluorescencia de  $\beta$ -NADH en solución 5  $\mu$ M, con y sin aplicación de radiación láser IR, 2 muestras: una para cada condición, promedio cada 5 minutos durante 30 minutos (**Figura 5. 5**).

- **Modo de fluorescencia intermitente (MFI):**

- 5.2.5 Espectros promedio de fluorescencia de NADH en CMNSPR, solución 5 $\mu$ M, con y sin aplicación de radiación láser IR, 10 casos: 5 para cada condición , promedio cada 5 minutos durante 30 minutos, normalizados (**Figura 5. 6**).

5.2.1 Espectros de fluorescencia de NADH en CMNSPR, MFC, con y sin aplicación de radiación láser IR, 2 casos (uno para cada condición).

La (**Figura 5. 2**) muestra espectros de fluorescencia en el tiempo sobre la molécula NADH, para 2 muestras de CMNSPR 5 $\mu$ M en solución fosfato, con y sin aplicación de aplicación de radiación láser IR, lado derecho, lado izquierdo, respectivamente, modo de fluorescencia continúa, se registraron 2400 espectros para cada uno de los casos equivalente a 40 minutos de registro, un espectro por segundo. Estos espectros presentan picos de intensidad máxima en 440 y 460 nm.

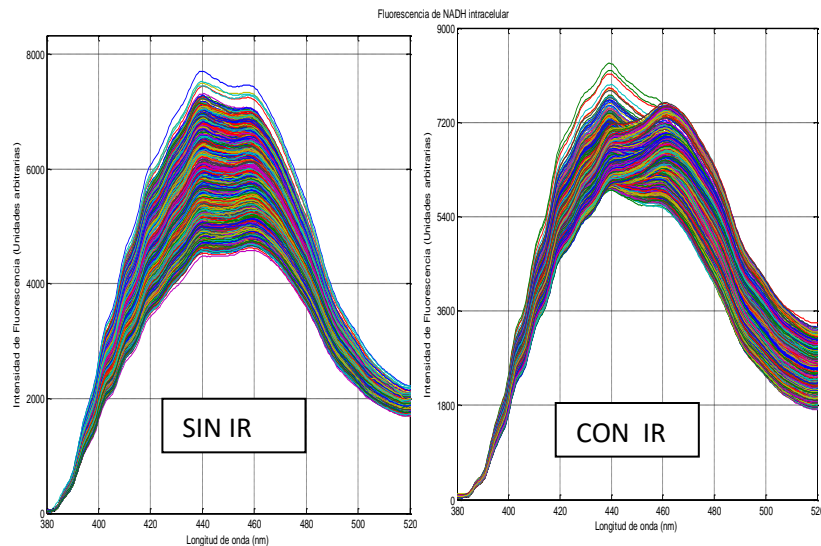


Figura 5. 2 Espectros de fluorescencia a un espectro por segundo, NADH en CMNSPR, solución fosfato  $5\mu\text{M}$ , 40 minutos, 2 casos: uno para cada condición, con y sin aplicación de aplicación de radiación láser IR, modo de fluorescencia continua (2400 espectros para cada condición).

### 5.2.2 Espectros promedio de fluorescencia de NADH en CMNSPR, MFC, con y sin aplicación de radiación láser IR, 2 casos (uno para cada condición).

Espectros promedio de IF con respecto a la longitud de onda, de la fluorescencia de NADH (**Figura 5. 3**), para 2 muestras de CMNSPR en solución fosfato  $5\mu\text{M}$ , con y sin aplicación de radiación láser IR, lado derecho, lado izquierdo, respectivamente, promedios cada 5 minutos durante 40 minutos a un espectro por segundo. Notese que con aplicación de radiación láser IR se presenta una recuperación de la IF a partir del minuto 20, y que el pico máximo de intensidad de florescencia cambia de 440 nm a 460 nm.

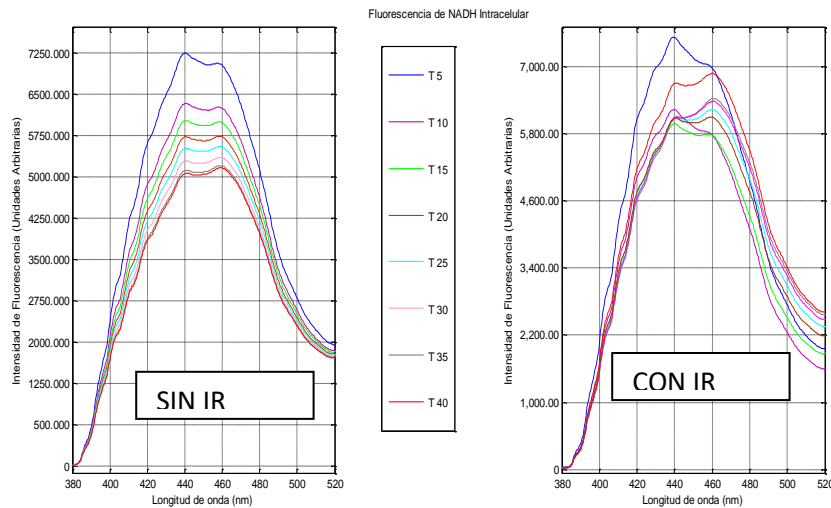


Figura 5. 3 Espectros de fluorescencia promedio de NADH en CMNSPR solución fosfato 5 $\mu$ M, 2 casos: uno para cada condición, con y sin TLBI, 40 minutos, modo de fluorescencia continua.

### 5.2.3 Espectros promedio de fluorescencia NADH de CMNSPR, MFC, normalizados con y sin aplicación de radiación láser IR, 10 casos (5 para cada condición).

La figura (**Figura 5. 4**) muestra espectros promedio de IF vs. longitud de onda, NADH de CMNSPR en solución fosfato 5 $\mu$ M, para 10 muestras con y sin aplicación de aplicación de radiación láser IR, lado derecho, lado izquierdo respectivamente, 5 muestras para cada condición, normalizados, promediación cada 5 minutos durante 30 minutos a un espectro por segundo. La IF decae un 27.6% sin aplicación de aplicación de radiación láser IR, mientras que con aplicación de radiación láser IR decae 15.2%.



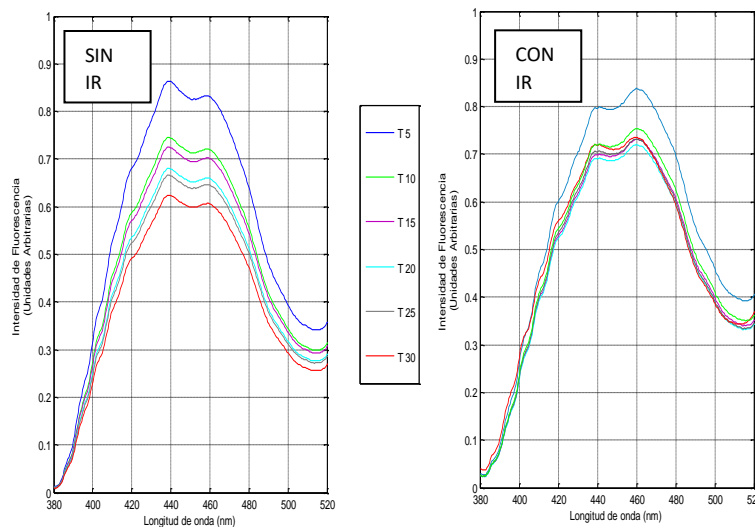
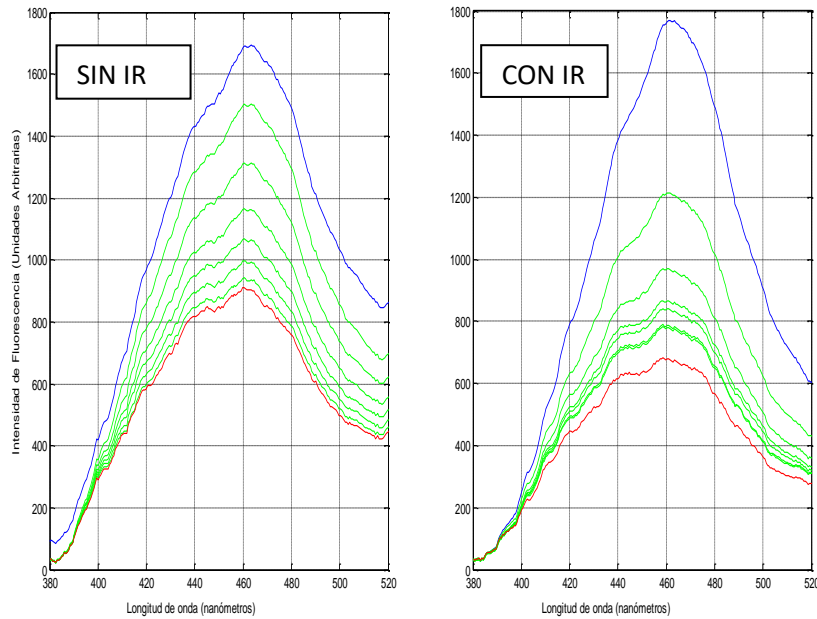


Figura 5. 4 Espectros promedio de fluorescencia de NADH en CMNSPR, solución fosfato 5 $\mu$ M, con y sin aplicación de radiación láser IR, 10 muestras 5 para cada condición , 30 minutos, modo de fluorescencia continúa.

### 5.2.4 Espectros promedio de fluorescencia $\beta$ -NADH, MFC, con y sin aplicación de radiación láser IR, 2 casos (1 para cada condición).

La (Figura 5. 5) muestra espectros promedio de IF vs. longitud de onda, de  $\beta$ -NADH de la empresa Sigma-Aldrich en solución buffer trizma 5 $\mu$ M, modo de fluorescencia continua, con y sin aplicación de aplicación de radiación láser IR, lado derecho, lado izquierdo respectivamente, 2 muestras, 1 para cada condición, el color azul marca el inicio, el verde el decaimiento y el rojo el final de la exposición a la luz. Promediación cada 5 minutos durante 40 minutos a un espectro por segundo. Note que el pico máximo de IF permanece siempre en 460 nm y que no se obtiene recuperación de la fluorescencia, la señal decayó 47% sin aplicación de aplicación de radiación láser IR, mientras que con aplicación de aplicación de radiación láser IR decayó 61.2%.



**Figura 5. 5** Espectros promedio de la fluorescencia de  $\beta$ -NADH en solución ( $5 \mu\text{M}$ ), modo de fluorescencia continua, con y sin aplicación de radiación láser IR (derecha e izquierda respectivamente).

### 5.2.5 Espectros promedio de fluorescencia NADH de CMNSPR, MFI, normalizados, con y sin aplicación de radiación láser IR, 10casos (5 para cada condición).

Espectros promedio de IF respecto a la longitud de onda, de la fluorescencia de NADH, normalizados, para 10 muestras de CMNSPR en solución fosfato  $5\mu\text{M}$ , con y sin aplicación de radiación láser IR, lado derecho, lado izquierdo, respectivamente, 5 muestras para cada condición. Promediación cada 5 minutos durante 30 minutos a un espectro por segundo en modo de fluorescencia intermitente. La señal decayó 19.3% sin aplicación de radiación láser IR, mientras que con aplicación de radiación láser IR decayó 20%

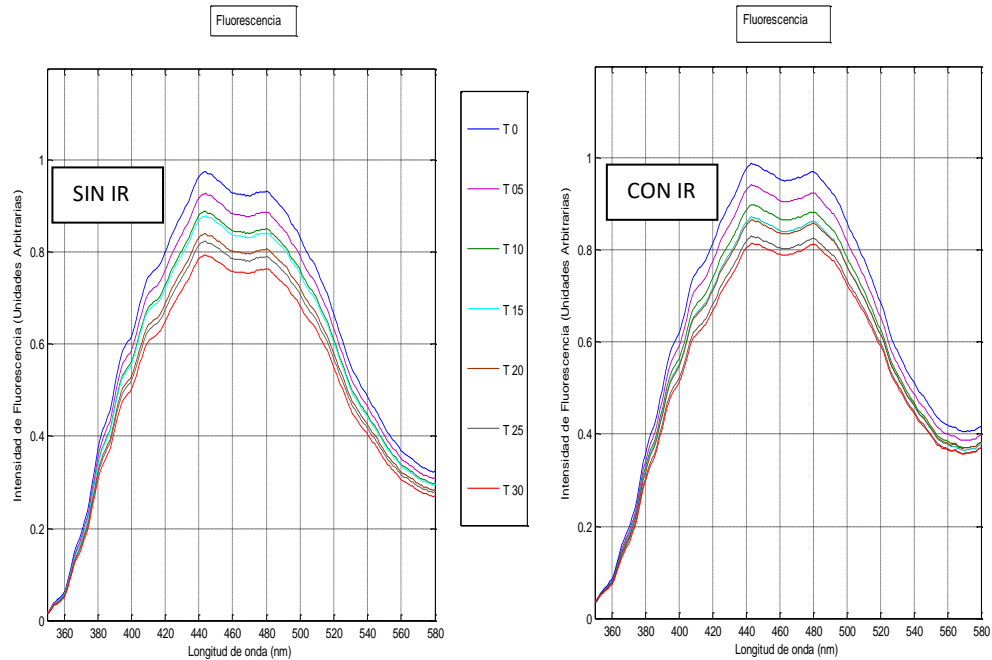


Figura 5. 6 Espectros promedio, normalizados de NADH de CMNSPR 5 $\mu$ M, 10 muestras con y sin aplicación de radiación láser IR, 30 minutos, 5 casos para cada condición, modo fluorescencia intermitente.

### 5.3 IF en el tiempo de NADH en CMNSPR y de $\beta$ -NADH en solución.

Análisis de la IF en el tiempo, longitudes de onda 440 nm y 460 nm con y sin TLBI de NADH de CMNSPR en solución fosfato 5  $\mu$ M y de  $\beta$ -NADH 5  $\mu$ M en solución buffer Trizma y SEM 0.01 M.

#### Modo de fluorescencia continúa:

5.3.1)  $\beta$ -NADH en solución, sin aplicación de radiación láser IR, 1 muestra (Figura 5. 7).

5.3.2)  $\beta$ -NADH en solución, 1 muestra, con aplicación de radiación láser IR (Figura 5. 8).

5.3.3) Ajuste logarítmico de la IF en el tiempo de  $\beta$ -NADH en solución, con y sin aplicación de radiación láser IR, 2 muestras, una para cada condición, normalizado (Figura 5. 9).

5.3.4) Gráficas de IF en el tiempo de NADH en CMNSPR en solución 5  $\mu\text{M}$ , con y sin aplicación de aplicación de radiación láser IR, 2 muestras, una para cada condición, modo de fluorescencia continua, 440 nm, 460 nm y 470 nm (**Figura 5. 10**).

5.3.5) Curvas de IF en el tiempo, NADH de CMNSPR en solución fosfato 5 $\mu\text{M}$ , para 10 diferentes casos, 5 casos para cada condición, normalizadas, 440 nm, modo de obtención fluorescencia continua (**Figura 5. 11**).

5.3.6) Curvas de IF en el tiempo, NADH de CMNSPR en solución fosfato 5 $\mu\text{M}$ , para 10 diferentes casos, 5 casos para cada condición, normalizadas, 460 nm, modo de obtención fluorescencia continua (**Figura 5. 12**).

### 5.3.1 IF en el tiempo de $\beta$ -NADH sin aplicación de aplicación de radiación láser IR.

IF de  $\beta$ -NADH en el tiempo, solución 5  $\mu\text{M}$ , con buffer Trizma y SEM 0.01M, de la empresa Sigma-Aldrich, modo de fluorescencia continua, durante 40 minutos , 1 caso, sin aplicación de aplicación de radiación láser IR.

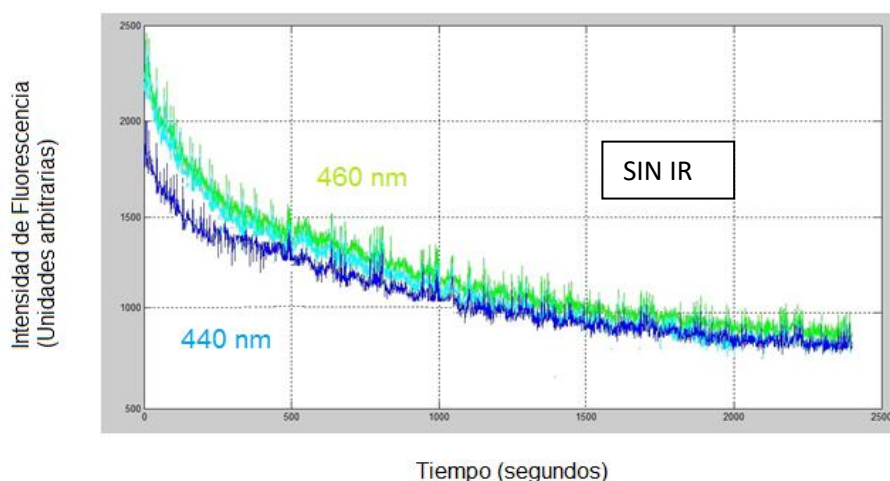


Figura 5. 7 IF de  $\beta$ -NADH en el tiempo, Solución 5  $\mu\text{M}$  en solución Buffer Trizma y SEM, de la empresa Sigma-Aldrich, sin aplicación de radiación láser IR.

### 5.3. 2 IF en el tiempo de $\beta$ -NADH con aplicación de aplicación de radiación láser IR.

IF de  $\beta$ -NADH en el tiempo, solución 5  $\mu$ M, con buffer Trizma y SEM 0.01M, de la empresa Sigma-Aldrich, modo de fluorescencia continua, durante 40 minutos , 1 caso, con aplicación de radiación láser IR.

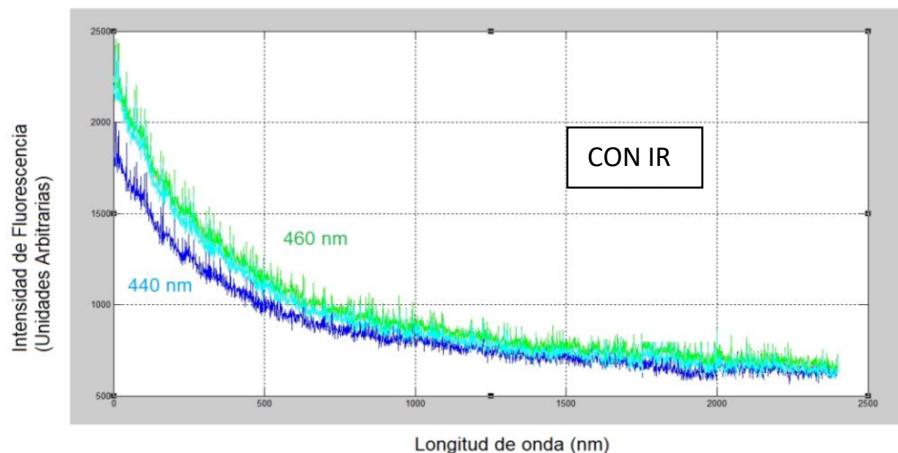


Figura 5. 8 IF de  $\beta$ -NADH en el tiempo, Solución 5  $\mu$ M en solución Buffer Trizma y SEM, de la empresa Sigma-Aldrich, con aplicación de radiación láser IR.

### 5.3.3 Ajuste logaritmico de curvas de IF en el tiempo de $\beta$ -NADH en solución.

Se realiza un ajuste logarítmico de las curvas de IF vs tiempo de la disolución  $\beta$ -NADH (5  $\mu$ M), en MES y Trizma (0.01 M), longitud de onda 460 nm, con y sin aplicación de radiación láser IR (1 caso para cada condición), modo de obtención fluorescencia continua, 40 minutos, a un espectro por segundo. Note que en ambos casos se ajusta la

curva a un logaritmo, se coloca en la figura la ecuación a la que se ajusta y el valor de  $R^2$  (Figura 5. 9). El coeficiente de determinación, denominado  $R^2$  es usado en el contexto de un modelo estadístico cuyo principal propósito es predecir futuros resultados o probar una hipótesis, en este caso el modelo es la ecuación logarítmica. El coeficiente determina la calidad del modelo para replicar los resultados, y la proporción de variación de los resultados que puede explicarse por el modelo. Los datos se ajustan mejor al modelo mientras el valor de  $R^2$  sea más cercano a 1.

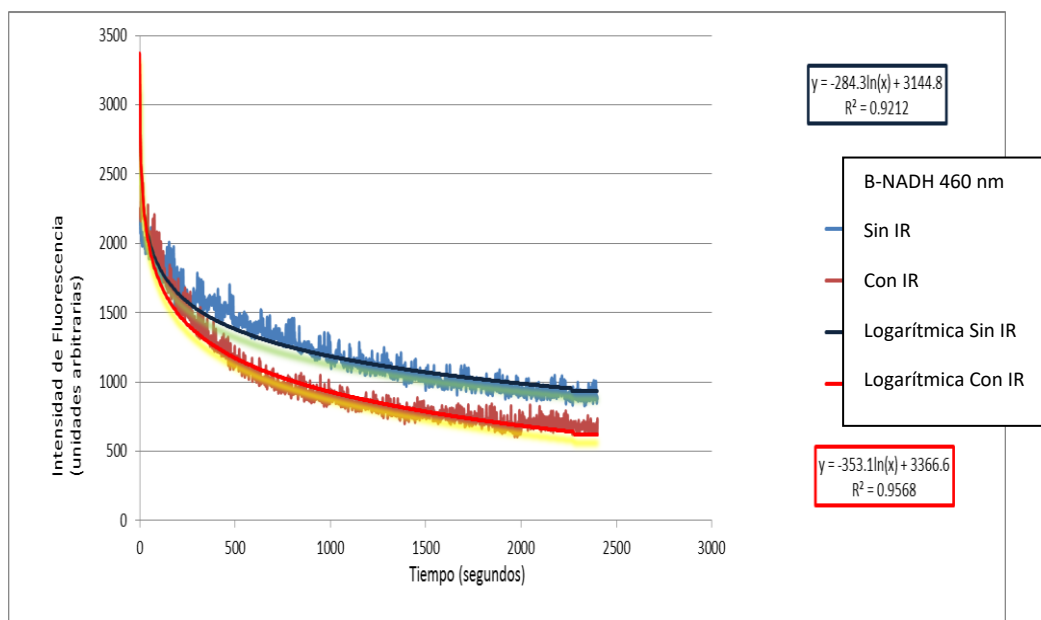


Figura 5. 9 Ajuste logaritmico de la IF en el tiempo de solución  $\beta$ -NADH  $5 \mu\text{M}$  , con y sin aplicación de radiación láser IR (1 caso para cada condición), modo de obtención fluorescencia continua, 460 nm.

### 5.3.4 Curvas de IF en el tiempo de NADH en CMNSPR, con y sin aplicación de radiación láser IR.

Gráficas de IF en el tiempo de NADH en CMNSPR, solución buffer 5  $\mu\text{M}$ , con y sin aplicación de aplicación de radiación láser IR, 2 muestras, una para cada condición, modo de fluorescencia continua, longitud de onda: 440 nm, 460 nm y 470 nm (**Figura 5. 10**). Note que con aplicación de radiación láser IR en longitud de onda 460 y 470 nm, se presenta un aumento de la fluorescencia apreciable a partir del minuto 20.

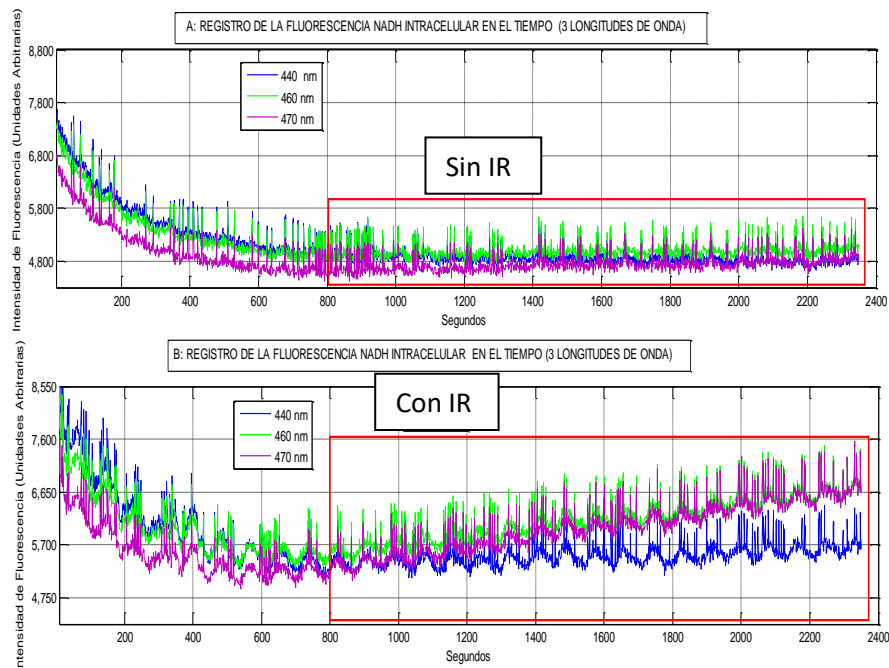


Figura 5. 10 Curvas de IF vs tiempo de NADH (5  $\mu\text{M}$ ) de CMNSPR, con y sin aplicación de radiación láser IR (1 caso para cada condición), modo de fluorescencia continua, 440 nm, 460 nm y 470 nm.

### 5.3.5 Curvas de IF en el tiempo, de NADH en CMNSPR, 10 casos, con y sin TLBI, 440 nm.

En la figura **Figura 5. 11** se presentan curvas de IF en el tiempo, NADH de CMNSPR en solución fosfato  $5\mu\text{M}$ , para 10 diferentes casos, 5 casos para cada condición, normalizadas, 440 nm, modo de obtención fluorescencia continua.

Note que las curvas con aplicación de TLBI, se dispersan más unas de otras.

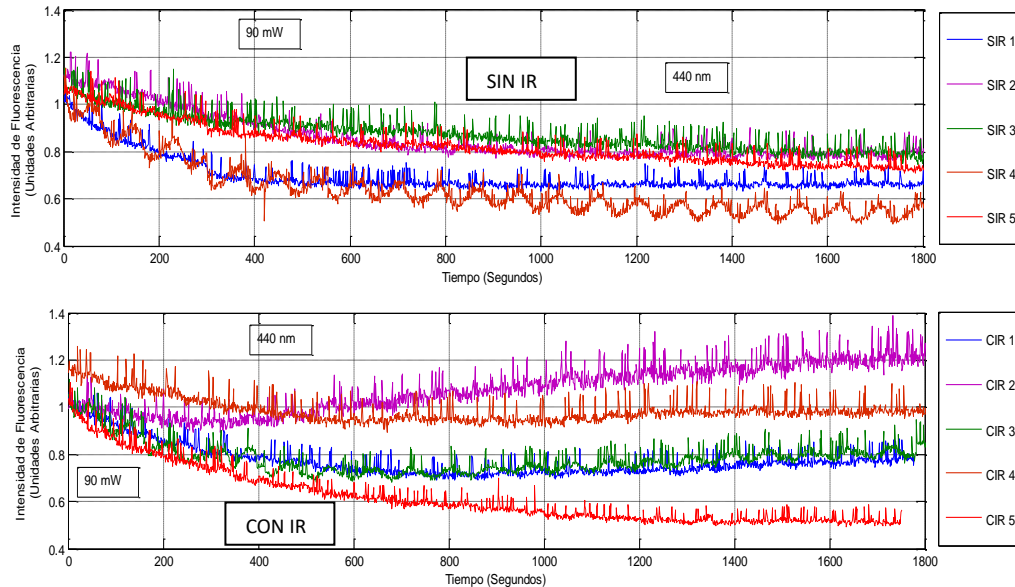


Figura 5. 11 Curvas de IF promedio de NADH en el tiempo, para 10 diferentes casos de CMNSPR  $5\mu\text{M}$  en solución fosfato, con y sin aplicación de radiación láser IR (5 casos para cada condición), 440 nm.

### 5.3.6 Curvas de IF en el tiempo, de NADH en CMNSPR, 10 casos, con y sin aplicación de radiación láser IR, 460 nm.

En la figura **Figura 5. 12** se presentan curvas de IF en el tiempo, NADH de CMNSPR en solución fosfato  $5\mu\text{M}$ , para 10 diferentes casos, 5 casos para cada condición, normalizadas, 460 nm, modo de obtención fluorescencia continua.



Note que las curvas con aplicación de aplicación de radiación láser IR, se dispersan más unas de otras.

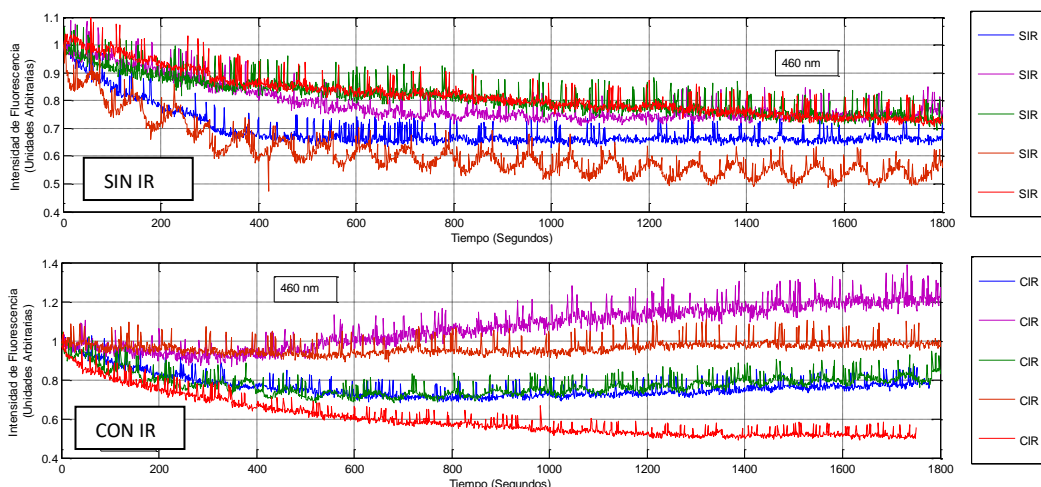


Figura 5. 12 Curvas de IF promedio de NADH en el tiempo, para 10 diferentes casos de CMNSPR en solución fosfato  $5\mu\text{M}$ , 5 casos para cada condición, 460 nm.

#### 5.4.0 Ajuste logaritmico de las curvas de IF en el tiempo de NADH en CMNSPR, en solución fosfato $5\mu\text{M}$ , 10 casos.

En la Tabla 5. 1 se presentan las ecuaciones correspondientes al ajuste logaritmico de las curvas de IF en el tiempo de NADH en CMNSPR, solución fosfato  $5\mu\text{M}$ , 10 casos, con y sin aplicación de radiación láser IR, 5 para cada condición, 440 nm y 460 nm, normalizado, Note que los casos donde no se aplica la radiación láser IR las curvas se ajustan más a un comportamiento logarítmico.



CASO	Sin IR		R <sup>2</sup>	CASO	Con IR		R <sup>2</sup>
	440 nm	Ajuste logaritmico			440 nm	Ajuste logaritmico	
SIR 1		-0.071ln(x) + 1.1586	0.8015	CIR 1		-0.058ln(x) + 1.1501	0.6526
SIR 2		-0.092ln(x) + 1.4564	0.8516	CIR 2		0.0701ln(x) + 0.624	0.4903
SIR 3		-0.067ln(x) + 1.3158	0.7977	CIR 3		-0.039ln(x) + 1.0424	0.3252
SIR 4		-0.113ln(x) + 1.3749	0.8764	CIR 4		-0.04ln(x) + 1.2513	0.4859
SIR 5		-0.083ln(x) + 1.3672	0.8873	CIR 5		-0.119ln(x) + 1.3908	0.9325
CASO	Sin IR		R <sup>2</sup>	CASO	Con IR		R <sup>2</sup>
	460 nm	Ajuste logaritmico			460 nm	Ajuste logaritmico	
SIR 1		-0.063ln(x) + 1.1041	0.7762	CIR 1		-0.047ln(x) + 1.0703	0.5596
SIR 2		-0.065ln(x) + 1.2143	0.7888	CIR 2		0.0771ln(x) + 0.5706	0.5267
SIR 3		-0.058ln(x) + 1.1932	0.779	CIR 3		-0.024ln(x) + 0.9372	0.1829
SIR 4		-0.087ln(x) + 1.1746	0.8377	CIR 4		0.0022ln(x) + 0.9512	0.004
SIR 5		-0.073ln(x) + 1.2937	0.868	CIR 5		-0.103ln(x) + 1.27	0.9294

Tabla 5. 1 Ajuste logarítmico de las curvas de IF promedio de NADH, 10 casos, con y sin aplicación de radiación láser IR, 5 para cada condición.

## 5.5 Graficas de la media y desviación estandar de IF en el tiempo, NADH de CMNSPR, con y sin aplicación de radiación láser IR.

### Modo de Fluorescencia Continua:

5.5.1 Graficas de la media y desviación estandar de IF en el tiempo, NADH de CMNSPR , con y sin aplicación de radiación láser IR, 440 nm, fluorescencia continua, 10 casos : 5 para cada condición (**Figura 5. 13**).

5.5.2 Graficas de la media y desviación estandar de IF en el tiempo, NADH de CMNSPR , con y sin aplicación de radiación láser IR, 460 nm, fluorescencia continua, 10 casos :5 para cada condición (**Figura 5. 14**).

### Modo de Fluorescencia Intermitente:

5.5.3 Graficas de la media y desviación estandar de IF en el tiempo, NADH de CMNSPR , con y sin aplicación de radiación láser IR, 440 nm, fluorescencia continua, 10 casos : 5 para cada condición, (**Figura 5. 15**)

5.5.4 Graficas de la media y desviación estandar de IF en el tiempo, NADH de CMNSPR , con y sin aplicación de radiación láser IR, 460 nm, fluorescencia continua, 10 casos :5 para cada condición, (**Figura 5. 16**).

### 5.5.1 Graficas de la media y desviación estandar de IF en el tiempo, NADH de CMNSPR, con y sin aplicación de radiación láser IR, 440 nm, MFC.

Se grafican los valores de las medias y las desviaciones estándar correspondientes a 30 minutos de adquisición (**Figura 5. 13**), frecuencia de adquisición: 1 espectro por segundo, promediación cada 5 minutos, 10 casos, con y sin aplicación de radiación láser IR, a tiempo 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos (T5, T10, T15, T20, T25, T30), longitud de onda 440 nm, fluorescencia continua.

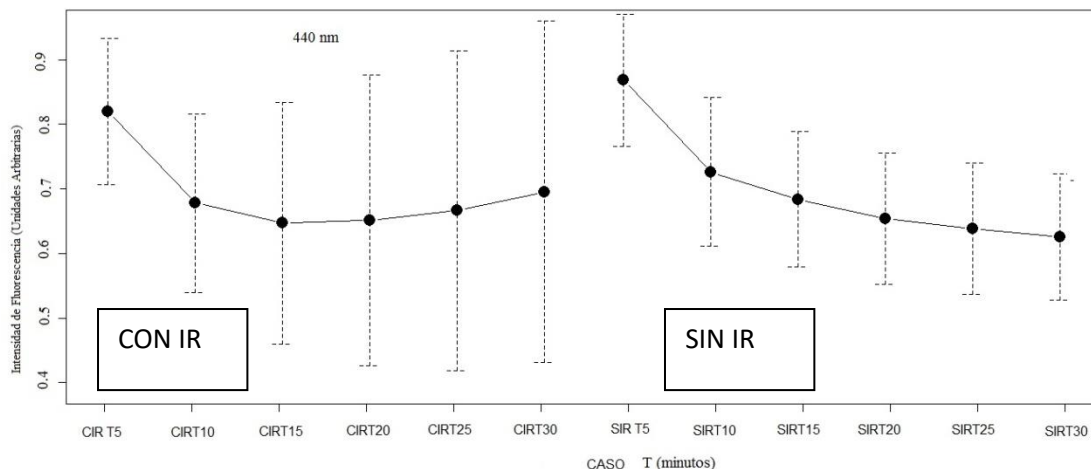


Figura 5. 13 Curvas de las medias y desviación estándar de la IF de NADH en CMNSPR, solución fosfato 5μM, con y sin aplicación de radiación láser IR, 440 nm, MFC.

### 5.5.2 Graficas de la media y desviación estandar de IF en el tiempo a 460 nm, NADH de CMNSPR, con y sin aplicación de radiación láser IR, MFC.

Se grafican los valores de las medias y las desviaciones estándar correspondientes a 30 minutos de adquisición (**Figura 5. 14**), frecuencia de adquisición: 1 espectro por segundo, promediación cada 5 minutos, 10 casos, con y sin aplicación de radiación láser IR,

a tiempo 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos (T5, T10, T15, T20, T25, T30), longitud de onda 460 nm.

Note que con aplicación de aplicación de radiación láser IR la desviación estándar aumenta a medida que transcurre el tiempo.

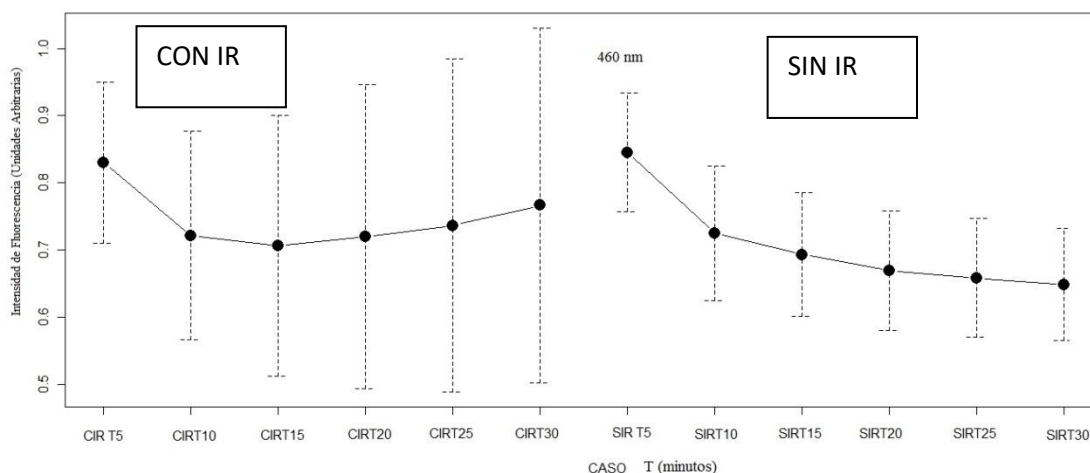


Figura 5. 14 Curvas de IF promedio de NADH en CMNSPR, solución fosfato 5 $\mu$ M, con y sin aplicación de aplicación de radiación láser IR, 460 nm, MFC.

### 5.5.3 Graficas de la media y desviación estandar de IF a 440 nm , en el tiempo, NADH de CMNSPR, con y sin aplicación de radiación láser IR, MFI.

Se grafican los valores de las medias y las desviaciones estándar correspondientes a 30 minutos de adquisición (**Figura 5. 15**), frecuencia de adquisición: 1 espectro por segundo, promediación cada 5 minutos, 10 casos, con y sin aplicación de radiación láser IR, a tiempo 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos (T5, T10, T15, T20, T25, T30), longitud de onda 440 nm, MFI.

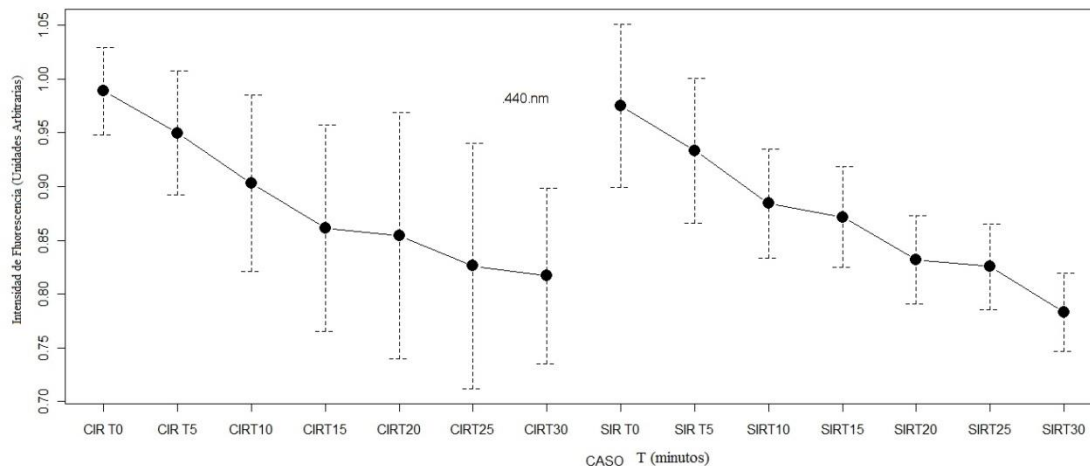


Figura 5. 15 Curvas de IF promedio de NADH en CMNSPR, solución fosfato 5 $\mu$ M, con y sin aplicación de aplicación de radiación láser IR, 440 nm, MFI.

#### 5.5.4 Graficas de la media y desviación estandar de IF en el tiempo, NADH de CMNSPR, con y sin aplicación de radiación láser IR, 460 nm, MFI.

Se grafican los valores de las medias y las desviaciones estándar correspondientes a 30 minutos de adquisición (**Figura 5. 16**), frecuencia de adquisición: 1 espectro por segundo, promediación cada 5 minutos, 10 casos, con y sin TLBI (CIR =con infrarrojo, SIR= sin infrarrojo respectivamente), a tiempo 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos (T5, T10, T15, T20, T25, T30), longitud de onda 460 nm, MFI. Los valores de la desviación estándar disminuyen conforme pasa el tiempo cuando no se les aplica TLBI, y aumentan con aplicación de TLBI.

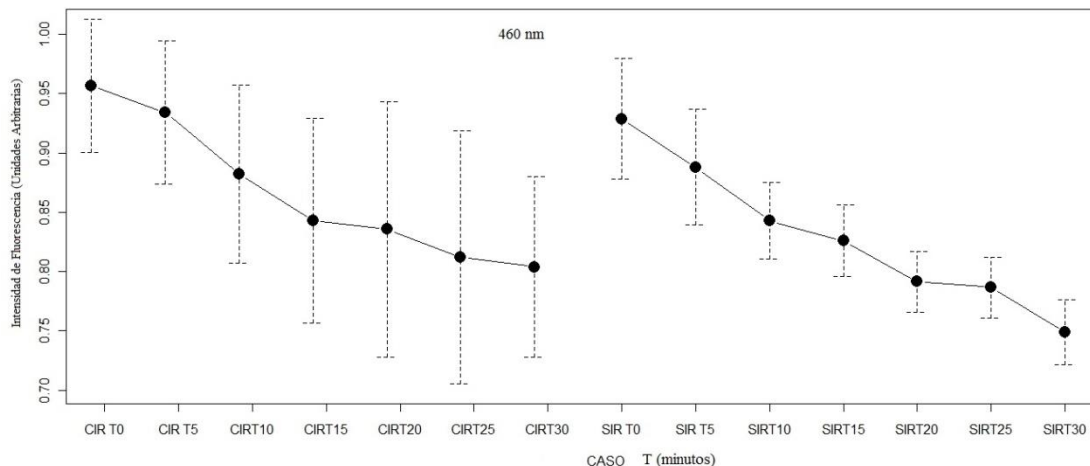


Figura 5. 16 Curvas de IF a 460 nm, promedio de NADH en CMNSPR, solución fosfato 5 $\mu$ M, con y sin aplicación de radiación láser IR, MFI.

## 5.6 Comparación de Medias y desviaciones estándar de IF de NADH en CMNSPR con y sin aplicación de radiación láser IR, MFC y MFI.

5.6.1 Grafica comparativa de la media estadística de la IF a 440 y 460 nm de NADH en CMNSPR en MFC, con y sin aplicación de radiación láser IR.

5.6.2 Grafica comparativa de la media estadística de la IF a 440 y 460 nm de NADH en CMNSPR en MFI, con y sin aplicación de radiación láser IR.

5.6.3 Grafica comparativa de la media estadística de la IF a 440 y 460 nm de NADH en CMNSPR en MFC y MFI, con y sin aplicación de radiación láser IR.

5.6.4 Grafica comparativa de variaciones en la IF a 440 y 460 nm de NADH en CMNSPR, con y sin aplicación de radiación láser IR, en MFC y MFI.

### 5.6.1 Grafica comparativa de la media estadística de la IF a 440 y 460 nm de NADH en CMNSPR en MFC, con y sin TLBI.

En la (Figura 5. 17) se presenta una comparativa de las medias de la IF de NADH en CMNSPR en modo de fluorescencia continua, con y sin aplicación de radiación láser IR, 10 casos: 5 para cada condición, 440 y 460 nm.

En esta comparación vemos que:

- Cuando se aplica radiación láser IR:
  - o La longitud de onda en donde se da la máxima IF es 460 nm
  - o Existe una recuperación de la fluorescencia apreciable en el minuto 20
  - o El decaimiento máximo de fluorescencia de 460 nm es de 14.8% y el de de 440 nm es de 25%
  - o La recuperación de fluorescencia del minuto 15 al minuto 30 es de 13 % para 440 nm y 8% para 460 nm.
- Cuando no se aplica radiación láser IR:
  - o La longitud de onda en donde se da la máxima IF es 440 nm
  - o El decaimiento máximo de fluorescencia de 460 nm es de 26.8% y el de de 440 nm es de 31.8%
  - o No existe recuperación de la fluorescencia

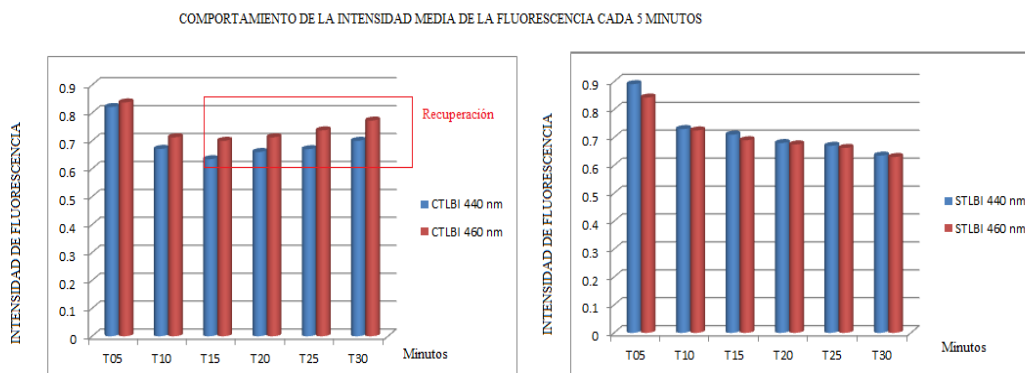


Figura 5. 17 Comparativa de las medias de IF a 440 y 460 nm de NADH en CMNSPR, 5  $\mu$ M, MFC, con y sin aplicación de radiación láser IR, 10 casos: 5 para cada condición.

### 5.6.2 Grafica comparativa de la media estadística de la IF a 440 y 460 nm de NADH en CMNSPR en modo de fluorescencia intermitente, con y sin aplicación de radiación láser IR.

En la (Figura 5. 18) se presenta una comparativa de las medias de la IF de NADH en CMNSPR en modo de fluorescencia intermitente, con y sin aplicación de radiación láser IR, 10 casos: 5 para cada condición, 440 y 460 nm.

En esta comparación vemos que:

- Cuando se aplica la radiación láser IR:
  - o El decaimiento máximo de fluorescencia de 460 nm es de 17.1% y el de de 440 nm es de 18.3%
- Cuando no se aplica la radiación láser IR:
  - o El decaimiento máximo de fluorescencia de 460 nm es de 19% y el de 440 nm es de 20 %

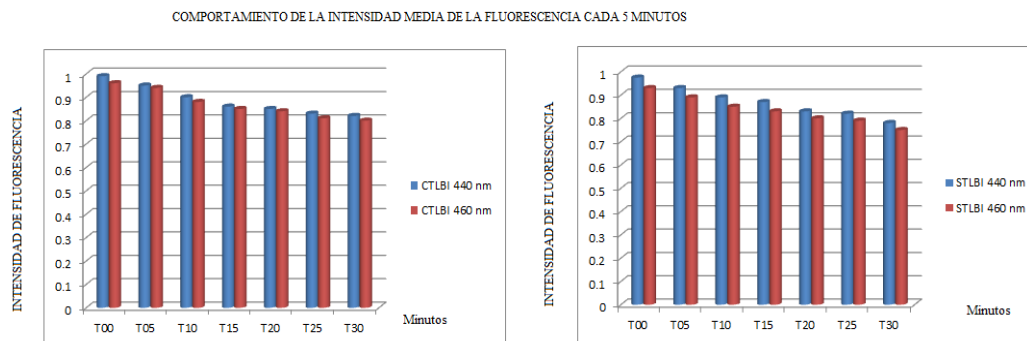


Figura 5. 18 Comparativa de las medias de la IF de NADH en CMNSPR, 5  $\mu$ M, modo de fluorescencia intermitente, con y sin radiación láser IR, 10 casos: 5 para cada condición, 440 y 460 nm.

### 5.6.3 Grafica comparativa de la media estadística de la IF de NADH en CMNSPR en modo de fluorescencia continua e intermitente, con y sin radiación láser IR 440 y 460 nm.



Comparando las medias de IF en 2 casos: modo de fluorescencia continua e intermitente (**Figura 5. 19**), normalizadas, veremos son muy similares, más cuando no se aplica radiación láser IR.

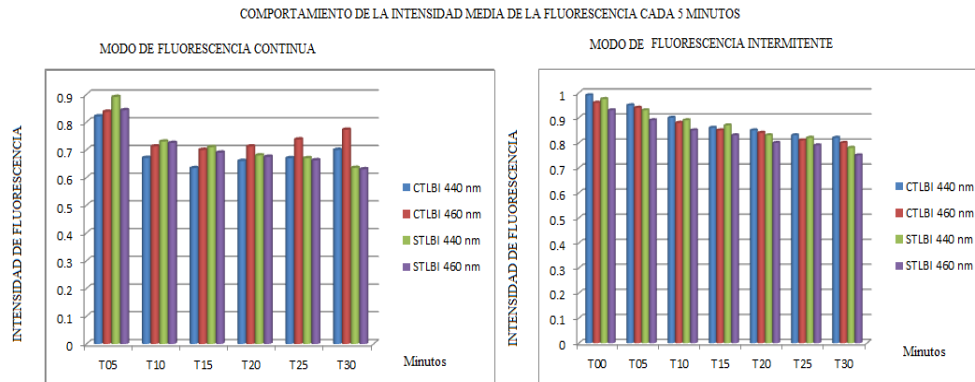


Figura 5. 19 Comparativa de las medias de IF en 2 casos: modo de fluorescencia continua e intermitente de la IF de NADH en CMNSPR, en modo de fluorescencia continua (10 casos) e intermitente (10 casos), con y sin radiación láser IR (5 casos para cada condición), 440 y 460 nm.

### 5.6.4 Grafica comparativa de variaciones en la IF a 440 y 460 nm de NADH en CMNSPR en MFC y MFI, con y sin radiación láser IR.

La ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. compara las variaciones en orcentaje (calculadas mediante la desviación estándar) de la IF, en 2 casos: MFC y MFI, normalizadas.

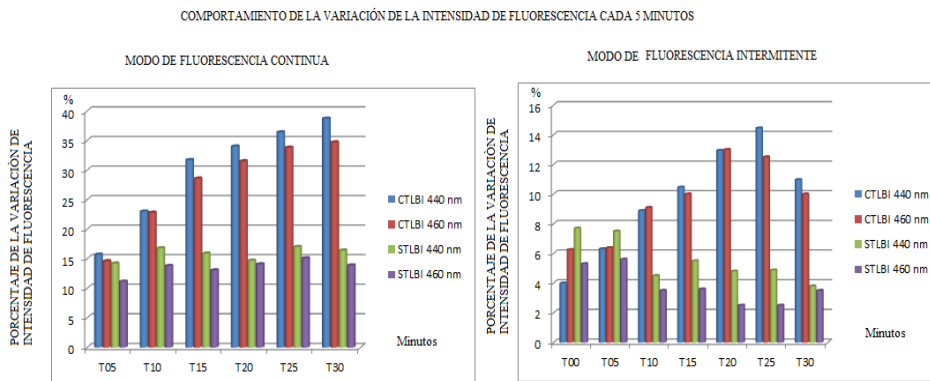


Figura 5. 20 Comparación de las variaciones estadísticas en porcentaje (calculadas mediante la desviación estándar) de la IF, en 2 casos: MFC y MFI, normalizadas.



La compara las variaciones en porcentaje (calculadas mediante la desviación estándar) de la IF, en 2 casos: MFC y MFI, normalizadas.

Variaciones de intensidad MFC:

- Con aplicación de radiación láser IR, (15 a 38 %) en longitud de onda 440 nm, de (14 a 34 %) en longitud de onda 460 nm.
- Sin aplicación de radiación láser IR, (14 a 17 %) en longitud de onda 440 nm, de (11 a 15 %) en longitud de onda 460 nm.
- Variaciones de intensidad modo de fluorescencia intermitente:
  - Con aplicación de radiación láser IR, (4 a 14.5 %) en longitud de onda 440 nm, de (6 a 13 %) en longitud de onda 460 nm.
  - Sin aplicación de radiación láser IR, (7.7 a 3.8 %) en longitud de onda 440 nm, de (5.6 a 2.5 %) en longitud de onda 460 nm.

Resumiendo:

- Se ve que en ambos modos de fluorescencia continua e intermitente, las variaciones aumentan cuando es aplicada la TLBI y a medida que transcurre el tiempo, aumento del 23% en MFC y 10.5% en MFI.
- Las variaciones son más grandes en el MFC que en el MFI hasta por un factor mayor de 2.
- Sin aplicación de TLBI la variación aumenta poco, 3% en MFC, o disminuye 3.9 % en MFI.

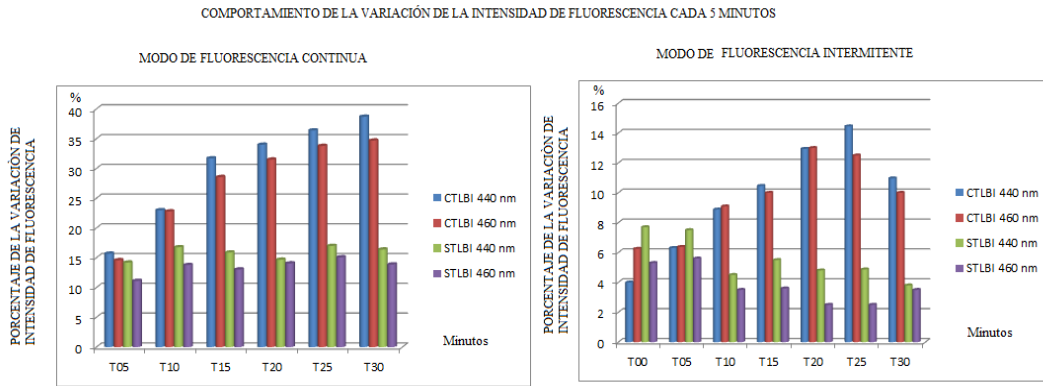


Figura 5. 21 Comparativa de las variaciones en porcentaje calculadas por la desviación estándar, de la IF de NADH en CMNSPR, en MFC (10 casos) y MFI (10 casos), con y sin aplicación de radiación láser IR (5 casos para cada condición), 440 y 460 nm.

### 5.7 Prueba estadística t-test para 2 casos, comparación de IF de CMNSPR con y sin aplicación de radiación láser IR.

Se realiza una prueba T para la comparación de 2 muestras independientes, bajo el supuesto de que las medias de la muestras son estadísticamente iguales con varianzas desiguales, a diferentes tiempos, para esto se utiliza un software de licencia libre llamado “R”, la comparación se realiza entre la IF de CMNSPR con y sin aplicación de radiación láser IR. El software calcula la media y la desviación estándar del muestreo realizado cada 5 minutos durante 30 minutos, a una frecuencia de muestreo de 1 segundo, las pruebas indican que no son iguales:

- 1) bajo el MFC (Tabla 5. 2).

LONGITUD DE ONDA	460 nm					
MODO	FLUORESCENCIA CONTINUA					
TIEMPO (MINUTOS)	5	10	15	20	25	30
MEDIA SIR	0.8850198	0.764986	0.7331218	0.7088405	0.6982067	0.6885699
MEDIA CIR	0.829902	0.7217208	0.7070573	0.7201382	0.7369281	0.7666198
GRADOS DE LIBERTAD	2732.425	2558.603	2148.783	1951.396	1872.962	1702.999
NIVEL DE CONFIANZA	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95
P-VALOR	2.20E-16	2.20E-16	2.74E-06	0.0314	1.36E-08	2.20E-16

Tabla 5. 2 Prueba T para comparación de 2 muestras iguales, suponiendo varianzas desiguales, de IF en CMNSPR, con y sin aplicación de radiación láser IR, MFC.

2) bajo el MFI (Tabla 5. 3).

LONGITUD DE ONDA	460 nm						
MODO	FLUORESCENCIA INTERMITENTE						
TIEMPO (MINUTOS)	0	5	10	15	20	25	30
MEDIA SIR	0.9288161	0.8878992	0.8429196	0.8259788	0.7914495	0.7866396	0.7489011
MEDIA CIR	0.952403	0.9299199	0.8778489	0.8386648	0.8315217	0.8076879	0.7996057
GRADOS DE LIBERTAD	393.78	381.61	269.237	246.534	221.48	221.698	250.082
NIVEL DE CONFIANZA	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95
P-VALOR	1.40E-05	1.37E-13	4.87E-09	0.04106	6.88E-07	0.007113	2.20E-16

Tabla 5. 3 Prueba T para comparación de 2 muestras iguales, suponiendo varianzas desiguales de IF en CMNSPR, con y sin aplicación de radiación láser IR, MFI.

### 5.8 Caracterización del peltier

Caracterización del peltier (Figura 5. 22) con variaciones de voltaje de 1 a 4 volts cada 10 minutos, para ello se usa una fuente variable de DC, con consumo menor a 2 A. La máxima estabilidad se logra a los 6 minutos.

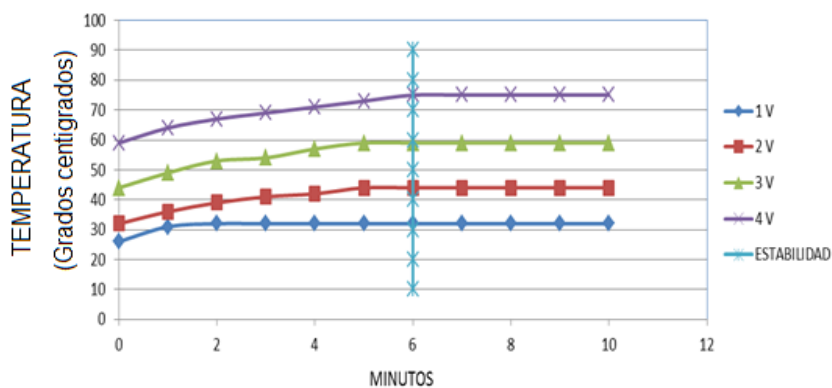


Figura 5. 22 Caracterización de temperatura por aplicación de temperatura en peltier.

### 5.9 Decaimiento de IF por aplicación de temperatura en Cumarina 460, 50 μM.

Decaimiento de la IF de Cumarina 460, 50  $\mu\text{M}$ , al pasar de 26 a 37 grados centígrados en un tiempo de 10 minutos, 4 espectro cada minuto, durante el calentamiento la señal decae un 69.4 % (Figura 5. 23).

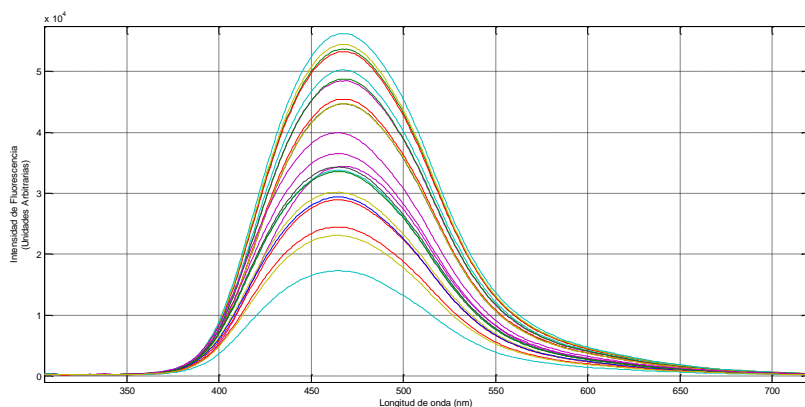


Figura 5. 23 Decaimiento de la IF por calentamiento de la muestra Cumarina 460, 50  $\mu\text{M}$ .

### 5.10 Decaimiento de IF por aplicación de temperatura en solución $\beta\text{-NADH}$ , 5 $\mu\text{M}$ .

Decaimiento de la IF de la solución  $\beta\text{-NADH}$  5 $\mu\text{M}$ , al pasar de 26 a 37 grados en un tiempo de 8 minutos, 15 espectros por minuto, la señal decae un 85 %, utilizando un filtro de densidad neutral del 70% (Figura 5. 24 ).

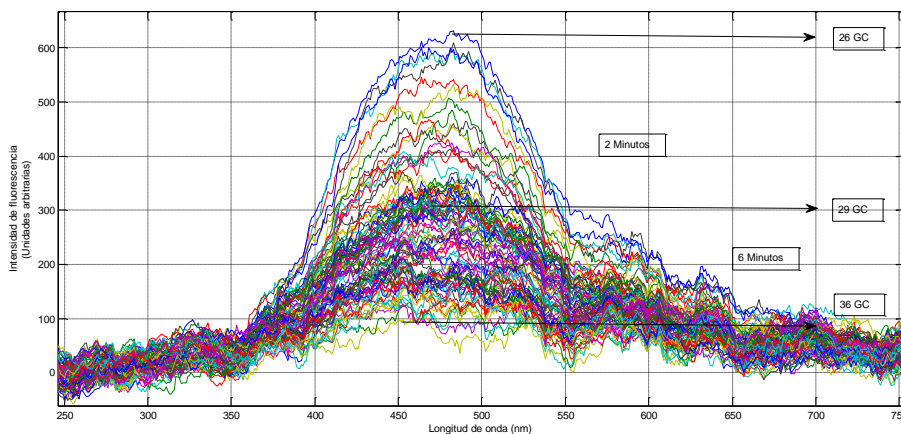


Figura 5. 24 Decaimiento de la IF por calentamiento de la muestra Cumarina 460, 50  $\mu\text{M}$

### 5.11 Decaimiento de IF por aplicación de temperatura en solución NADH de CMNSPR 5 $\mu\text{M}$ .

Espectros promedios del decaimiento de la IF de la solución NADH en CMNSPR, 5 $\mu\text{M}$ , al pasar de 26 a 38 grados en un tiempo de 10 minutos, 13 espectros por minuto, la señal decae un 100 %, utilizando un filtro de densidad neutral del 70% (Figura 5. 25).

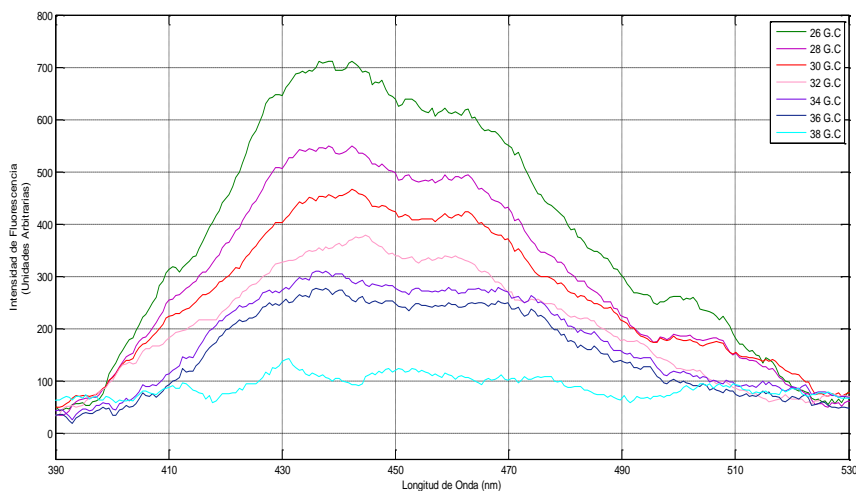


Figura 5. 25 Decaimiento de la IF por calentamiento de la muestra NADH en CMNSPR, solución fosfato 5  $\mu\text{M}$ .

### 5.12 Intensidad fluorescente de Cumarina 460, 50 $\mu\text{M}$ por aplicación de radiación láser IR.

Espectros de IF de Cumarina 460, 50 $\mu\text{M}$ , por aplicación de radiación láser IR (Figura 5. 26), un espectro por minuto, se describen los espectros a tiempo “T(X)”.

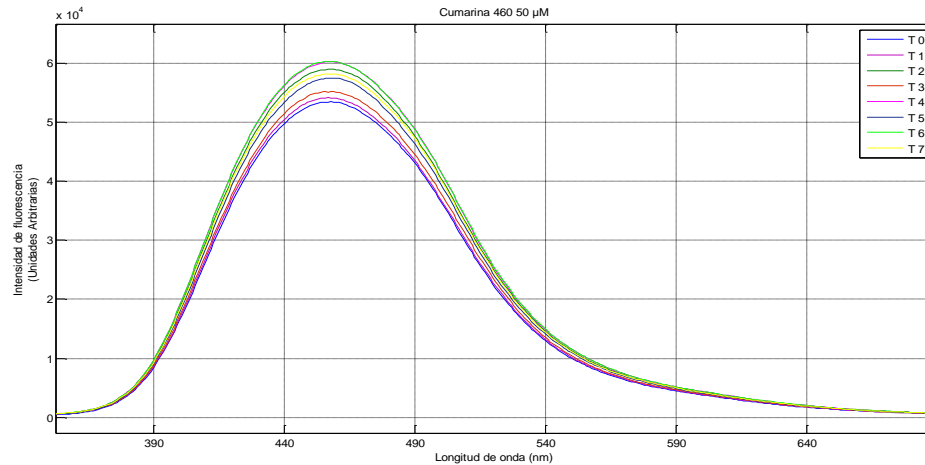


Figura 5. 26 Cumarina 460 50 µM, con aplicación de radiación láser IR, un espectro por minuto.

### 5.13 Estabilidad del láser Nd-Yag

El manual del láser Nd-Yag pide se prenda el equipo láser 15 minutos antes de su utilización, ya que este sistema cuenta con un sistema de enfriamiento, de no tomarlo en cuenta, encontraremos un decaimiento de la señal como la que se encuentra señalada en la (Figura 5. 27) marcada como precalentamiento, además de requerir ajustes previos de la potencia entregada del láser, de acuerdo a especificaciones del manual, la zona roja indica variaciones que podrían afectar nuestras mediciones, si no se corrigen. Las pruebas de fluorescencia se realizaron sobre una solución de Cumarina 460, 50 µM

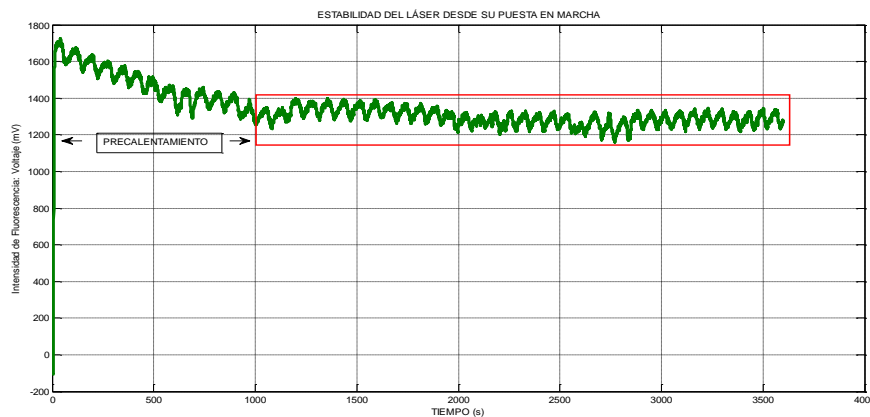


Figura 5. 27 Variaciones que pudiesen presentarse en el láser Nd-Yag, 1 hora, medida por la fluorescencia de Cumarina 460 µM.

Después de 40 minutos de precalentamiento y calibrado el láser se obtiene una señal de fluorescencia sobre Cumarina 460 50  $\mu\text{M}$ , como la mostrada en la (Figura 5. 28).

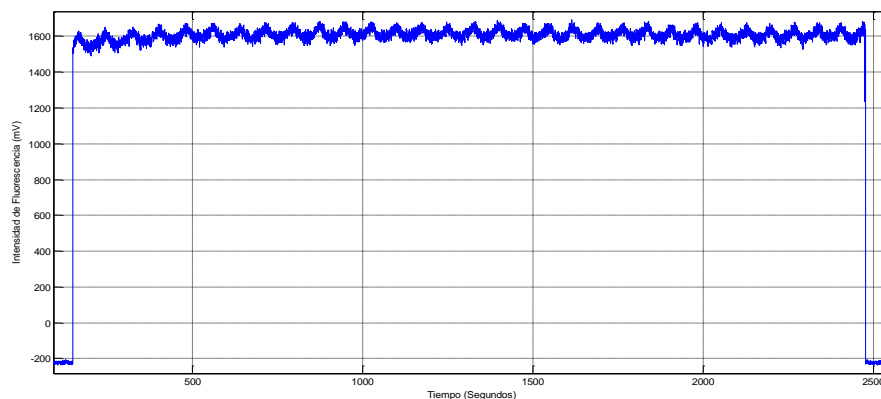


Figura 5. 28 Estabilidad en láser Nd-Yag, 40 minutos, medida por la fluorescencia de Cumarina 460  $\mu\text{M}$

## 5.14 Tablas comparativas del MFC y MFI

Se presentan 2 tablas, resumiendo a continuación, las principales diferencias y similitudes de los 2 modos de fluorescencia empleados, continua e intermitente de NADH en CMNSPR (

Tabla 5. 4) y  $\beta$ -NADH (Tabla 5. 5).

NADH EN CMNSPR	MODO CONTINUO		MODO INTERMITENTE	
	STLBI	CTLBI	STLBI	CTLBI
PICO QUE PREVALECE	440 nm	460 nm	440 nm	440 nm
AJUSTE LOGARITMICO 440 nm	0.8-0.88	0.3-0.9	NA	NA
AJUSTE LOGARITMICO 460 nm	0.77-0.87	0.004-0.9	NA	NA
DECAIMIENTO 460 nm	27%	15%	19%	17.10%
DECAIMIENTO 440 nm	31.80%	25%	20%	18.30%
RECUPERACION MINUTO:15-30	NA	440 nm =13%, 460 nm= 8%	NA	NA
VARIACIONES 460 nm	11-15%	14-34%	5.6-2.5%	6-13%
VARIACIONES 440 nm	14-17%	15-38 %	7.7-3.8%	4-14.5%

Tabla 5. 4 Resumen de diferencia entre MFC y MFI de NADH en CMNSPR





B-NADH	MODO CONTINUO		MODO INTERMITENTE	
	STLBI	CTLBI	STLBI	CTLBI
DECAIMIENTO 460 nm	47%	61.2%	19.30%	19%
PICO QUE PREVALECE	460 nm	460 nm	460 nm	460 nm

Tabla 5. 5 Resumen de diferencia entre MFC y MFI de sln.  $\beta$ -NADH

## 6 Analisis de resultados

### 6.1 Efectos térmicos en la intensidad de fluorescencia en soluciones NADH de CMNSPR, Cumarina 460 y $\beta$ -NADH.

Durante la aplicación de radiación láser IR en CMNSPR en modos MFC y MFI no se detectaron cambios de temperatura con termómetros de resolución  $0.1^{\circ}\text{C}$ , por lo que diremos que el láser terapéutico hace honor al nombre de láser frío [1], y por lo mismo descartamos un efecto térmico similar a una termoterapia caliente, donde el objetivo es incrementar la temperatura por arriba de  $37^{\circ}\text{C}$ . Realizando pruebas de aumentos de temperatura sobre Cumarina 460,  $\beta$ -NADH, y NADH en CMNSPR, se encuentra que la IF disminuye conforme se aumenta la temperatura, esta disminución de intensidad se debe más a procesos físico-químicos que a biológicos [116], el proceso es reversible, si enfriamos la muestra aumenta la IF (**Figura 5. 23, Figura 5. 24, Figura 5. 25**). El objetivo de calentar nuestras soluciones era el de alcanzar condiciones térmicas similares a la temperatura corporal del ser humano de  $37^{\circ}\text{C}$ , sin embargo la pérdida de IF fue de 85% cuando se realizó sobre  $\beta$ -NADH (**Figura 5. 24**), 69.4% sobre Cumarina 460 (**Figura 5. 23**) y de 100% sobre CMNSPR (**Figura 5. 25**), lo que dificulta el análisis. Cuando se realizó la prueba de estabilidad del láser Nd-Yag con Cumarina 460, no se encontró disminución en la IF (**Figura 5. 28**), no así para las muestras de  $\beta$ -NADH (**Figura 5. 9**) y NADH de CMNSPR sin aplicación de TLBI (**Figura 5. 12**), las cuales decaen logarítmicamente teniendo un límite en el decaimiento, siendo el máximo un 32%. Durante las pruebas de temperatura de 26 a  $37^{\circ}\text{C}$  no existieron corrimientos de los espectros, permaneciendo los picos máximos de fluorescencia en 460 nm para las soluciones de Cumarina 460 (**Figura 5. 23**) y  $\beta$ -NADH (**Figura 5. 24**), la solución de NADH en CMNSPR (**Figura 5. 25**) presenta 2 picos en 440 y 460 nm, siendo el mayor en 440 nm.

### 6.2 Variaciones en la Intensidad de fluorescencia en MFC.

Variaciones en la IF fueron encontradas en el promedio de espectros de 10 casos, 5 para cada condición con y sin aplicación de radiación láser IR (**Figura 5. 14**), cuando se analizaron en longitud de onda de 460 nm, siendo estas variaciones mayores cuando se realiza la aplicación de radiación láser IR sobre las CMNSPR estas variaciones van en aumento a medida que transcurre el tiempo desde 14 hasta 34 %, mientras que sin la aplicación de radiación láser IR menores variaciones de IF fueron encontradas, las cuales van de 11 a 15% (**Figura 5. 21**). Se realizó el análisis también para longitud de onda de



440 nm (Figura 5. 13) teniendo el mismo comportamiento, las variaciones con aplicación de radiación láser IR van de 15 a 38% y sin radiación láser IR van de 14 a 17% (Tabla 5. 4).

### 6.3 Variaciones en MFI

Cuando se realiza el análisis de las variaciones estadísticas en la IF, en el promedio de espectros de 10 casos, 5 para cada condición con y sin radiación láser IR (Figura 5. 16), a 460 nm en el modo intermitente de fluorescencia (MFI) en CMNSPR se encontró que estas también son crecientes en el tiempo (Figura 5. 21), con aplicación de radiación láser IR, las cuales van de 6 a 13%, siendo estas variaciones menores que las registradas con el modo de fluorescencia continua. Se realizó el análisis también para longitud de onda de 440 nm (Figura 5. 15) teniendo el mismo comportamiento, las variaciones con radiación láser IR van de 15 a 38% (Tabla 5. 4). Una diferencia mayor con respecto al modo de fluorescencia continuo donde la variación de intensidad es creciente, se encuentra cuando no se aplica radiación láser IR, en este caso las variaciones son decrecientes a medida que pasa el tiempo, las cuales van de 5.6 a 2.5, el mismo comportamiento se presenta en longitud de onda de 440 nm, sin radiación láser IR la cual va de 7.7 a 3.8 % (Figura 5. 15, Figura 5. 16, Figura 5. 21, Tabla 5. 4). Se puede decir que la aplicación de la radiación láser IR genero mayores variaciones en la IF de los espectros promedio, con respecto a los grupos donde no se aplicó radiación láser IR, pudiendo incluso tener una mayor estabilidad la señal en MFI sin radiación láser IR, donde las variaciones disminuyen a medida que pasa el tiempo.

### 6.4 Ajuste logarítmico de la IF

Al ver la señal continua de fluorescencia de  $\beta$ -NADH en longitud de onda 460 nm, se encontró que se ajustaba a una ecuación logarítmica, tanto, con y sin aplicación de radiación láser IR:  $R^2=0.9568$  y  $R^2=0.92698$  respectivamente ver (Figura 5. 9). La IF de CMNSPR en longitud de onda de 460 nm y a las cuales no se les aplico la radiación láser IR se ajustan también al modelo logarítmico (Tabla 5. 1) Teniendo valores de  $R^2$  entre 0.77 y 0.87 en los 5 casos analizados. Viendo los valores de  $R^2$  para las CMNSPR con aplicación de radiación láser IR, se ve que las curvas de IF en la mayoría no presentan ajuste logarítmico, obteniendo valores de  $R^2$ : 0, 0.18, 0.52, 0.55 y 0.92, con lo cual solo un caso se ajustó a una ecuación logarítmica.

El análisis se realiza también sobre la longitud de 440 nm, teniendo el mismo comportamiento, los valores de  $R^2$  para las curvas de IF de CMNSPR sin aplicación de



TLBI van de 0.8 a 0.88 y con aplicación de radiación láser IR (0.65, 0.32, 0.5, 0.5, 0.93). Se puede decir que la IF 440 nm, 460 nm, en un análisis continuo para la solución de  $\beta$ -NADH (con y sin radiación láser IR) y para CMNSPR sin radiación láser IR se ajustan a una ecuación logarítmica, mientras que CMNSPR con radiación láser IR no se ajustan en la mayoría de los casos a la ecuación logarítmica.

## 6.5 Decaimiento de la IF.

En general la IF decae en menor o mayor grado dependiendo del modo de fluorescencia continuo o intermitente, con y sin aplicación de radiación láser IR. Los mayores decaimientos se encontraron en la solución  $\beta$ -NADH en modo de fluorescencia continua, medida en 460 nm la cual decae 47% sin aplicación de radiación láser IR, mientras que con aplicación de radiación láser IR decae 61.2%. Menor decaimiento se encuentra cuando se utiliza el modo intermitente 19 % para ambos casos con y sin radiación láser IR. Lo anterior sucede con las CMNSPR cuyos decaimientos son 27 y 15 % en modo de fluorescencia continuo, 19 y 17% modo de fluorescencia intermitente sin y con radiación láser IR respectivamente, teniendo mayor decaimiento cuando no se aplica radiación láser IR. Todo esto en longitud de onda 460 nm, para 440 nm se encuentran diferentes valores pero siguiendo el mismo comportamiento (**Tabla 5. 4, Tabla 5. 5**).

## 6.6 Recuperación de la IF.

Solo en modo continuo de fluorescencia con aplicación de radiación láser IR sobre CMNSPR se encontró una recuperación de la IF (**Tabla 5. 4**) en menor o mayor grado en 4 de 5 casos, promediados los casos indican que a partir del minuto 15 al 30 durante la aplicación de radiación láser IR, hubo una recuperación del 13 y 8 % para longitudes de onda 440 y 460 nm, no ocurriendo esto en el modo intermitente (**Figura 5. 13, Figura 5. 14, Figura 5. 17**).



## 6.7 Prueba t de student.

Dado que cuando se compararon las medias estadísticas de IF en CMNSPR con y sin aplicación de radiación láser IR estas eran muy similares, se decidió realizar una prueba t para ver si había una diferencia significativa, la prueba de hipótesis nula se rechazó para el supuesto de medias estadísticas iguales con desviaciones estándar diferentes. Por lo que podremos afirmar que el comportamiento de la IF con y sin radiación láser IR no es igual (**Tabla 5. 2, Tabla 5. 3**).

## 6.8 Picos maximos de intensidad de fluorescencia.

Durante los experimentos se realizaron pruebas de Cumarina 460 y solución  $\beta$ -NADH, bajo la aplicación de temperatura y radiación láser IR, no presentándose cambio en el pico máximo de fluorescencia el cual permaneció en 460 nm, sin embargo durante las pruebas en CMNSPR se encontraron 2 picos máximos 440 nm y 460 nm (**Figura 5. 4, Figura 5. 5**), para el caso específico de MFC se encontró en el promedio de los casos que sin radiación láser IR el pico máximo de fluorescencia se encontró en 440 nm, pero cuando se aplicó radiación láser IR este cambio a 460 nm (**Figura 5. 4**).

## 6.9 Discusión de resultados.

A continuación se tratara de dar una explicación a los resultados y diferencias encontradas.

### 6.9.1 Picos de fluorescencia en 440 y 460 nm

NADH está reportado para fluorescer a 460 nm, sin embargo, cuando se une a proteína, la longitud de onda de emisión máxima NADH se desplaza de 460 a 440 nm. NADH es asociado para unirse con enzimas que participan en el metabolismo aeróbico, en la mitocondria donde la energía se produce a través de la cadena de transporte de electrones, existiendo nueve sitios de unión de NADH. Las enzimas para la unión NADH son: 1) gliceraldehído - 3-fosfato deshidrogenasa; 2) lactato deshidrogenasa; 3) complejo piruvato deshidrogenasa; 4) isocitrato deshidrogenasa; 5) complejo  $\alpha$ -cetoglutarato

deshidrogenasa; 6) malato deshidrogenasa; 7) el complejo I de la cadena de transporte de electrones; 8) malato deshidrogenasa citosólica; y 9) citosólica de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa [255]. De acuerdo a nuestros resultados, el NADH intracelular que prevalece de manera natural es el unido a proteínas, sin embargo cuando se irradian las células con IR en MFC el NADH que prevalece es el libre (**Figura 5. 4 y Figura 5. 5**). En el MFI el pico de fluorescencia permanece en 440 nm con y sin irradiación láser IR, por lo que la liberación de NADH unido a proteínas se da por la estimulación en conjunto de LUV en MFC y radiación láser IR.

### 6.9.2 Decaimiento logarítmico:

La luz ultravioleta en longitud de onda 355 nm sobre solución  $\beta$ -NADH y NADH en CMNSPR provoca fluorescencia [163] y nuestros resultados para  $\beta$ -NADH y NADH en CMNSPR sin irradiación láser IR, en MFC muestran registros continuos de IF en el tiempo indicando que tienen un decaimiento logarítmico (**Figura 5. 9, Figura 5. 12**). Cuando se disminuye la cantidad de LUV en MFI, aplicada sobre las muestras de NADH en CMNSPR es menor el decaimiento de la IF (**Tabla 5. 4**). La luz ultravioleta está relacionada con la generación de especies reactivas de oxígeno [87] [102] [23] [24] [25], dando cuenta además de la activación de mecanismos de defensa similares a los desarrollados en ataque de patógenos [102] [23] [24] [25]. Las células tienen sustancias con color, tales como las flavinas, las porfirinas. Estos compuestos son excitados generalmente con la luz azul (430–490 nm) y el componente A de la luz ultravioleta (UVA 320–400 nm), además de NADH [153]. Las ERO inician cuando en presencia de una sustancia reductora (que cede fácilmente electrones) forma el ion superóxido ( $O_2^-$ ) a partir de  $O_2$  y LUV (**Figura 6. 1**) el cual es altamente reactivo [102]. En el metabolismo, el  $NAD^+$  (no fluorescente) está implicado en reacciones de oxidación y reducción, llevando los electrones de una a otra. Debido a esto, la coenzima se encuentra en dos formas: como un agente oxidante, que acepta electrones de otras moléculas. Actuando de ese modo da como resultado la segunda forma de la coenzima, el NADH (fluorescente), la especie reducida del  $NAD^+$ , y puede ser usado como agente reductor para donar electrones. El NADH mitocondrial es oxidado a su vez por la cadena de transporte de electrones, que bombea protones a lo largo de la membrana y genera ATP a través de fosforilación oxidativa [255]. Se propone en la (**Figura 6. 1**) que la LUV interactúa con el NADH que al ser estimulado con LUV acelera la donación de electrones para la formación aumentada de ERO. De nuestros resultados, a mayor estimulación con LUV mayor decaimiento de la IF del NADH en CMNSPR, es decir el NADH fluorescente pasaría a su estado oxidado  $NAD^+$  no fluorescente, lo cual explicaría el decaimiento de tipo logarítmico de nuestros registros (**Figura 5. 12**).

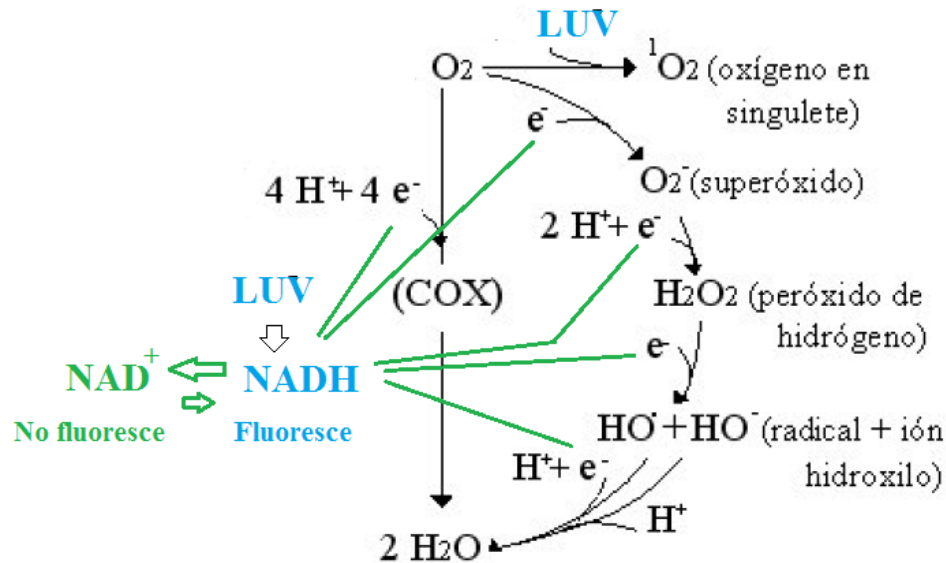


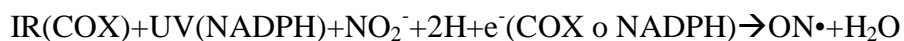
Figura 6. 1 Relación de la donación de electrones del NADH a la cadena de transporte de electrones y a la formación acelerada de ERO por la exposición a UV; modificada de [102].

### 6.9.3 Mayor variación de IF de NADH en CMNSPR por radiación láser IR

Pertenecientes a las especies reactivas de oxígeno (ERO) encontramos otras moléculas denominadas especies reactivas de nitrógeno (ERN) siendo de particular interés biológico para la explicación de nuestros resultados el óxido nítrico ( $NO^\bullet$ ). Las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno son el producto de múltiples procesos fisiológicos, como el metabolismo en la respiración celular, patológicos como la inflamación y la isquemia, e incluso, producto de la relación con elementos ambientales, como la radiación por la luz UV, la polución y el humo del cigarrillo [93] [94] [95] [96] [97] [98]. El óxido nítrico ( $ON^\bullet$ ) sintetizado de manera constitutiva en una célula, funciona como regulador fisiológico del tono vascular, de la inhibición plaquetaria, de la interacción neurona-neurona, esta relacionado con el sistema inmune, es efector de la citotoxicidad mediada por macrófagos, regula el consumo de oxígeno en la cadena de transporte de electrones en la mitocondria por su interacción con COX (permitiendo que el oxígeno difunda a mayores profundidades). La liberación inducida de grandes cantidades de  $ON^\bullet$  por períodos largos transforma al  $ON^\bullet$  de un mediador fisiológico en una molécula citostática (inhiben el crecimiento desordenado de células, alteran la división celular y destruyen las células que



se multiplican rápidamente) y citotóxica (tóxico a células actuando sobre células de proliferación rápida como piel, mucosa, médula ósea, intestino y otros). La presencia de  $\text{ON}\bullet$  sintetasa en la mitocondria sugiere que la producción fisiológica de  $\text{ON}\bullet$  en pequeñas cantidades estaría relacionada con la regulación de la respiración celular a través de la inhibición de la citocromo oxidasa. La exposición a  $\text{NO}\bullet$  por períodos cortos de tiempo y a concentraciones fisiológicas (50-100 nM), inhibe rápidamente a COX mitocondrial de una manera reversible y competitiva con el oxígeno en mitocondrias de corazón, terminales nerviosas del cerebro, cultivos celulares y COX aislado [91]. La exposición celular a  $\text{ON}\bullet$  por períodos prolongados da como resultado una inhibición irreversible de la respiración celular. De esta manera es que la inhibición del complejo IV de la CTE es un proceso fisiológico normal, dependiente de las concentraciones de  $\text{ON}\bullet$ . Si se expone las células a  $\text{ON}\bullet$  por períodos largos, se produce la inhibición irreversible de la respiración celular en los sitios de unión de los complejos I y IV [256] [257] [91]. Incrementos de  $\text{ON}\bullet$  han sido reportados por la aplicación de radiación IR de baja intensidad [258] [259] [260] [261]. Varios hechos atribuibles a la radiación láser IR, se corresponden con algo denominado dosis bifásica, donde la aplicación a ciertos niveles de energía son de ayuda, excediendo dichos límites, pueden derivar en un efecto no deseado [198] [199] [200] [1], lo cual se corresponde con los eventos fisiológicos regulados y dependientes de la concentración de  $\text{ON}\bullet$ . Nuestros resultados indican mayor variabilidad de la IF de NADH en CMNSPR cuando estas son irradiadas con láser IR, con respecto a las células no irradiadas, esto podría estar relacionado con una alteración en el complejo IV (COX) de la CTE, la irradiación láser IR primeramente liberaría el  $\text{ON}\bullet$  de COX acelerando la transportación de electrones y por tanto la producción de ATP, así mismo, una posible mayor generación de óxido nítrico por irradiación láser UV e IR, esto causaría un flujo irregular de electrones, un menor decaimiento de la IF, e inclusive incrementos en la IF cuando se prolonga la radiación láser, ya que el incremento prolongado de  $\text{ON}\bullet$  provocaría una inhibición anormal de la CTE causando que menos moléculas de NADH (fluorescente) donen sus electrones, por lo que la señal de IF decaerá menos y presentará mayores variaciones (**Figura 5. 13 a Figura 5. 16**), que en CMNSPR donde no se aplicó radiación láser IR. En un estado avanzado la acumulación de NADH y  $\text{NO}\bullet$  en la mitocondria provocará un aumento de la IF (Figura 6. 2). Una forma en como la radiación UV incrementa los niveles de  $\text{ON}\bullet$  es como sigue: El citocromo C o el NADPH pueden actuar con una enzima nitrito reductasa [2] [262].



Dosis bajas de radiación provocarían  $\text{ON}\bullet$  en bajas concentraciones con lo cual se acelerarían los procesos fisiológicos antes descritos, cuando se incrementa la dosis de radiación IR aumentaría la concentración de  $\text{ON}\bullet$  y con ello se derivaría un daño celular al



inhibir de manera prologada la cadena respiratoria. Al detener el paso de electrones por la cadena respiratoria, menos NADH se transformaría en  $\text{NAD}^+$ , con lo cual tendríamos una recuperación de la IF, lo cual sucede en nuestros resultados en MFC en intervalos de tiempo entre 15 y 20 minutos equivalentes a una dosis de radiación IR continua en CMNSPR de 81 y 108 Joules por  $\text{cm}^2$ , (**Figura 5. 10, Figura 5. 13, Figura 5. 14**). Por décadas, la interrupción del transporte de electrones en la cadena respiratoria, ha sido reconocida como una característica temprana de la muerte celular. Estudios utilizan los cambios dinámicos de la molécula NADH como indicador de apoptosis y necrosis [111] [111] [112] [113]. Datos reportados de umbral de dosis de la apoptosis a la necrosis se encuentran entre 24-28  $\text{kJ/m}^2$  (2.4-2.8  $\text{J/cm}^2$ ), correspondiente a los 19 y 23 minutos de exposición ambiental a LUV-A y LUV-B [26]. En nuestro experimento utilizamos una dosis máxima de exposición de 90.24 y 3.384  $\mu\text{J/cm}^2$  de LUV (350 nm) en MFC y MFI respectivamente, para evitar el menor daño a las células.

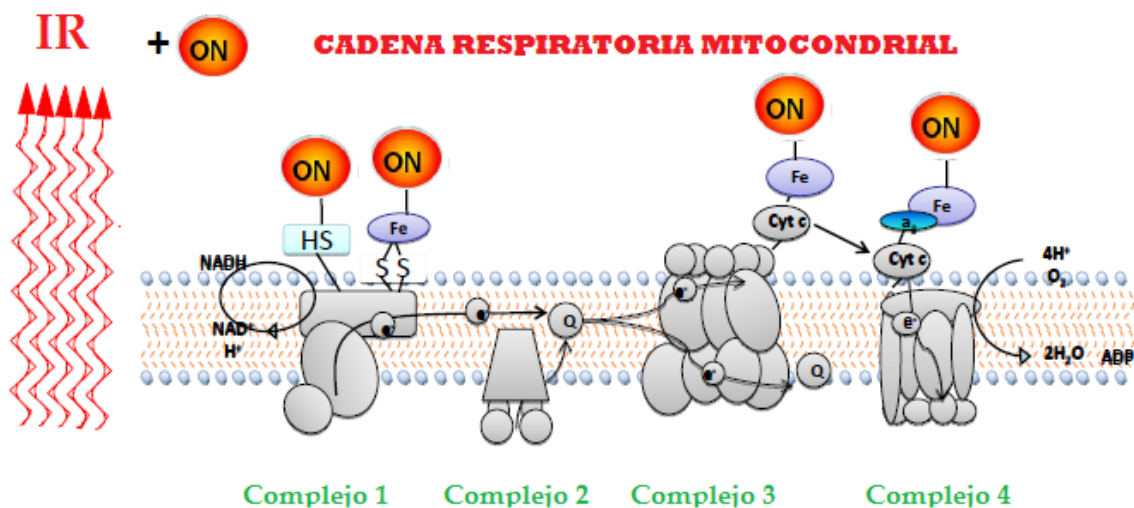


Figura 6. 2 Incremento de óxido nítrico e inhibición de la cadena respiratoria por alta concentración.

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) pueden ser producidas por diversas fuentes. Se ha propuesto que la enzima NADPH oxidasa (NOX) podría ser determinante en la generación de ERO que participan en múltiples procesos fisiológicos y patológicos. Existen 7 homólogos de la NOX, cuya función primaria es generar ERO. La distribución de los miembros de la familia de la NOX en los tejidos y células del organismo es muy variada. La NOX participa en diversos procesos fisiológicos como la defensa del huésped y



la diferenciación, proliferación y muerte celular a través de distintos mecanismos que incluyen el procesamiento postraduccional de proteínas, la señalización intracelular y la regulación de la expresión génica, entre otros [263]. La alteración en la actividad o expresión de la NADPH puede conducir a una serie de procesos patológicos. Además de esto el  $\text{NADP}^+$  se utiliza en las reacciones anabólicas, como la síntesis de lípidos y ácidos nucleicos, que requieren NADPH como agente reductor.  $\text{NADP}^+$  está en la generación de especies reactivas de oxígeno [82], isoformas inducible de la óxido nítrico sintetasa (ONSi) presentes en la mayoría de las células de mamíferos, principalmente en macrófagos, en hepatocitos y células de músculo liso asociadas a mecanismos de defensa del huésped tanto inflamatorios, como inmunológicos requieren de NADPH como cofactores para su actividad [264]. Se propone que mientras la cadena respiratoria se encuentra bloqueada por la generación de  $\text{ON}\cdot$ , el NADH cede sus electrones a  $\text{NADP}^+$  formando más NADPH el cual es el sustrato de procesos anabólicos y generación de ERO con sus respectivos efectos fisiológicos en bajas concentraciones y procesos patológicos en altas concentraciones.

Incrementos pronunciados de ATP son reportados después de la irradiación láser (632 nm,  $10\text{mW}/\text{cm}^2$ , 10 segundos) en cultivos celulares, estos incrementos medidos por técnicas bioluminiscentes de luciferasa son reportados entre los 15 y 20 minutos posteriores a la radiación, antes de los 15 y después de los 20 minutos, estos niveles de ATP permanecen y regresan al nivel de control respectivamente [231]. Se puede ver que el incremento de ATP no es inmediato, si se inhibe el paso de electrones por  $\text{ON}\cdot$  durante la irradiación láser en bajas dosis, como si se cerrara el flujo de agua con una llave, cuando la llave se abra en un inicio tendremos que el agua saldría bruscamente, hasta estabilizarse con un flujo constante, pensándolo de esta manera la inestabilidad del flujo de electrones en la cadena respiratoria se vería reflejado entre los 15 y 20 minutos.

#### 6.9.4 Decaimiento de $\beta$ -NADH

Los resultados obtenidos en la IF de NADH en CMNSPR, indican un decaimiento mayor (en un 14%) de la IF en la solución de  $\beta$ -NADH cuando este fue irradiado con IR (790 nm). La mayor caída de IF en el tiempo de  $\beta$ -NADH con irradiación de IR pudiera ser simplemente explicada por la diferencia de tiempo en que se tomaron los espectros con y sin IR, pero de repetir el experimento cuidando el factor tiempo y obtener los mismos resultados, propondríamos la siguiente explicación: La absorción simultánea de dos fotones, esto fue predicho teóricamente por Maria Göppert-Mayer en 1931, y su verificación experimental fue posible hasta el descubrimiento del láser. La absorción de dos fotones es un proceso de absorción no lineal por el que dos fotones de energías  $E_1$  y  $E_2$  pueden ser absorbidos simultáneamente por un átomo o molécula y donde un electrón es promovido desde un nivel de energía inferior a un nivel de energía más alto. La energía

total de la transición es igual a la suma de las dos energías de los fotones (**Figura 6. 3**), muchas veces la transición se produce sin la presencia de un estado intermedio, debido a un estado "virtual" creado por la interacción de los fotones con la molécula, ya que la absorción del estado excitado puede ocurrir sólo después de que un electrón ya ha sido excitado al estado excitado inferior "virtual" [265].

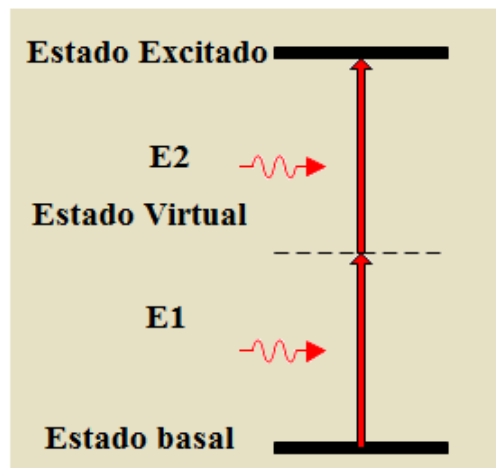


Figura 6. 3 La absorción de dos fotones puede excitar un electrón desde el estado fundamental a un estado excitado.

El proceso no lineal de absorción de dos fotones es de gran interés en diversas áreas multidisciplinarias, en particular en el campo de: Fluorescencia multifotónica, formación de imágenes, almacenamiento de datos ópticos y de conmutación, telecomunicaciones, colorantes, imágenes 3-D y microfabricación. Generalmente el proceso denominado absorción simultánea de dos fotones implica la interacción concertada de dos fotones en el Infrarrojo, que al combinar sus energías producen una excitación electrónica análoga a la convencionalmente causada por un solo fotón de una longitud de onda más corta ultravioleta (**Figura 6. 4**), generando en la relajación del estado excitado en ambos casos una emisión de fluorescencia [266].

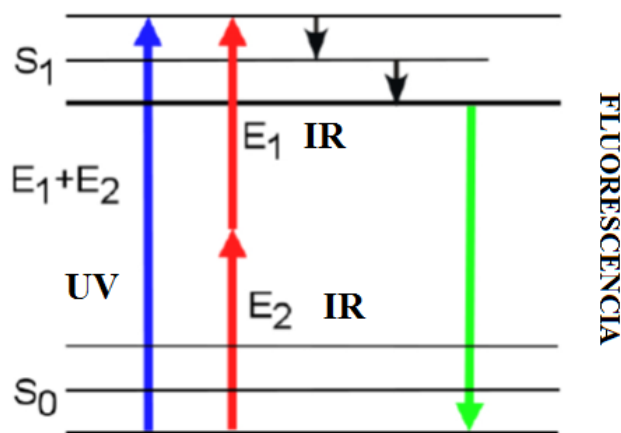


Figura 6. 4 Excitación electrónica de dos fotones en un sistema fluorescente. (a) Diagrama de energía para excitaciones electrónicas de uno (azul= UV) y dos fotones (rojo=IR) [266].

La fluorescencia inducida por el proceso de la absorción de 2 fotones es una herramienta que se utiliza en microscopía llamada multifotón. Su penetración óptica relativamente profunda ha sido recientemente explotada para las investigaciones a nivel subcelular. Su accesibilidad espectral mejorada permite obtener imágenes libres de aberración de moléculas fluorescentes que absorben la energía en los regímenes de profundidad-UV con imágenes simultáneas de especies que tienen muy diversos espectros de emisión [267].

Partiendo previamente de un estado excitado de la molécula  $\beta$ -NADH provocado por la estimulación ultravioleta a 350 nm, aunado a la absorción de un segundo fotón en el infrarrojo 790 nm, la molécula se encuentra en un estado superior virtual o  $S_2$ , esta se relajara rápidamente por conversión interna (relajación vibracional) a un estado excitado más bajo  $S_1$  (figura 2). Desde este estado, el sistema puede volver al estado basal  $S_0$  por la emisión de fluorescencia o por la descomposición no radiativa [Skoog/leary analinst]. También se puede dar la transformación fotoquímica de la molécula (**Figura 6. 5**). Si una molécula absorbe múltiples fotones generalmente producto de su interacción con radiación láser puede ocurrir que la molécula se disocie o se ionice. Si la absorción produce excitaciones entre los estados vibracionales del estado fundamental, el proceso es llamado disociación multifotónica. Sin embargo, si el láser es capaz de producir excitación entre estados electrónicos, es posible obtener ionización /disociación de la molécula [268], tanto por descomposición no radiativa (Conversión interna y externa) o por transformación fotoquímica de la molécula, se tendría una pérdida en la intensidad de fluorescencia lo cual se corresponde con nuestros resultados.

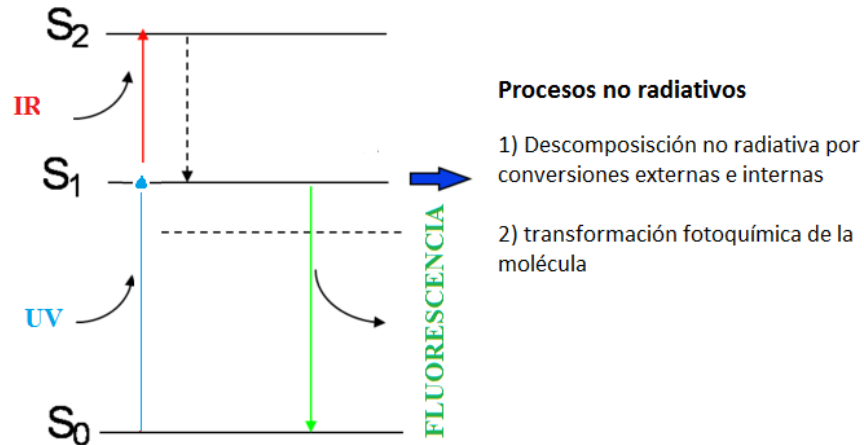


Figura 6. 5 Emisión de fluorescencia y procesos de relajación no radiativos por la excitación de 2 fotones UV (1) e IR (2).

Como referencia y para futuros trabajos de fluorescencia, se hace mención de un estudio llamado “Two-Photon Fluorescence Spectroscopy and Microscopy of NAD(P)H and Flavoprotein” que involucra microscopía de excitación de fluorescencia multifotón, encuentra que imágenes de NADH son obtenidas con longitudes de onda de excitación alrededor de 750 nm (**Figura 6. 6**), y la fluorescencia se registra entre 410 y 490 nm, esto se realiza con la finalidad de provocar menor daño celular por la emisión inducida de fluorescencia con LUV [269].

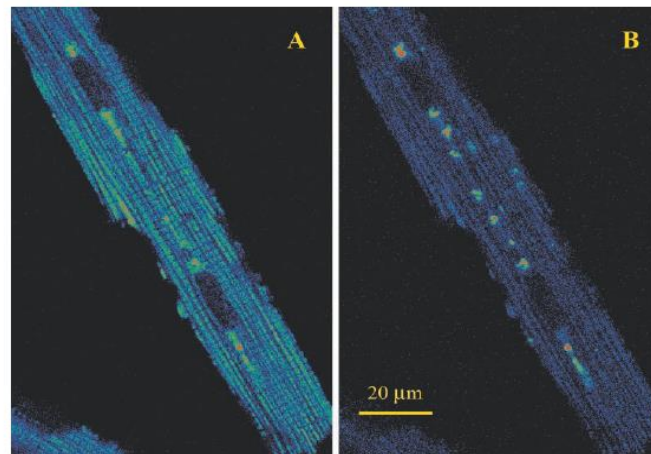


Figura 6. 6 NAD(P)H en cardio miocitos aislados imagen con luz de excitación (IR) 750 nm, detección de imagen A (410-490 nm), imagen B (510-650 nm) [269].

## 7 Conclusiones

- 1) La radiación IR 790 nm 90 mW de TLBI sobre la solución de CMNSPR no genero aumentos de temperatura detectables con 2 diferentes termómetros digitales de resolución 0.1 °C, por lo que se descarta que un efecto térmico a nivel celular se produzca, haciendo honor al nombre de láser frío [1].
- 2) Cambios en la IF de NADH en CMNSPR fueron encontrados cuando se aplica radiación láser IR, con respecto a la no aplicación:
  - a) Variaciones crecientes de la IF de NADH en CMNSPR con irradiación láser IR, en MFC y MFI, fueron calculadas cada 5 minutos de registros continuos e intermitentes en el tiempo y fueron encontradas diferentes a las calculadas sin irradiación láser IR, las cuales son menores e inclusive son decrecientes cuando no se aplica radiación IR (**Figura 5. 13, Figura 5. 14, Figura 5. 15, Figura 5. 16**).
  - b) La IF en MFC registrada en el tiempo en 440 y 460 nm de NADH en CMNSPR sin aplicación de láser IR se ajusta a una ecuación logarítmica, lo que no sucede cuando la solución de CMNSPR son irradiadas con láser IR (**Tabla 5. 1**).
  - c) Menor pérdida de IF, e inclusive recuperación de la señal de IF de NADH, sucede cuando CMNSPR son radiadas con láser IR (**Figura 5. 10, Tabla 5. 4**).
  - d) Una prueba estadística t de student nos indica que la IF de NADH en CMNSPR con irradiación láser IR es diferente cuando no se irradia con láser IR, MFC y MFI (**Tabla 5. 2, Tabla 5. 3**).

Todo esto indicativo de que una alteración en el metabolismo energético celular reflejado por la IF de la molécula NADH en CMNSPR es producida, cuando se aplica radiación láser IR de baja intensidad, afirmando que un efecto en el metabolismo energético celular es producido y que son de tipo fisicoquímicos.

- 3) Incrementos de IF en MFC Fueron encontrados, en un intervalo de tiempo entre 15 y 20 minutos equivalentes a una dosis de radiación IR continua en CMNSPR de 81 y 108 Joules (J) (**Tabla 4. 2, Figura 5. 10, Figura 5. 13, Figura 5. 14**), suponemos que en ese rango ya estamos bloqueando de manera prolongada la



CTE, causando un daño, por lo que sugeriríamos dosis mucho menores de 81 J, cuando se irradian células de manera continua.

## 7.1 Perspectivas

- 1) Es probable que los diversos cromóforos celulares sean estimulados a diferentes longitudes de onda, en este trabajo solo se abordó una longitud de onda, central a la ventana óptica de trabajo de los láseres terapéuticos, por lo que es de esperarse diferentes resultados para la estimulación de CMNSPR con otras longitudes de onda dentro de la ventana óptica manejada para estos equipos (600 a 1000 nm). Conociendo para diferentes longitudes de onda el comportamiento de la IF de NADH cuando se irradian CMNSPR con la metodología llevada en este trabajo, se podrían tener más ideas de las dosis aplicadas a diversos padecimientos, se podrían incluso realizar simulaciones de acuerdo a las características ópticas de los tejidos, esto con software de simulación como lo es Comsol.
- 1) Por si sola la TLBI ha demostrado ser útil, pero esta podría ser de más valía si se complementa con otras tecnologías, como herramienta de tratamiento; La aplicación de radiación electromagnética roja e infrarroja a un fármaco o nano partícula fotosensible la hace una herramienta mucho más poderosa y atractiva para ser aplicada a zonas puntuales, dependiente de la dosis, el efecto puede ser reparador (dosis bajas) o si se tratase de un cáncer lo ideal sería con dosis mayores un efecto destructivo.



2) Algunas otras aplicaciones:

- A) Aceleración de proliferación celular en el uso de cultivos celulares y tratamiento de injertos de piel (Concretamente en unidades de banco de piel para pacientes quemados).
- B) Investigación para la sustitución de fármacos por otros menos agresivos y de naturaleza fotosensible.
- C) Mejoría en el control de procesos no invasivos, no de contacto, en el manejo de infecciones
- D) La fluorescencia provocada por la estimulación de 2 fotones en el infrarrojo podría ser de mucha utilidad, si un registro continuo del seguimiento energético metabólico celular es requerido, registrando y analizando espectros de forma similar a lo realizado con este trabajo.





## Bibliografía

- [1] D. A. Boas, C. Pitris, N. Ramanujam and R. R. Alfano, Handbook of Biomedical Optics, CRC Press, November 22, 2011.
- [2] H. Chung, T. Dai, S. Sharma, Y.-Y. Huang, J. Carroll and M. Hamblin, "The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy," *Annals of biomedical engineering*, vol. 40, no. 2, pp. 516-533, 2012.
- [3] A. Hernandez Diaz and A. y. G. M. B. M. Orellana Molina, "La terapia láser de baja potencia en la medicina cubana," *Medicina Cubana*, vol. 24, no. 2, 2008.
- [4] S. Green, R. Buchbinder and S. Hetrick, "Intervenciones fisioterapéuticas para el dolor del hombro," *The Cochrane Library, John Wiley & Sons, Ltd.*, no. 5, 2013.
- [5] C. C. Trullols, T. España and A. L. Berini, "Aplicaciones del láser blando en odontología," *Dips Rocas, Anales de Odontoestomatología*, no. 2, pp. 45-51, 1997.
- [6] N. F. B. d. S. Leal, H. H. A. Carrara, K. F. Vieira and C. H. J. Ferreira, "Tratamientos fisioterapéuticos para el linfedema después de la cirugía de cáncer de seno: una revisión de literatura," *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, vol. 17, no. 5, 2009.
- [7] H. Peters, Z. Sánchez, F. Suarez and S. Vidal, "Uso del láser terapéutico en el control del dolor en ortodoncia," *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, vol. 4, no. 3, 2011.
- [8] M. I. Arredondo, L. A. Vásquez, J. E. Arroyave, V. Molina, Y. Delsy and d. R. J. Herrera, "Láser en dermatología," *Rev Asoc Colomb Dermatol*, vol. 22, no. 2, 2014.
- [9] Q. M. Conde, J. Sandeb and A. M. Toscano, "Terapia por láser de baja potencia: consideraciones óptico-físicas y biológicas determinantes en su aplicación clínica," *Fisioterapia, elsevier*, vol. 5, no. 12, 2011.
- [10] J. C. Cardenas, "Láser en medicina," *Iatreia*, vol. 5, no. 3, 1992.
- [11] H. Robledo, "Principios generales de la luz láser en la cirugía cutánea y su interacción tisular," *Cirugía España*, vol. 69, pp. 486-489, 2001.



- [12] R. Martín, *Electroterapia en fisioterapia*, México: Panamericana, 2004.
- [13] B. JR., "Laser therapy: scientific basis and clinical role. Orthopedics," vol. 16, no. 5, pp. 541-547, 1993.
- [14] S. Bagis, U. Comelekoglu, G. Sahin, B. Buyukakilli, C. Erdogan and A. Kanik, "Electrophysiologic effect of pulsed gallium-arsenide low energy laser irradiation on configuration of compound nerve action potential and nerve excitability," *Lasers in surgery and medicine*, vol. 30, no. 5, pp. 376-380, 2002.
- [15] T. Karu, *Photobiological fundamentals of low-power laser therapy*, IEEE J. Quantum Electron., 2005.
- [16] P. Prasad, *Introduction to biophotonics*, Hoboken: John Wiley a Sons, 2003.
- [17] R. Lubart, M. Eichler and R. Lavi, "Low-Energy Laser Irradiation Promotes Cellular Redox Activity," *Photomedicine and Laser Therapy*, vol. 23, no. 1, 2005.
- [18] E. Passarella, S. Casamassima, D. Molinari, E. Pastore, I. Quagliariello and A. Catalano, "Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser," *FEBS letters*, vol. 165/A, no. 70126, 19 June 1984.
- [19] T. Karu, L. Pyatibrata and G. . Kalendob, "Laser increases ATP level in cells cultivated in vitro," *Journal of Photochemistry and photobiology B: Biology*, vol. 27, no. 3, pp. 219-223, March 1995.
- [20] H. L. Túner J, *Reinnervation after nerve injury: the effects of low laser treatment*. In: *Low level laser therapy- Clinical practice and science background*, Sweden: Prima Books, 1999, pp. 280-302.
- [21] P. Reddy, "Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine.," *Journal of clinical laser medicine & surgery*, vol. 22, no. 2, pp. 141-150, 2004.
- [22] C. Enwemeka, J. Parker, D. Dowdy, E. Harkness, L. Sanford and L. Woodruff, "The efficacy of low-power lasers in tissue repair and pain control: a meta-analysis study.," *Photomedicine and Laser Therapy*, vol. 22, no. 4, pp. 323-329, 2004.
- [23] K. ScharffetterKochanek, M. Wlaschek, P. Brenneisen, M. Schauen, R. Blandschun and J. Wenk, "UV induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging.," *Biological chemistry*, vol. 11, no. 378, pp. 1247-1258, 1997.
- [24] R. B. Sánche and R. P. Talamás, "Importancia de las prostaglandinas en la amibiasis hepática," *Salud pública de México.*, vol. 44, no. 3, pp. 247-257, 2002.



- [25] A. L. Lehninger, D. L. Nelson and M. M. Cox, *Lehninger: principios de bioquímica*, Omega, S.L., 2009.
- [26] L. J. Matta, J. M. Ramos, A. R. Armstrong and H. D'Antoni, "Niveles de luz ultravioleta ambiental asociados con apoptosis y necrosis en fibroblastos humanos," *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, vol. 40, no. 4, pp. 553-560, 2006.
- [27] M. L. Cunningham, J. S. Johnson, G. S. M and M. J. Peak, "photosensitized production of superoxide anion by monochromatic (290–405 nm) ultraviolet irradiation of nadh and nadph coenzymes.," *Photochemistry and photobiology*, vol. 42, 1985.
- [28] J. A. Parrish, R. R. Anderson, T. Harrist, B. Paul and G. F. & Murphy, " Selective thermal effects with pulsed irradiation from lasers: from organ to organell," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 80, no. s6, pp. 75-80, 1983.
- [29] J. R. Basford, "Low-energy laser therapy: Controversies and new research findings.," *Lasers in surgery and medicine*, vol. 9, no. 1, pp. 1-5, 1989.
- [30] I. Waked, A. Attalla and M. Eid, "Low Level Laser Therapy for the treatment of Trigeminal Neuralgia after Oral surgeries: Two Different Applications," *Int J Health Rehabil Sci.*, vol. 4, no. 1, pp. 10-18, 2015.
- [31] A. Cafaro, A. Gambino, R. Broccoletti, M. Garrone and P. G. Arduino, "Placebo versus low level laser therapy in the management of burning mouth syndrome: a randomized controlled single-blind study," *Annali di Stomatologia*, vol. 6, no. 1, p. 24, 2015.
- [32] P. AVCI, "Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. En Seminars in cutaneous medicine and surgery," *NIH Public Access*, vol. 41, 2013.
- [33] S. PASSARELLA, "Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser.," *FEBS letters*, vol. 175, no. 1, pp. 95-99., 1984.
- [34] U. Oron, S. Ilic, L. De Taboada and J. & Streeter, " laser irradiation enhances ATP production in human neuronal cells in culture.," *Photomedicine and laser surgery*, vol. 25, no. 3, pp. 180-182, 2007.
- [35] A. M. Rogatsky and G. Gennady, "Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies," *Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society*, vol. 292, p. C615–C640, 2006.
- [36] J. Rose, C. Martin, T. MacDonald and C. Ellis, "High-Resolution Intravital NADH Fluorescence Microscopy Allows Measurements of Tissue Bioenergetics in Rat Ileal Mucosa,"



- Microcirculation*, vol. 13, no. 1, pp. 41-47, 2005.
- [37] C. Guyton and J. Hall, *Tratado de Fisiología Médica.*, 11 ed., Interamericana., 2006.
- [38] H. Curtis and A. Schnek, *Biología, Médica Panamericana*, 2008.
- [39] R. Paniagua, M. Nistal, P. Sesma, U. M. Álvarez, B. Fraile, R. Anadón and J. F. Sáez, *Citología e histología vegetal y animal*, McGraw-Hill Interamericana de España, 2002.
- [40] W. Ganong, *Fisiología Médica, México: El manual moderno*, 1994.
- [41] P. Delves and Roitt, *Essential Immunology*, 11 ed., John Wiley & Sons vol.20, 2011.
- [42] M. Kanof, P. Smith and H. Zola, "Isolation of Whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood," *Curr. Prot. Immunol.*, vol. 7, no. 1-7, May 2001.
- [43] R. S. Meara, V. Reddy, J. P. Arnoletti, D. Jhala, S. Varadarajulu and N. Jhala, "Hairy cell leukemia: A diagnosis by endoscopic ultrasound guided fine needle aspiration," *BioMed Central Ltd, CytoJournal*, vol. 3, no. 1, 2006.
- [44] J. M. S. Vizcaíno, "Curso de introducción a la inmunología porcina," 2004. [Online]. Available: <http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmuno2/ca011.htm#ademas>. [Accessed 31 08 2016].
- [45] C. M., *Anatomía y Fisiología Humana*, México: Interamericana s.a de c.v, 1981.
- [46] T. Cavalier y Smith, "Eukaryotes with no mitochondria," no. 326, pp. 322-333, 1987.
- [47] C. Pascuzzo Lima, "La Mitocondria: Aspectos estructurales, funcionales y patológicos," *Biología Celular*, 2001.
- [48] G. Attardi and G. Schatz, "Biogenesis of mitochondria," *Annual review of cell biology*, vol. 4, no. 1, pp. 289-333, 1988.
- [49] C. Nelson and Lenhinger, *Principios de Bioquímica*, Quinta edición ed., Editorial Omega.
- [50] Asturnatura, "asturnatura Mitocondria funciones," Asturnatura, 28 03 2016. [Online]. Available: <http://www.asturnatura.com/articulos/organulos-energeticos/mitocondria-funciones.php>. [Accessed 29 03 2016].
- [51] D. E. V. Contreras, "Bioquímica y Biología Molecular en línea," UNAM, 2003. [Online]. Available: <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/indicealfabetico.html>. [Accessed 03 03 2016].



- [52] E. Mendez, "Unidad 2. Metabolismo Celular," TES: The largest network of teachers in the world, 11 12 2015. [Online]. Available: <https://bio-iv-elenamendez.wikispaces.com/Unidad+2.+Metabolismo+Celular>. [Accessed 29 03 2016].
- [53] K. Murray and P. Mayes, *Bioquímica de harper, Manual moderno*, 2005.
- [54] A. P. Martos, *Cadena de transporte de electrones mitocondrial una nueva visión*, Aragón: Colegio oficial de Farmacéuticos de Zaragoza, 2013.
- [55] P. a. M. J. Mitchell, "Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation," vol. 213, no. 137-139, 1967.
- [56] T. Regueiraa, M. . Andresena and S. Djafarzadehb, "Disfunción mitocondrial en sepsis, impacto y posible papel regulador del factor inducible por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ )," *Med Intensiva*, vol. 33, no. 8, 2009.
- [57] I. Martos and P. Acisclo, *cadena de transporte de electrones mitocondrial, una nueva visión.*, Castellón, Km. 3,400 – 50013 Zaragoza; España: Cometa, S.A., 2013.
- [58] D. Nelson and M. Cox, *Lehninger. Principios de bioquímica*, Omega, 2014.
- [59] G. Pérez, "COENZIMA," CC BY-SA 3.0, [Online]. Available: [http://www.coenzima.com/coenzimas\\_nad\\_y\\_nadh](http://www.coenzima.com/coenzimas_nad_y_nadh). [Accessed 21 05 2015].
- [60] R. K. Murray, H. Raúl and M. Araiza, *Harper Bioquímica Ilustrada*, McGraw-Hill, 2013.
- [61] A. S. Pérez, *Tesis; Espectroscopia De Fluorescencia Laser En Leucocitos De Humano*, México D.F: UAMI; División de Ciencias Basicas e Ingeniería, 1999.
- [62] A. Katoh, K. Uenohara, M. Akita and T. Hashimoto, "Early steps in the biosynthesis of NAD in Arabidopsis start with aspartate and occur in the plastid," *Plant Physiology*, vol. 3, no. 141, 2006.
- [63] J. Foster and A. Moat, "Nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and pyridine nucleotide cycle metabolism in microbial systems," *Microbiological reviews*, vol. 44, no. 1, 1980.
- [64] C. E. Vázquez, "BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR EN LÍNEA," Instituto de Química, © UNAM, 2003. [Online]. Available: <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/nadph1.html>. [Accessed 21 05 2015].
- [65] T. B. E. García, B. A. Saldaña, P. C. García and M. M. Bastarrechea, "NADPH-oxidasa fagocítica: componentes, ensamblaje y mecanismo de acción," *Revista Cubana de*



*Investigaciones Biomédicas*, vol. 20, no. 1, pp. 59-63, 2001.

- [66] A. Rincón, J. Camilo, G. Díaz, L. Yaneth, L. Quintero and J. Álvaro, "Sistema NADPH oxidasa: nuevos retos y perspectivas latreia," *latreia*, 23, vol. 23, no. 4, pp. 362-372., 2010.
- [67] A. S. Pérez, Tesis: Espectroscopia de fluorescencia láser en leucocitos humanos, México D.F.: Universidad Autónoma Metropolitana, 1999.
- [68] W. Ying, "NAD<sup>+</sup>/NADH and NADP<sup>+</sup>/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences," *Antioxidants & redox signaling*, 10(2), vol. 10, no. 2, pp. 179-206, 2008.
- [69] L. Crofford, P. Lipski, P. Brooks, S. Abramson and L. Simon, "Basic Biology and Clinical application of specific ciclooxigenase-2 inhibitors," vol. 43, no. 4-13, 2000.
- [70] T. V. Martinez, A. R. Blanco, B. B. Alonso and V. V. Rodriguez, "Artropatias microcristalinas II, Artritis por pirofosfatos," *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, vol. 8, pp. 1773-1780, 2001.
- [71] P. G. Barreno, "Inflamación," *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Fís.Nat.*, vol. 102, no. 1, 2008.
- [72] J. Gallin, *Fundamental Immunology; Inflammation*, Raven Press, New York: Paul, WE., 1989, pp. 721-733.
- [73] I. Roit, J. Brostoff and D. Male, *Inmunología*. 2ª ed, Barcelona: Salvat, 1992.
- [74] D. Male, B. Champion, A. Cooke and M. Owen, *Advance Immunology*. 2ª ed; Cell troffic and inflammation, New York, 1991.
- [75] J. Gallin, "Inflammation," *Fundamental Immunology*, Raven Press, pp. 721-733, 1989.
- [76] R. H. J. Nava, La disfunción mitocondrial como posible causa de la falla orgánica múltiple asociada a la sepsis severa, México D.F.: REVISTA DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS, 2009.
- [77] P. G. Barreno, "INFLAMACIÓN; IX Programa de Promoción de la Cultura Científica y Tecnológica," *R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat.*, vol. 102, no. 1, 2008.
- [78] Kumar, A. K. Abbas, N. Fausto and A. Jon, "Acute and chronic inflammation," *Elsevier*, vol. 2, 2009.
- [79] C.-H. C. Aaron, R. A. Praveen, Y.-Y. Huang and T. E. M, "Low-Level Laser Therapy Activates NF-kB via Generation of Reactive Oxygen Species in Mouse Embryonic Fibroblasts," vol. 6,



- no. 7, 2011.
- [80] T. Karu, L. Pyatibrat and N. Afanasyeva, "Cellular effects of low power láser therapy can be mediated by nitric oxide," *Microcirculation*, vol. 13, no. 1, pp. 41-47, 2006.
- [81] M. N. Islam and F. Gracia, "Los antioxidantes para la salud óptima," *Revista médica científica*, vol. 26, no. ISSN 2218-8266, 2013.
- [82] L. García and S. M. Lozada, "Oxidative stress and antioxidants, how to keep the balance.," *Revista de asociación colombiana en dermatología*, vol. 17, no. 172, 2009.
- [83] U. Huiv, "Tratamiento natural para la regeneración celular," [Online]. Available: <https://recuperesusalud.wordpress.com/about/>. [Accessed 31 03 2016].
- [84] T. Finkel, "Signal transduction by reactive oxygen species," *The Journal of cell biology*, vol. 194, no. 1, 2011.
- [85] D. Gius and D. Spitz, "Redox signaling in cancer biology," *Antioxidants & redox signaling*, vol. 8, no. 7, 2006.
- [86] G. T. García, D. I. Martínez, P. Reyes and C. Mejía, "Apoptosis: The role of free radicals in physiological and pathological states," *Research Signpost Kereala, India*, pp. 85-104, 2009.
- [87] C. L. Michael, J. S. Johnson, S. M. Giovanazzi and M. J. Pico, "Photosensitized production of superoxide anion by monochromatic (290–405 nm) ultraviolet irradiation of NADH and NADPH coenzymes," *coenzymes. Photochemistry and photobiology*, vol. 42, no. 2, pp. 125-128, 1985.
- [88] G. A. Monique, B. R. Dominique, A. Zohreh and J. Daniel, "Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?," *L'actualité chimique*, 91., pp. 91-96, 2003.
- [89] G. M. Sanchez, "Especies reactivas del oxígeno y balance redox," *Revista cubana de farmacia*, vol. 3, no. 39, 2005.
- [90] B. A. Cea, M. I. Arenal, R. H. Riveros and C. E. Vázquez, "BIOLOGÍA DE LAS ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVAS," *Mens Bioquim.*, vol. Vol XXVI, no. (ISSN-0188-137X), pp. 19-53., 2002.
- [91] M. A. Saavedra, C. E. Calderón, C. E. Sierra, F. J. Christian, Z. M. Gaona and G. Clemente, "PAPEL PATOFISIOLÓGICO DEL ÓXIDO NÍTRICO MITOCONDRIAL," *Mensaje Bioquímico*, vol. XXVIII, no. (ISSN-0188-137X), 2004.
- [92] G. A. M. Guzmán, G. A. Velázquez and V. M. P. Sierra, "Óxido nítrico, estrés nitrosante y función mitocondrial," *Revista de endocrinología y nutrición*, vol. 14, no. 4, pp. 227-232,



Octubre-Diciembre 2006.

- [93] L. G. Sara María Lozada, "Estrés oxidativo y antioxidantes: cómo mantener el equilibrio," no. 17:172-9, 2009.
- [94] L. JD, "NOX enzymes and the biology of reactive oxygen," Vols. 4:181-9., 2004.
- [95] T. Leto, S. Morand, D. Hurt and T. Ueyama, "Targeting and regulation of reactive oxygen species generation by Nox family NADPH oxidases.," *Antioxidants & redox signaling*, 11(10), vol. 11, no. 10, pp. 2607-2619, 2009.
- [96] K. Berdard and K. Krause, "The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases," *Physiological reviews*, vol. 87, no. 1, pp. 245-313, 2007.
- [97] D. Brown and K. Griendling, "Nox proteins in signal transduction," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 47, no. 9, pp. 1239-1253, 2009.
- [98] D. Brown, K. Griendling, M. Katsuyama, K. Matsuno and N. Yabe, "Physiological roles of NOX/NADPH oxidase, the superoxide-generating enzyme," *J Clin Biochem Nutr.*, vol. 50, no. 1, pp. 9-22, 2012.
- [99] E. Rada, M. Marzal, N. Aranzazu and J. Convit, "Incremento de óxido nítrico en el suero y sobrenadantes de cultivo de células mononucleares de pacientes con la enfermedad de Hansen en estado reaccional tipo II," *Investigación Clínica*, vol. 44, 2003.
- [100] E. P. Tarrán, "Desinfección por luz ultravioleta," *Revista Agua Latinoamérica*, vol. 2, pp. 28-35, 2002.
- [101] C. Morales and M. A. López-Nevot, "Efectos de la radiación ultravioleta (UV) en la inducción de mutaciones de p53 en tumores de piel. , ,," *Oncología (Barcelona)*, vol. 29, no. 7, pp. 25-32, 2006.
- [102] B. A. Cea, M. I. Arenal, R. H. Riveros and C. E. Vázquez, "Biología de las especies de oxígeno reactivas," *Mens Bioquim.*, vol. 26, pp. 19-53, 2002.
- [103] G. M. Sánchez, "Especies reactivas del oxígeno y balance redox," *Revista Cubana Farmacia*, vol. 39, no. 3, 2005.
- [104] B. N. Ames, R. Cathcart, E. Schwiers and P. Hochstein, "Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 78, no. 11, pp. 6858-6862, 1981.
- [105] S. Kaur, T. Oddos, S. S. Tucker and D. M. Southall, "Regulation of DNA Repair Process by the Pro-Inflammatory NF- $\kappa$ B Pathway," *Directions in DNA Repair. InTech, Rijeka, Croatia*, pp.





213-227, 2013.

- [106] L.-B. Lucia Nikolaia, "La regulación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Un mediador molecular en el proceso inflamatorio," *Revista de Investigación Clínica UNAM*, vol. 56, no. 83, 2004.
- [107] R. O. Escárcega, "El factor de transcripción nuclear kappa en las enfermedades humanas," *Revista Medica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, vol. 48, 2010.
- [108] A. M. Cascales, "Bases moleculares de la apoptosis," *Real Academia Nacional de Farmacia*, vol. 69, 2003.
- [109] M. C. Angosto, "Bases moleculares de la apoptosis," *Real Academia Nacional de Farmacia*, vol. 69, 2003.
- [110] R. Sánchez and G. Arboleda, "Mitocondria y muerte celular," *NOVA; Publicación Científica en ciencias biomédicas*, vol. 6, no. 10, 2008.
- [111] J. Haendeler, A. M. Zeiher and S. Dimmeler, "Nitric Oxide and Apoptosis," *Vitamins & Hormones*, vol. 57, pp. 49-77, 1997.
- [112] H. Wang, Y. Wei and H. .. Guo, "Reducción de la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) de fluorescencia para la detección de la muerte celular.," 2008.
- [113] H. Wang, V. Gukassyan, C. Chen, Y. Wei, H. Guo, J. Yu and F. .. Kao, "Diferenciación de la apoptosis de la necrosis por los cambios dinámicos de la reducción de la nicotinamida adenina dinucleótido de vida de fluorescencia en células vivas.," vol. 13, 2008.
- [114] R. C. Velasco, "Disfunción endotelial," *Diagnostico, Universidad Peruana "Cayetano Heredia"*, vol. 1, 2012.
- [115] J. Haendeler, A. Zeihe and S. Dimmeler, "Nitric Oxide and Apoptosis," *Vitamins & Hormones*, vol. 57, pp. 49-77, 1997.
- [116] Skoog-Leary, *Análisis Instrumental*, Cuarta edición ed., México D.F: McGraw Hill, 1995.
- [117] F. Guerra and D. Javier, "Técnicas de microscopía optica," *Arbor CLXXVII*, no. 698, pp. 225-258 pp, 2004.
- [118] J. Kricka and Larry, "Sensitive detection systems, Chemiluminescent and Bioluminescent techniques," *Clin. Chem*, vol. 37, no. 9, pp. 1472-1481, 1991.
- [119] O. M. Tellez, *Datación por el método de termoluminiscencia de cerámicas de Playa Vicente*, Veracruz, Veracruz, México: Universidad Veracruzana, 2015.



- [120] UNED, "luminiscencia," Universidad de educación a distancia; Madrid España, 2013. [Online]. Available: [http://www2.uned.es/cristamine/mineral/prop\\_fis/luminiscencia1.htm](http://www2.uned.es/cristamine/mineral/prop_fis/luminiscencia1.htm). [Accessed 13 03 2016].
- [121] R. C. García and M. I. Martínez, "Ventajas del Método de Quimioluminiscencia frente al de Radioinmunoanálisis (RIA)," *Visión científica*, vol. 1, no. 2, 2007.
- [122] B. F. Xu, G. Palmer, C. Zhu, K. Gilchrist and N. Ramanujam., "Autofluorescence and Diffuse Reflectance Properties of Malignant and Benign Breast Tissues," vol. 11, 2004.
- [123] O. Shimomura, *Bioluminescence*, USA: World Scientific, 2006.
- [124] A. M. Rogatsky and G. Gennady, "Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies," *Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society*, vol. 292, 2007.
- [125] L. JR., *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd ed ed., New York: Springer, 2006, p. 954.
- [126] N. Ramanujan, *Spectroscopy fluorescence in vivo*, Encyclopedia of analytical chemistry, Meyers, 2000.
- [127] E. Finn and M. Alonso, *Física Volumen III, Fundamentos Cuánticos y Estadísticos*, Addison-Wesley Iberoamericana, 1976.
- [128] A. L. Dos, "Ciencias Físicas Primero," *Espectro Electromagnético*, [Online]. Available: [cs-fs-primero.blogspot.mx/2011/04/espectro-electromagnetico.html](http://cs-fs-primero.blogspot.mx/2011/04/espectro-electromagnetico.html). [Accessed 03 04 2016].
- [129] O. Javier and I. Torres, "Efectos de las radiaciones electromagnéticas no ionizantes en sistemas biológicos," *Rev Med Risaralda*, vol. 12, no. 2, 2006.
- [130] A. F. Savall, B. J. L. Doménech and T. J. Martínez, "La introducción del concepto de fotón en bachillerato," vol. 35, 2013.
- [131] J. P. Valcárcel, H. S. González and D. H. M. Valcárcel, "Espectroscopía. Fundamentos de la resonancia magnética nuclear," *Entornos, Universidad Surcolombiana. Vicerrectoría de Investigación y Proyección Social*, no. 21, pp. 89-94, 2008.
- [132] Carrillo and H. R. Vega, "Notas del curso de Física Moderna," Unidad Académica de Ingeniería Eléctrica, Universidad de Zacatecas, 02 03 2011. [Online]. Available: <http://www.uaz.edu.mx/neutron/fm/literatura/notes/Ec%20de%20Schrodinger.pdf>. [Accessed 17 03 2016].
- [133] F. Rombal, "Los modelos matemáticos de la mecánica cuántica," Universidad Complutense de Madrid, [Online]. Available:



- [http://www.fundacionorotava.org/archivos%20adjuntos/publicaciones/actas/actas\\_4\\_5\\_pdf/Act.IV-V\\_C006\\_txi\\_w.pdf](http://www.fundacionorotava.org/archivos%20adjuntos/publicaciones/actas/actas_4_5_pdf/Act.IV-V_C006_txi_w.pdf). [Accessed 4 1 2016].
- [134] Iquímica, "Orbitales y Números cuánticos," [Online]. Available: <http://iiquimica.blogspot.mx/2006/02/orbitales-y-nmeros-cunticos.html>. [Accessed 17 03 2016].
- [135] G. W. Castellan, *Fisicoquímica*, México: Fondo Educativo Interamericano, 1986.
- [136] E. d. I. Industriales and U. d. Valladolid, "CURSO DE INTRODUCCION EN QUIMICA GENERAL; Mecánica cuántica y orbitales atómicos," Escuela de Ingenierías Industriales ; Universidad de Valladolid; Dpto. Química Orgánica., 20 05 2013. [Online]. Available: <http://www.eis.uva.es/~qgintro/atom/tutoria>. [Accessed 17 03 2016].
- [137] Mariana, "Números cuanticos," Tusion.blogspot.com, 2009. [Online]. Available: <http://quimicacbtis.blogspot.mx/2009/09/numeros-cuanticos-la-fisica-clasica-no.html>. [Accessed 17 03 2016].
- [138] D. Seiten, "Los números cuánticos," Nett, dass Sie meine Homepage besuchen!, [Online]. Available: [http://web.educastur.princast.es/proyectos/jimena/pj\\_franciscga/ncuanticos.htm](http://web.educastur.princast.es/proyectos/jimena/pj_franciscga/ncuanticos.htm). [Accessed 17 03 2016].
- [139] B. ANGEL, "Computadores," ARQUITECTURA DE COMPUTADORES, 2013. [Online]. Available: <http://pascalisa.blogspot.mx/>. [Accessed 17 03 2016].
- [140] N. Turro, *Modern Molecular Photochemistry*, Mill Valley, CA: University Science Books, 1991.
- [141] J. E. Baggott and A. Gilbert, *Essentials of Molecular Photochemistry*, Blackwell, Oxford: CRC, 1991.
- [142] J. R. Albani, *Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy*, Blackwell Publishing., 2007.
- [143] W. W. Parson, *Modern Optical Spectroscopy*, 1st edition ed., Germany: Springer, 2007.
- [144] E. M. T. Martínez and G. C. L. Moctezuma, *Espectrofluorimetría*, México D.F: Universidad Autónoma de México; Instituto de Biotecnología, 2006.
- [145] N. G. Vasantha Pattabhi, *Biophysics*, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer academic publishers, Narosa Publishing House, 2002, p. 423.



- [146] T. P. Jue., Handbook of modern biophysics, Fundamental concepts in biophysycs, vol. uno, Humana Press, 1999.
- [147] A. E. HUMANITAS, "COLORIMETRÍA: METALES DISUELTOS EN AGUA," EX UMBRA IN SOLEM: SCIENTIA, ARS ET HUMANITAS, 28 05 2014. [Online]. Available: [http://ex-umbra-in-solem-editorial.blogspot.mx/2014\\_01\\_01\\_archive.html](http://ex-umbra-in-solem-editorial.blogspot.mx/2014_01_01_archive.html). [Accessed 18 03 2016].
- [148] A. S. Douglas, F. J. Holler and A. N. Timothy, Principios de análisis instrumental, McGraw-Hill, 2001, p. 1028.
- [149] UNAD, "Lección 23: Relación entre intensidad de fluorescencia y concentración," 401539-Espectroscopia, [Online]. Available: [http://datateca.unad.edu.co/contenidos/401539/exe-2%20de%20agosto/leccin\\_23\\_relacin\\_entre\\_intensidad\\_de\\_fluorescencia\\_y\\_concentracin.html](http://datateca.unad.edu.co/contenidos/401539/exe-2%20de%20agosto/leccin_23_relacin_entre_intensidad_de_fluorescencia_y_concentracin.html). [Accessed 18 03 2016].
- [150] J. R. Lakowics, Principles of Fluorescence Spectroscopy, third edition ed., Singapore: Springer, 2006.
- [151] P. N. Prasad, Introduction to Biophotonics, New Jersey: John Wiley & Sons, 2003.
- [152] H. Robledo, "Principios generales de la luz láser en la cirugía cutánea y su interacción tisular," vol. 69, no. 5, pp. p. 486-489, 2001.
- [153] D. A. F. Bustos, Tesis: desarrollo de espectrofluorómetro portátil para mediciones in situ de tejidos biológicos, México D.F: IPN ESIME ZACATENCO, 2010.
- [154] N. Ramanujam, "Fluorescence spectroscopy in vivo", Encyclopedia of Analytical, 2000.
- [155] N. Ramanujam, M. F. Mitchell, A. Mahadevan-Jansen and S. L. Thomson, ""Cervical Precancer Detection Using a Multivariate Statistical Algorithm Based on Laser-Induced Fluorescence Spectra at Multiple Excitation Wavelengths"," vol. 64, no. 4, pp. 720-735, 1996.
- [156] I. Bliznakova and E. a. A. L. Borisova, "Laser and Light-Induced Autofluorescence Spectroscopy of Human Skin in Dependence on Excitation Wavelengths," *Acta Physica Polonica A.*, vol. 112, no. 5, pp. 1131-1136, 2007.
- [157] E. Lohmann and W. Paul, "In situ Detection of Melanomas by Fluorescence Measurements," *Naturwissenschaften*, vol. 75, no. 4, pp. 201-202, 1988.
- [158] G. Pérez., "[http://www.coenzima.com/coenzimas\\_nad\\_y\\_nadh](http://www.coenzima.com/coenzimas_nad_y_nadh)," © COENZIMA .COM. [Online]. [Accessed 17 03 2015].



- [159] A. M. Rogatsky and G. Gennady, "Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies," *Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society*, vol. 292, 2006.
- [160] "sigma-aldrich.com," SIGMA ALDRICH, 2012. [Online]. Available: [http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/2/n4505pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/n4505pis.pdf). [Accessed 10 05 2015].
- [161] J. Passonneau and O. Lowry, *Enzymatic Analysis. A Practical Guide*, Totowa, NJ: Humana Press, 1993.
- [162] A. M. Rogatsky and G. Gennady, "Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies," *American journal of physiology-Cell physiology*, vol. 292, no. 2, pp. C615-C640., 2007.
- [163] A. M. Rogatsky and G. Gennady, "Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies," *American journal of physiology-Cell physiology*, vol. 292, no. 2, First published August 30, 2006.
- [164] B. Chance, N. Oshino, T. Sugano and A. Mayevsky, "Basic principles of tissue oxygen determination from mitochondrial signals. In," *Int Symposium on Oxygen Transport to Tissue*, vol. 37A, pp. 277-292, 1973.
- [165] B. Z. Vanderkooi, T. Troxler and M. Jane, "Temperature Dependence for Fluorescence of  $\beta$ -NADH in Glycerol/Water Solution and in Trehalose/Sucrose Glass.," *Journal of fluorescence*, 17(1), vol. 17, no. 1, pp. 37-42, 2007.
- [166] R. M. Ballew, E. A. Brown, J. N. Demas and Nesselrodt, "Photophysics in a disco: Luminescence quenching of quinine," *Journal of Chemical Education*, vol. 67, no. 12, p. 1065, 1990.
- [167] (-). Halide, "Quenching of Quinine Sulfate Fluorescence: A Time-Resolved Fluorescence Experiment for Physical Chemistry," *Journal of chemical education*, vol. 82, no. 2, p. 302, 2005.
- [168] J. Eng, R. Lynch and R. Balaban, "Nicotinamide adenine dinucleotide fluorescence spectroscopy and imaging of isolated cardiac myocytes," *Biophysical Journal*, vol. J 55, no. 4, p. 621-630, 1989.
- [169] L. Woodruff, J. Bounkeo, W. Brannon, K. Dawes, C. Barham, D. Waddell and C. Enwemeka, "The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature.," *Photomedicine and laser surgery*, vol. 22, no. 3, pp. 241-247, 2004.



- [170] W. Dermtroder, *Laser Spectroscopy*, Germany: Springer, 1995.
- [171] J. R. Lakowiks, *Principles of Fluorescence Spectroscopy Academic / Plenum Publishers*, 2nd Edition, U.S.A: Kluwer, 1999.
- [172] StainsFile, *Fluorescein Spectral Characteristics*, 12 edition, U.S.A: The Merk Index, 2004.
- [173] R. y. J. F. Kenneth A., *Análisis Instrumental.*, Madrid 2001: Prentice Hall., 2001.
- [174] thorlabs, "Thorlabs, Optical Filters," Thorlabs, Inc, 1999-2016. [Online]. Available: [http://www.thorlabs.com/navigation.cfm?guide\\_id=21](http://www.thorlabs.com/navigation.cfm?guide_id=21). [Accessed 18 03 2016].
- [175] D. photonic, "Coupled charge device," Microscopy facility, [Online]. Available: [http://wwwuser.cnb.csic.es/~fotonica/Photonic\\_en/Review/ccd1.htm](http://wwwuser.cnb.csic.es/~fotonica/Photonic_en/Review/ccd1.htm). [Accessed 21 03 2016].
- [176] ScanDig, "Saber como; Sensores CCD en Escáners y Cámaras Digitales," Patrick Wagner, Fa. ScanDig, [Online]. Available: <http://www.filmscanner.info/es/CCDSensoren.html>. [Accessed 21 03 2016].
- [177] T. Group, "Lovibond® Accessories," Lovibond® and Tintometer®, 05 2012. [Online]. Available: <http://lovibondcolour.com/cells#W600 Optical Glass>. [Accessed 20 03 2015].
- [178] ©. C. S. S. d. C. T. I. d. reservados, "Cientifica Senna," Celdas para espectrofotometro , 2015. [Online]. Available: <http://www.cientificasenna.com/index.php?modulo=catalogo&accion=articulo&id=1488>. [Accessed 20 03 2015].
- [179] S. d. C. M. Internacional de Equipos Científicos, "Celdas Micro," IECSA, 2005. [Online]. Available: <http://www.iecsaenlinea.com/ListaProductosCNX2.asp?cat=108>. [Accessed 21 03 2016].
- [180] T. científicos, "TIPOS DE FIBRAS ÓPTICAS," textoscientificos.com, 20 11 2005. [Online]. Available: <http://www.textoscientificos.com/redes/fibraoptica/tiposfibra>. [Accessed 21 03 2016].
- [181] G. J. E. García and R. F. C. Martínez, "El láser ¿motivación o realidad para el estudio de Física por los estudiantes de las Ciencias para la Salud?," *Rev Cubana Invest Biomed*, vol. 25, no. 1, 2006.
- [182] M. E. C. Sánchez, "El láser de media potencia y sus aplicaciones en medicina," *Medical graphics, plasticidad y restauración neurológica*, vol. 6, no. 1, 2007.



- [183] V. Aboites, Láser, vol. 105, Fondo de Cultura Económica; La ciencia para todos, 2003.
- [184] E. A. Relativity, The Special and the General Theory, Crown Publishers Inc: NY, 15 th.
- [185] E. Mester, J. Juhasz, P. Varfa and G. Kanka, Lasers in Clinical Practice, Acta ChirurgicaAcadem Hungaria, 1968.
- [186] M. M. Mester E, The biomedical effects of laser applications, vol. Lasers in Surgery an Medicine, 1985:5;31-39..
- [187] U. D. o. H. a. H. Services, "Productos emisores de radiación (BIOSTIMULATION LASERS)," US Food and Drug Administration, 22 07 2014. [Online]. Available: <http://www.fda.gov/Radiation-EmittingProducts/ResourcesforYouRadiationEmittingProducts/ucm252761.htm#top>. [Accessed 24 07 2015].
- [188] J. T. Terrasa and R. M. Jimenez, Tecnología y practica del laser, Barcelona: S.A. Marcombo, 1987.
- [189] V. Aboites, El láser, Fondo De Cultura Economica, 2003.
- [190] G. J. E. Garcia and R. F. Martinez, "El láser ¿motivación o realidad para el estudio de Física por los estudiantes de las Ciencias para la Salud?," *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, vol. 25, no. 1, 2006.
- [191] T. TICS, "Laser," 2014. [Online]. Available: <http://telecomunicaciones2.webnode.mx/unidad-6/a6-4-laser-/>. [Accessed 22 03 2016].
- [192] A. M. Téllez, "La Mecánica Cuántica," 11 08 2009. [Online]. Available: <http://la-mecanica-cuantica.blogspot.mx/2009/08/el-laser.html>. [Accessed 23 03 2016].
- [193] R. Resnick, Física Vol.1, México: Compañía editorial continental, 1993.
- [194] M. A. S. García and R. I. Reyes, Tesis: Sistemas de comunicación con tecnología láser, México: IPN, 2011.
- [195] D. A. Yavorsky BM, Prontuario de fisica IV parte, Moscu: Ed. Mir., 1983.
- [196] W. H. Jenkins FA, Fundaments of optics international student, Edition McGraw-Hill Book Co., 2002.
- [197] O. C. Lab., The solar electromagnetic radiation spectrum., Madrid: Compiled by HH Malitson, Goddard Space Fight Center Greenbelt., 2003:10.



- [198] R. C. Uribe, F. M. Vargas and H. S. Mella, "Estudio Morfométrico del Efecto de Láser Infrarrojo 16 J/cm<sup>2</sup> sobre Hepatocitos de Rata," *Int. J. Morphol.*, 29(2), 2011., vol. 29, no. 2, pp. 650-655, 2011.
- [199] R. C. Uribe, F. M. Vargas, H. S. Mella, O. G. Oñate and K. B. M. & A. J. Hidalgo, "Análisis Morfométrico del Efecto de Estimulaciones de Láser Infrarrojo sobre Núcleos de Hepatocitos de Rata," *Int. J. Morphol.*, vol. 3, no. 28, 2010.
- [200] U. R. Cornejo, V. F. Matamala, M. H. Silva and O. O. Garrido, "Análisis morfométrico y ultraestructural del efecto del láser infrarrojo 10 j/cm<sup>2</sup> sobre fibroblastos de conejo," *Rev. cient. (Maracaibo)*, vol. 20, no. 5, 2010.
- [201] J. Echevarria, "Láser de baja potencia en el dolor osteomioarticular," Ecu red, conocimiento para todos, 1986. [Online]. Available: [http://www.ecured.cu/index.php/L%C3%A1ser\\_terapia\\_de\\_baja\\_instensidad](http://www.ecured.cu/index.php/L%C3%A1ser_terapia_de_baja_instensidad). [Accessed 23 03 2016].
- [202] Omega, "Healing through light," [Online]. Available: <http://www.omegalaser.co.uk/>. [Accessed 24 03 2016].
- [203] H. J., "The laser guidebook," McGraw-Hill Book Co., 2005.
- [204] R. Corpas, "Curso basico de laserterapia," Malaga España, Fundación UEDA-SPACE 2000, 2000.
- [205] D. R. Rodríguez-Castillo, "Tratamiento endovascular de la enfermedad varicosa," vol. 41, no. 4, 2013.
- [206] J. Tuner and L. Hode, *Low Level Laser Therapy: Clinical Practice and Scientific Background*, Grängesberg, Sweden: Prima Books, 1999.
- [207] T. Karu, "Photobiology of low-power laser effects," vol. 56, 1989.
- [208] G. Lajos, "Tribute professor Endre Mester, the father of photobiomodulation," *Journal of Dentistry*, vol. 17, no. 3, 2009.
- [209] Y. Huang, S. Sharma, J. Carroll and M. Hamblin, "Biphasic dose response in low level light therapy," *Dose-Response*, vol. 7, no. 4, 2011 .
- [210] A. Sommer, A. Pinheiro, A. Mester, R. Franke and H. Whelan, "Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system.," *Journal of clinical laser medicine & surgery*, vol. 19, no. 1, pp. 29-33, 2001.





- [211] J. Sutherland, "Biological effects of polychromatic light," *Photochemistry and photobiology*, vol. 76, no. 2, pp. 164-170, 2002;76:164–170..
- [212] R. C. Reinoso, J. C. Simes and M. Moya, "Efectos de la foto estimulación sobre marcadores inflamatorios y de estrés oxidativo en cristalopatía experimental," *UNLaR Ciencia*, vol. 1, no. 1, 2009.
- [213] S. D. \_Health\_and\_Human, "U.S. Food and Drug Administration," FDA; Protecting and Promoting Your Health, 22 07 2014. [Online]. Available: <http://www.fda.gov/Radiation-EmittingProducts/ResourcesforYouRadiationEmittingProducts/ucm252761.htm>. [Accessed 26 07 2015].
- [214] G. Baxter, *Therapeutic Lasers: Theory and Practice*, Churchill Livingstone, vol. 1, New York : Churchill Livingstone: Edinburgh , 1994.
- [215] Z. E. Simunovic, *Lasers in Medicine and Dentistry*, vol. 4, Croatia: Vitgraf, Rijeka, 2000.
- [216] S. Mordon, "Ventajas de la cicatrización cutánea asistida por láser (LASH), Advantages of laser assisted scar healing (LASH)," vol. 37, no. 4, pp. Pag. 387- 392, Octubre -Noviembre-Diciembre 2011.
- [217] D. K. Chatterjee, L. S. Fong and Y. & Zhang, "Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 60, no. 15, pp. 1627-1637, 2008.
- [218] T. Karu, *Low-power láser therapy*, Boca Ratón: En: Vo-Dinh T, editor. Biomedical Photonics, CRC Press; 2002., pp. p. 1-25.
- [219] R. Waynant, *Lasers in Medicine*, Boca Ratón: CRC Press, 2002.
- [220] H. B. Splinter R, *An introduction to biomedical optics*, Boca Ratón: Taylor & Francis Group, 2007.
- [221] T. Karu, "The Science of Low Power Láser Therapy," *Gordon & Breach Science Publishers.*, 1998.
- [222] P. J. Anderson RR, "The optics of human skin," Vols. 77: 13-19, 1981.
- [223] D. T. Parrish JA, "Laser photomedicine," Vols. 20: 1386-1396.
- [224] M. Greco, G. Guida, E. Perlino, E. Marra and E. Quagliariello, "Increase in RNA and protein synthesis by mitochondria irradiated with helium-neon laser," *Biochemical and biophysical research communications*, 163(3), 1428-1434., vol. 163, no. 3, p. 1428–1434, 1989.



- [225] T. Karu, "Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells," *Journal of Photochemistry and photobiology B: Biology*, 49(1), , vol. 49, no. 1, p. 1999, 1-17.
- [226] A.-H. Chen, P. Arany, Y.-Y. Huang, E. Tomkinson, T. Saleem, F. Yull and T. Blackwell, "Low level laser therapy activates NF- $\kappa$ B via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts," *PloS one*, vol. 6, no. 7, p. e22453, 2009.
- [227] T. Karu and S. Kolyakov, "Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy," *Photomedicine and Laser Therapy*, vol. 23, no. 4, p. 355–361, 2005.
- [228] T. Karu and S. Kolyakov, "Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy," *Photomedicine and Laser Therapy*, vol. 23, no. 4, pp. 355-361, 2005.
- [229] D. E. G. a. D. C. Wharton\*, "Studies of the Electron Transport System; "Purification and propierties of cytochrome oxidase", " vol. 236, no. 61, 1961.
- [230] T. Karu, "Action Spectra their importance for low level light therapy," *Institute of laser and information of technologies*, vol. 1, 2002.
- [231] T. Karu, L. Pyatibrat and G. Kalendo, "Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro," *Journal of Photochemistry and photobiology B: Biology*, vol. 27, no. 3, pp. 219-223, 1995.
- [232] J. H. Solís, "Terapia Infrarroja, Aplicaciones y Resultados en Neuropatía Diabética y úlceras," *Revista médica de Costa Rica y Centro América Endocrinología*, vol. 597, pp. 189-193, 2011.
- [233] T. Karu, "Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells," *Journal of Photochemistry and photobiology B: Biology*, vol. 49, no. 1, pp. 1-17., 1999.
- [234] C.-H. C. Aaron, R. A. Praveen, Y.-Y. Huang and M. T. Elizabeth, "Low-Level Laser Therapy Activates NF- $\kappa$ B via Generation of Reactive Oxygen Species in Mouse Embryonic Fibroblasts," *PloS one*, vol. 6, no. 7, 2011.
- [235] Y.-Y. Huang, A. C.-H. Chen and J. D. Carroll, "Biphasic Dose Response in Low Level Light Therapy," *dose-response*, vol. 7, no. 4, 2009.
- [236] J. Zhang, D. Xing and X. Gao, "Low-power laser irradiation activates Src tyrosine kinase through reactive oxygen species-mediated signaling pathway.," *Journal of cellular physiology*, vol. 217, no. 2, pp. 518-528, 2008.
- [237] G. Pal, A. Dutta, K. Mitra, M. Grace, T. Romanczyk, X. Wu, K. Chakrabarti, J. Anders and E. Gorman, "Effect of low intensity laser interaction with human skin fibroblast cells using



- fiber-optic nano-probes.," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 90, no. 3, 2007.
- [238] A. Chen and H. Chih, "Role of reactive oxygen species in low level light therapy." Mechanisms for Low-Light Therapy IV.," *International Society for Optics and Photonics.*, pp. 716502-716502, 2009.
- [239] I. Lutho, Z. Denise, H. Evans, N. Houreld and H. Abrahamse, "Biological responses of injured human skin fibroblasts to assess the efficacy of in vitro models for cell stress studies," *Afr J Biochem Res*, vol. 1, no. 4, 2007.
- [240] T.Karu, "Low-power laser effects". In: *Lasers in Medicine*, New York: Ed. by R.Waynant and P.Pettit, 1998.
- [241] O. CARNEVALI, "Apoptosis in sea bream *Sparus aurata* eggs," *Molecular reproduction and development*, no. 66, 2003.
- [242] G. Shefer, T. A. Partridge, L. Heslop, J. G. Gross, U. Oron and O. Halevy, "Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells," *Journal of cell science*, vol. 7, no. 115, 2002.
- [243] G. Baxter, D. Walsh, J. Allen, A. Lowe and A. Bell, "Effects of low intensity infrared laser irradiation upon conduction in the human median nerve in vivo," *Experimental physiology*, vol. 79, no. 2, pp. 227-234, 1994.
- [244] R. T. Chow, M. A. David and P. J. Armati, "830 nm laser irradiation induces varicosity formation, reduces mitochondrial membrane potential and blocks fast axonal flow in small and medium diameter rat dorsal root ganglion neurons: implications for the analgesic effects of 830 nm laser," *Journal of the Peripheral Nervous System*, vol. 12, no. 1, 2007.
- [245] T. Hermann, E. Liatsikos, U. Nagele, O. Traxer and A. Merseburger, "Directrices sobre láseres y tecnologías," 2011.
- [246] CENETEC, "EQUIPO DE LÁSER TERAPÉUTICO PARA REHABILITACIÓN," Secretaria de Salud, CENETEC, [Online]. Available: <http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/CETpdf/laserTerapeutico/continua.pdf>. [Accessed 27 03 2016].
- [247] W. Daub, Química 8a edición, México: Pearson Educación, Prentice Hall, 2011.
- [248] A. Stelzer and Cremer, "Fluorescence of coumarins and xanthenes after two-photon absorption with a pulsed titanium-sapphire laser," *Applied optics*, vol. 34, no. 12, 1989-2003.



- [249] P. Gordon, S. Soon and H. William, "A spectroscopic study of the excited states of coumarin," *The Journal of physical chemistry*, vol. 74, 1970.
- [250] J. Coremans, C. Ince, B. HA and G. Puppels, "Quantitative analysis of reduced nicotinamide adenine dinucleotide fluorescence images of blood-perfused rat heart," vol. 72, 1997.
- [251] Exciton, "COUMARIN 460," Catalog No.: 04600 , [Online]. Available: <http://www.exciton.com/pdfs/c460.pdf>. [Accessed 28 03 2016].
- [252] Sigma-Aldrich, "b-Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced," Sigma-Aldrich Co., 2012. [Online]. Available: [http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/2/n8129pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/n8129pis.pdf). [Accessed 19 1 2016].
- [253] Astrogranada, "El problema de la contaminación luminica," Copyright © Sociedad Astronómica Granadina, 2002. [Online]. Available: [http://www.astrogranada.org/cieloscuro/htm/que\\_es\\_cl.htm](http://www.astrogranada.org/cieloscuro/htm/que_es_cl.htm). [Accessed 1 12 2015].
- [254] P. P. Ortiz, Principios elementales de física experimental y aplicada, Nueva York: Appleton & CO, 1978.
- [255] Y. Yuan, Y. Li, B. D and C. P. Relue, "Fluorescence Anisotropy of Cellular NADH as a Tool to Study Different Metabolic Properties of Human Melanocytes and Melanoma Cells," *Selected Topics in Quantum Electronics IEEE Journal*, vol. 13, no. 6, 2007.
- [256] T. Benavides, T. Pinzón and A, "Oxido nítrico: implicaciones fisiopatológicas," *Revista Colombiana de Anestesiología*, vol. 36, no. 1, pp. 45-52, 2008.
- [257] S. Moncada, " Papel del óxido nítrico en la respiracion celular," *Medicina*, vol. 58, no. 4, pp. 357-360, 1998.
- [258] R. Poyton and K. Ball, "Therapeutic photobio-modulation: nitric oxide and a novel function of mitochondrial cytochrome c oxidase," *Discov Med*, vol. 11, pp. 154-159, 2011.
- [259] L. Gavish, L. S. Perez, P. Reissman and S. D. and Gertz, "Irradiation with 780 nm diode laser attenuates inflammatory cytokines but upregulates nitric oxide in lipopolysaccharide-stimulated macrophages: Implications for the prevention of aneurysm progression," *Lasers Surg. Med.*, no. 40, p. 371–378, 2008.
- [260] Y. Moriyama, J. Nguyen, M. Akens, E. H. Moriyama and L. Lilge, "In vivo effects of low level laser therapy on inducible nitric oxide synthase.," *Lasers Surg. Med*, no. 41, p. 227–231, 2009.
- [261] K. A. Ball, P. R. Castello and R. O. Poyton, " Low intensity light stimulates nitrite-dependent



- nitric oxide synthesis but not oxygen consumption by cytochrome c oxidase: Implications for phototherapy," *Journal of Photochemistry and Photobiology*, vol. 3, no. 102, pp. 182-191, 2011.
- [262] A. C. Salgado and J. & Morán, "Papel de las ERO producidas por la NOX en procesos fisiológicos.," *Medigraphic REB*, vol. 31, no. 3, pp. 100-109, 2012.
- [263] A. C. Salgado and J. Morán, "Papel de las ERO producidas por la NOX en procesos fisiológicos.," *REB new medigraphic*, vol. 31, no. 3, 2012.
- [264] P. G. Rosete, R. C. Sánchez, R. L. Ledesma, B. E. Mancilla and E. Z. Galindo, "Óxido nítrico, una molécula multifuncional," *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México*, vol. 12, no. 4, pp. 300-304, 1999.
- [265] Y. Coello and M. Dantus, "Pulsos láser de femtosegundo en espectroscopía y microscopía de dos fotones," *Revista de Química*, vol. 22, no. 1-2, pp. 47-59, 2012.
- [266] K. D. Belfield, K. J. Schafer, Y. Liu, J. Liu, X. Ren and E. W. Van Stryland, "Multiphoton-absorbing organic materials for microfabrication, emerging optical applications and non-destructive three-dimensional imaging.," *Journal of Physical Organic Chemistry*, vol. 13, no. 12, pp. 837-849, 2000.
- [267] R. M. Williams, W. R. Zipfel and W. W. Webb, "Multiphoton microscopy in biological research," *Current opinion in chemical biology*, vol. 5, no. 5, pp. 603-608, 2001.
- [268] L. C. Palacio, Tesis: Diseño y montaje de un analizador de tiempos de vuelo lineal para el estudio de la ionización multifotónica en moléculas orgánicas simples, España: Universidad Industrial de Santander Facultad de ciencias Escuela de física Bucaramanga , 2012.
- [269] S. Huang, A. A. Heikal and W. W. Webb, "Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD (P) H and flavoprotein," *Biophysical journal*, vol. 82, no. 5, pp. 2811-2825, 2002.
- [270] E. L. U. N. O. T. A. M. (. T.R. Hermann, "Directrices sobre láseres y tecnologías," vol. 2011.
- [271] A. M. F. d. S. y. H. A. sancovich, "Interacciones de las radiaciones electromagnéticas y especies reactivas del oxígeno sobre la piel," Vols. 87: 113-120, no. ISSN 0325-2787, 2006.
- [272] M. A. M. G. y. G. M. Z. González, "Los efectos de la luz ultravioleta," vol. XXV, no. 3, Septiembre-Diciembre de 2012..
- [273] HUIV and Universal, "Tratamiento natural para la regeneración celular," [Online]. Available: <https://recuperesusalud.wordpress.com/about/>. [Accessed 31 03 2016].



- [274] R. Zhang, Y. Mio and P. Pratt, "Near Infrared light protects cardiomyocytes from hipoxia and reoxygenation injury by a nitric oxide dependence mechanism," *J. Mol. Cell Cardiol; Antioxidants & redox signaling*, vol. 46, no. 101-113., pp. 4-14, 2007.
- [275] Shiva and M. Gladwin, "Shining a light on tissue NO stores: Near infrared relase of NO afrom nitrie and nitrosylades hemes," *J. Mol. Cell Cardiol.*, vol. 46, pp. 1-3, 2009.
- [276] Q. M. Conde, C. Sande and M. T. Arroyo, "Terapia por láser de baja potencia: consideraciones óptico-físicas y biológicas determinantes en su aplicación clínica," *Fisioterapia*, vol. 33, no. 1, Enero - Febrero 2011.

## Abreviaciones:

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADP: Adenosina Difosfato

ATP: Adenosina Trifosfato

CTE: Cadena de transporte de electrones

COX: Citocromo C oxidasa o complejo IV

CMNSPR: Células Mononucleares de Sangre Periférica de Rata

CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono

ERO: Especies reactivas de Oxígeno

ERON: Especies Reactivas de los Óxidos de Nitrógeno

ERN: Especies Reactivas de Nitrógeno

FDA: Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos

HO•: Radical Hidroxilo

H<sub>2</sub>O: Agua

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de Hidrógeno

IRC: Infrarrojo Cercano

I<sub>F</sub>: intensidad de la radiación fluorescente

IR: Infrarrojo

LUV : Luz Ultra Violeta



MCP: Muerte Celular Programada

MFC: Modo de fluorescencia Continuo

MFI: Modo de fluorescencia Intermitente

NAD<sup>+</sup>: Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina

NADH: Forma reducida del Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina NAD<sup>+</sup>

NADPH: Forma reducida del Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina Fosfato NADP<sup>+</sup>

NO<sub>2</sub>•: Dióxido de Nitrógeno

NOS: Óxido Nítrico Sintetasa

NOS<sub>e</sub>: Óxido Nítrico Sintetasa Endotelial

NOS<sub>i</sub>: Óxido Nítrico Sintetasa Inducible

NOS<sub>mt</sub>: Óxido Nítrico Sintetasa Mitocondrial

NOS<sub>n</sub>: Óxido Nítrico Sintetasa Neuronal

NOX: Enzimas de la familia NADPH

O<sub>2</sub>: oxígeno

O<sub>2</sub>•: Radical o Anión Superóxido

ON•: Óxido nítrico

ONOO•: Peroxinitrito

R: Rojo

SOD : Superóxido Dismutasa

TLBI: Terapia Láser de Baja Intensidad



## Anexo técnico:

### Programa para adquisición de datos con la tarjeta Picolog ADC24

```
function varargout = guipicolog(varargin)

% GUIPICOLOG M-file for guipicolog.fig

%   GUIPICOLOG, by itself, creates a new GUIPICOLOG or raises the existing
%   singleton*.

%   H = GUIPICOLOG returns the handle to a new GUIPICOLOG or the handle to
%   the existing singleton*.

%   GUIPICOLOG('CALLBACK',hObject,eventData,handles,...) calls the local
%   function named CALLBACK in GUIPICOLOG.M with the given input arguments.

%   GUIPICOLOG('Property','Value',...) creates a new GUIPICOLOG or raises the
%   existing singleton*. Starting from the left, property value pairs are
%   applied to the GUI before guipicolog_OpeningFcn gets called. An
%   unrecognized property name or invalid value makes property application
%   stop. All inputs are passed to guipicolog_OpeningFcn via varargin.

%   *See GUI Options on GUIDE's Tools menu. Choose "GUI allows only one
%   instance to run (singleton)".

% See also: GUIDE, GUIDATA, GUIHANDLES

% Edit the above text to modify the response to help guipicolog

% Last Modified by GUIDE v2.5 06-Dec-2013 16:04:04

% Begin initialization code - DO NOT EDIT

gui_Singleton = 1;

gui_State = struct('gui_Name',    mfilename, ...
                  'gui_Singleton', gui_Singleton, ...
                  'gui_OpeningFcn', @guipicolog_OpeningFcn, ...
                  'gui_OutputFcn', @guipicolog_OutputFcn, ...
                  'gui_LayoutFcn', [], ...
                  'gui_Callback', []);

if nargin && ischar(varargin{1})
    gui_State.gui_Callback = str2func(varargin{1});
```





```
end

if nargout
    [varargout{1:nargout}] = gui_mainfcn(gui_State, varargin{:});
else
    gui_mainfcn(gui_State, varargin{:});
end

% End initialization code - DO NOT EDIT

% --- Executes just before guipicolog is made visible.
function guipicolog_OpeningFcn(hObject, eventdata, handles, varargin)

% This function has no output args, see OutputFcn.
% hObject    handle to figure
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)
% varargin   command line arguments to guipicolog (see VARARGIN)

% Choose default command line output for guipicolog
handles.output = hObject;

% Update handles structure
guidata(hObject, handles);

% UIWAIT makes guipicolog wait for user response (see UIRESUME)
% uiwait(handles.figure1);

% --- Outputs from this function are returned to the command line.
function varargout = guipicolog_OutputFcn(hObject, eventdata, handles)

% varargout  cell array for returning output args (see VARARGOUT);
% hObject    handle to figure
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Get default command line output from handles structure
varargout{1} = handles.output;

% --- Executes on button press in pushbutton1.
function pushbutton1_Callback(hObject, eventdata, handles)

%*****
%*****PROGRAMA PRINCIPAL GRAFICA TIEMPO REAL*****
```



```
%clear

%clc

%cargar librerias

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

mm=str2double(get(handles.factor,'string'));

b=str2double(get(handles.edit8,'string'));

delete (instrfind);

clc; disp('BEGIN')

s1 = serial('COM8'); %PUERTO SERIAL-USB

instrfind

set(s1,'BaudRate',9600);

set(s1,'DataBits',8);

set(s1,'Parity','none');

set(s1,'StopBits',1);

set(s1,'FlowControl','none');

fopen(s1);

instrfind

%para leer datos

if(b==0)

    switch mm

        case 20

            delete (instrfind);

s1 = serial('COM8');

fopen(s1);

fwrite(s1,103);%Envía en código ASCII

    clear s1

        case 50

            delete (instrfind);

s1 = serial('COM8');

fopen(s1);

fwrite(s1,104);%Envía en código ASCII

    clear s1

        case 100
```



```
delete (instrfind);
s1 = serial('COM8');
fopen(s1);
fwrite(s1,105);%Envía en código ASCII
clear s1
    case 200
        delete (instrfind);
s1 = serial('COM8');
fopen(s1);
fwrite(s1,106);%Envía en código ASCII
clear s1
    case 500
        delete (instrfind);
s1 = serial('COM8');
fopen(s1);
fwrite(s1,107);%Envía en código ASCII
clear s1
    case 1000
        delete (instrfind);
s1 = serial('COM8');
fopen(s1);
fwrite(s1,108);%Envía en código ASCII
clear s1
end
elseif(b==1)
switch mm
    case 20
        delete (instrfind);
s1 = serial('COM8');
fopen(s1);
fwrite(s1,97);%Envía en código ASCII
clear s1
    case 50
```



```
delete (instrfind);
s1 = serial('COM8');
fopen(s1);
fwrite(s1,98);%Envía en código ASCII
clear s1
case 100
delete (instrfind);
s1 = serial('COM8');
fopen(s1);
fwrite(s1,99);%Envía en código ASCII
clear s1
case 200
delete (instrfind);
s1 = serial('COM8');
fopen(s1);
fwrite(s1,100);%Envía en código ASCII
clear s1
case 500
delete (instrfind);
s1 = serial('COM8');
fopen(s1);
fwrite(s1,101);%Envía en código ASCII
clear s1
case 1000
delete (instrfind);
s1 = serial('COM8');
fopen(s1);
fwrite(s1,102);%Envía en código ASCII
clear s1
end
end
%%%%%%%%%%
LibName = 'HRDL';
```



```
fprintf('\n%s','Loading PicoHRDL library: ')
loadlibrary([LibName '.dll'],[LibName '.h']);
if libisloaded(LibName) == 1;
    fprintf('\t%s','OK')
else
    fprintf('\t%s','FAILED')
end

%Start up the unit and test it is functioning correctly
fprintf('\n%s','Checking unit runs ok:')

OpenHRDL = calllib(LibName,'HRDLOpenUnit');
if OpenHRDL >= 1;
    fprintf('\t%s','OK')
else
    fprintf('\t%s','FAILED')
end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

%Disable all channels

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

for DisChannel=1:1:16
    ChanDisMessage = ['Disbaling channel number ',num2str(DisChannel),': '];
    fprintf('\n%s',ChanDisMessage)
    DisChannelError = calllib(LibName,'HRDLSetAnalogInChannel',OpenHRDL,DisChannel,0,0,0);
    if DisChannelError == 1
        fprintf('\t%s','OK')
    else
        fprintf('\t%s','FAILED')
    end
end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

%Habilitando un canal; Enable all channels you wish to use
```



%%%

VoltageRange = 0; % = input('Please input the voltage range you would like to use (0 = 1250mv, 1 = 2500mv): ');

Mode = 1; % = input('Please indicate which mode you would like the data logger to run in (0 = Differential, 1 = Single Ended): ');

for EnChannel=1:1:1 % to max 16 canales

ChanEnMessage = ['Enabling channel number ',num2str(EnChannel),'];

fprintf('\n%s',ChanEnMessage)

EnChannelError = calllib(LibName,'HRDLSetAnalogInChannel',OpenHRDL,EnChannel,1,VoltageRange,Mode);

if EnChannelError == 1

fprintf('\t%s','OK')

else

fprintf('\t%s','FAILED')

end

end

%%%

%Check the correct number of channels have been enabled

%%%

%%%

fprintf('\n Canales habilitados comprobacion');

NoEnChannels = int16(zeros(1,1));

NoEnChannelsPointerType = 'int16Ptr';

NoEnChannelsPointer = libpointer(NoEnChannelsPointerType, NoEnChannels);

[NoEnChannelsError,NoEnChannels] = calllib(LibName,'HRDLGetNumberOfEnabledChannels',OpenHRDL,NoEnChannelsPointer);

NoEnChannelsMessage = ['Number of enabled Channels: ',num2str(NoEnChannels)];

fprintf('\n%s', NoEnChannelsMessage)

%Define the interval between readings

%%%

fprintf('\n%s')

Interval = 61; %niput('Please input the interval you would like between readings in ms: ');

fprintf(' Comprobación del tiempo de retardo...\n%s','Loading delay: ');

DelayError = calllib(LibName,'HRDLSetInterval',OpenHRDL,Interval,0);



```
if DelayError == 1
fprintf('%t%s','OK')
else
fprintf('%t%s','FAILED')
end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%Define the number
of readings you would like to take and how you would
%like the datalogger to record the data
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

fprintf('Número de lecturas \n%s')

Number =20;%% = input('Please input the number of readings you would like to take: ');
Type = 0; %% = input('Please input the type of readout you would like to use (0 = continous, 1 = burst, 2 = single): ');

global v;
global t;
global m;

m=45;
v=zeros(1,20);
p=0;
t=str2num(get(handles.tiempoadq,'String'));
%t=60;
u=t/60;
muestras=u*m;
for ii=1:muestras;
DataBuffer = uint32(zeros(1,NoEnChannels*muestras));
TimeBuffer = uint32(zeros(1,muestras));
OverflowBuffer = uint16(zeros(1,muestras));
%ClockStart = clock;

DataError = calllib(LibName,'HRDLRun',OpenHRDL,Number,0);
pause(Number *(Interval/1000));
%pause(0.005);

ReadyError = calllib(LibName,'HRDLReady',OpenHRDL);
if ReadyError == 0

DataErrorMessage = ['There was a problem accessing the data. Please press any key to carry on.'];
fprintf('\n%s',DataErrorMessage)
```



```
    pause
elseif ReadyError == 1
    BufferPointerType = 'int32Ptr';
    DataPointer = libpointer(BufferPointerType,DataBuffer);
    TimePointer = libpointer(BufferPointerType,TimeBuffer);
    OverflowPointerType = 'int16Ptr';
    OverflowPointer = libpointer(OverflowPointerType,OverflowBuffer);
    [UsbGrabError, TimeBuffer, DataBuffer, OverflowBuffer]=
    calllib(LibName,'HRDLGetTimesAndValues',OpenHRDL,TimePointer,DataPointer,OverflowPointer,Number);
v(1:20)=(300.0*DataBuffer/1000000)+2000;
    % v(ii)=(300.0*DataBuffer/1000000)+2000;
    % V(i:j)=[v(i),vv(i)];
i=[1:20]+p;
p=i(20);
figure (1);
    hold on
plot(i,v,'*'); grid on;
title(' SEÑAL TIEMPO REAL')
xlabel('Muestras');
ylabel('Voltaje de Salida (mV)');
drawnow
    end
hold off
end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%This closes the unit down.
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
CloseUnitError = calllib(LibName,'HRDLCloseUnit',OpenHRDL);
if CloseUnitError == 1
fprintf('\t%s','Unit closed correctly')
else
fprintf('\t%s','There was a problem')
end
%*****
```





```
delete(instrfind);

s1 = serial('COM8');

fopen(s1);

fwrite(s1,112);

fclose(s1);

delete(s1)

clear s1

disp('STOP')

delete(instrfind);

% *****END TIEMPO REAL*****

% --- Executes on button press in nanometros.

function nanometros_Callback(hObject, eventdata, handles)

% hObject handle to nanometros (see GCBO)

% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB

% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)

% *****

%GRAFICA nanometros

% *****

global v;

global m;

global amax;

global med;

global fact;

med=str2num(get(handles.longini,'String'));

fact=str2num(get(handles.factor,'String'));

med

[aI,bI]= size(v);

t2=[0:1:bI-1]/m*(fact/60.0)+med; % velocidad del monocromador 100/60=10/6

figure(3);

plot(t2,v);grid on;

% ylim([0 amax]);

title('SEÑAL COMPLETA')
```



```
xlabel('ANSTROMS(A)')
ylabel('Voltaje (mV)')
%*****

function longincal_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to longincal (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)
% Hints: get(hObject,'String') returns contents of longincal as text
% str2double(get(hObject,'String')) returns contents of longincal as a double
% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function longincal_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to longincal (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles empty - handles not created until after all CreateFcns called
% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
% See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'), get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end
% --- Executes on button press in tiempo.
function tiempo_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to tiempo (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)
%*****

global v;
global m;
% global amax;
% global med;
[aI,bI]= size(v);
%t2=[0:1:bI-1]/10*(10/6)+6000;
t2=[0:1:bI-1]/m;
figure(2);
```



```
plot(t2,v);grid on;
% ylim([0 amax]);
title(' SEÑAL COMPLETA')
xlabel('TIEMPO (s)')
ylabel('Voltaje (mV)')
% *****

function edit1_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to longincal (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)
% Hints: get(hObject,'String') returns contents of longincal as text
% str2double(get(hObject,'String')) returns contents of longincal as a double
% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function edit1_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to longincal (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles empty - handles not created until after all CreateFcns called
% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
% See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'), get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end
function tiempoadq_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to tiempoadq (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)
% Hints: get(hObject,'String') returns contents of tiempoadq as text
% str2double(get(hObject,'String')) returns contents of tiempoadq as a double
% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function tiempoadq_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to tiempoadq (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles empty - handles not created until after all CreateFcns called
```



```
% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.

% See ISPC and COMPUTER.

if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'), get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end

% --- Executes on button press in star.

function star_Callback(hObject, eventdata, handles)

m=str2double(get(handles.factor,'string'));
b=str2double(get(handles.edit8,'string'));

delete (instrfind);

clc; disp('BEGIN')

s1 = serial('COM8');

instrfind

set(s1,'BaudRate',9600);

set(s1,'DataBits',8);

set(s1,'Parity','none');

set(s1,'StopBits',1);

set(s1,'FlowControl','none');

fopen(s1);

instrfind

%para leer datos

if(b==0)

    switch m

        case 20

            delete (instrfind);

s1 = serial('COM8');

fopen(s1);

fwrite(s1,103);%Envía en código ASCII

clear s1

        case 50

            delete (instrfind);

s1 = serial('COM8');

fopen(s1);
```



```
fwrite(s1,104);%Envía en código ASCII
clear s1
    case 100
delete (instrfind);
s1 = serial('COM8');
fopen(s1);
fwrite(s1,105);%Envía en código ASCII
clear s1
    case 200
delete (instrfind);
s1 = serial('COM8');
fopen(s1);
fwrite(s1,106);%Envía en código ASCII
clear s1
    case 500
delete (instrfind);
s1 = serial('COM8');
fopen(s1);
fwrite(s1,107);%Envía en código ASCII
clear s1
    case 1000
delete (instrfind);
s1 = serial('COM8');
fopen(s1);
fwrite(s1,108);%Envía en código ASCII
clear s1
end
elseif(b==1)
switch m
    case 20
delete (instrfind);
s1 = serial('COM8');
fopen(s1);
```



```
fwrite(s1,97);%Envía en código ASCII
clear s1
case 50
delete (instrfind);
s1 = serial('COM8');
fopen(s1);
fwrite(s1,98);%Envía en código ASCII
clear s1
case 100
delete (instrfind);
s1 = serial('COM8');
fopen(s1);
fwrite(s1,99);%Envía en código ASCII
clear s1
case 200
delete (instrfind);
s1 = serial('COM8');
fopen(s1);
fwrite(s1,100);%Envía en código ASCII
clear s1
case 500
delete (instrfind);
s1 = serial('COM8');
fopen(s1);
fwrite(s1,101);%Envía en código ASCII
clear s1
case 1000
delete (instrfind);
s1 = serial('COM8');
fopen(s1);
fwrite(s1,102);%Envía en código ASCII
clear s1
end
```



```
end

% --- Executes on button press in stop.
function stop_Callback(hObject, eventdata, handles)

% hObject handle to stop (see GCBO)

% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB

% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)

delete(instrfind);

    s1 = serial('COM8');

    fopen(s1);

    fwrite(s1,1,112);

    fclose(s1);

delete(s1)

clear s1

disp('STOP')

delete(instrfind);

% --- Executes on button press in rev.
function rev_Callback(hObject, eventdata, handles)

% hObject handle to rev (see GCBO)

% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB

% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)

b=1;

set(handles.edit8,'string',b);

function lononf_Callback(hObject, eventdata, handles)

% hObject handle to lononf (see GCBO)

% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB

% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject,'String') returns contents of lononf as text

% str2double(get(hObject,'String')) returns contents of lononf as a double

% --- Executes during object creation, after setting all properties.

function lononf_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)

% hObject handle to lononf (see GCBO)

% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB

% handles empty - handles not created until after all CreateFcns called
```



```
% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
%   See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'), get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end

% --- Executes on button press in calculot.
function calculot_Callback(hObject, eventdata, handles)

% hObject   handle to calculot (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles   structure with handles and user data (see GUIDATA)

global OI;
global OF;
global fact;

fact=str2num(get(handles.factor,'String'));
OI=str2num(get(handles.longincal,'String'))
OF=str2num(get(handles.lononf,'String'))

p=fact/60.0
tic=(OF-OI)/p;
set(handles.tim,'String',tic);

function tim_Callback(hObject, eventdata, handles)

% hObject   handle to tim (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles   structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject,'String') returns contents of tim as text
%   str2double(get(hObject,'String')) returns contents of tim as a double
% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function tim_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)

% hObject   handle to tim (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles   empty - handles not created until after all CreateFcns called

% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
%   See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'), get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
```





```
set(hObject,'BackgroundColor','white');
end
function factor_Callback(hObject, eventdata, handles)
% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function factor_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to factor (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns called

% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
% See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'), get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end
function longini_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to longini (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)
% Hints: get(hObject,'String') returns contents of longini as text
% str2double(get(hObject,'String')) returns contents of longini as a double
% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function longini_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to longini (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns called

% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
% See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'), get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end
function gdr_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to gdr (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
```



```
% handles  structure with handles and user data (see GUIDATA)
% Hints: get(hObject,'String') returns contents of gdr as text
%      str2double(get(hObject,'String')) returns contents of gdr as a double
% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function gdr_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject  handle to gdr (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles  empty - handles not created until after all CreateFcns called

% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
%      See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'), get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end
% --- Executes on button press in guarda.
function guarda_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject  handle to guarda (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles  structure with handles and user data (see GUIDATA)
global v;
%*****
archivo=sscanf(get(handles.gdr,'String'), '%s')
fid=fopen(archivo,'w');
%*****
M1=length(v)
for d=1:M1;
fprintf(fid,'%f\t\n',v(d));
end
fclose(fid);
    type (archivo);

%*****
function edit8_Callback(hObject, eventdata, handles)
```



```
% hObject handle to edit8 (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject,'String') returns contents of edit8 as text
% str2double(get(hObject,'String')) returns contents of edit8 as a double
% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function edit8_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to edit8 (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles empty - handles not created until after all CreateFcns called

% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
% See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'), get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end

% CONTROL DEL MOTOR MONOCROMADOR
function pushbutton11_Callback(hObject, eventdata, handles)
m1=str2double(get(handles.edit9,'string'));
b1=str2double(get(handles.edit10,'string'));

delete(instrfind);

clc; disp('BEGIN')

s1 = serial('COM8');

instrfind

set(s1,'BaudRate',9600);
set(s1,'DataBits',8);
set(s1,'Parity','none');
set(s1,'StopBits',1);
set(s1,'FlowControl','none');

fopen(s1);

instrfind

%para leer datos
```



```
if (m1>b1)
    delete (instrfind);
s1 = serial('COM8');
fopen(s1);
tic
while 1
fwrite(s1,102);%Envía en código ASCII
fprintf('%d\n',m1);
m1=m1-1;
pause(0.06);
if (m1==b1)
    fwrite(s1,112);
    fclose(s1);
    toc
    break
end
end
elseif(m1<b1)
    delete (instrfind);
s1 = serial('COM8');
fopen(s1);
tic
while 1
fwrite(s1,108);%Envía en código ASCII
fprintf('%d\n',m1);
m1=m1+1;
pause(0.06);
if (m1==b1)
    fwrite(s1,112);
    fclose(s1);
    toc
    break
end
end
```



```
end

end

function edit9_Callback(hObject, eventdata, handles)

% hObject handle to edit1 (see GCBO)

% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB

% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject,'String') returns contents of edit1 as text

% str2double(get(hObject,'String')) returns contents of edit1 as a double

% --- Executes during object creation, after setting all properties.

function edit9_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)

% hObject handle to edit1 (see GCBO)

% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB

% handles empty - handles not created until after all CreateFcns called

% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.

% See ISPC and COMPUTER.

if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'), get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))

    set(hObject,'BackgroundColor','white');

end

function edit10_Callback(hObject, eventdata, handles)

% hObject handle to edit2 (see GCBO)

% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB

% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject,'String') returns contents of edit2 as text

% str2double(get(hObject,'String')) returns contents of edit2 as a double

% --- Executes during object creation, after setting all properties.

function edit10_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)

% hObject handle to edit2 (see GCBO)

% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB

% handles empty - handles not created until after all CreateFcns called

% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.

% See ISPC and COMPUTER.

if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'), get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))

    set(hObject,'BackgroundColor','white');
```



```
end

function edit12_Callback(hObject, eventdata, handles)
% --- Executes during object creation, after setting all properties.

function edit12_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to edit3 (see GCBO) % eventdata reserved - to be defined in a future version % of MATLAB % handles empty -
handles not created until after all CreateFcns called

% Hint: edit controls usually have a white background on Windows. % See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'), get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end

% --- Executes on button press in pushbutton2.

function pushbutton10_Callback(hObject, eventdata, handles)
m1=str2double(get(handles.edit9,'string'));
b1=str2double(get(handles.edit10,'string'));
s=m1-b1;
j=abs(s*0.06);
set(handles.edit12,'string',j)
```



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00113

Matricula: 2123808124

CAMBIOS EN LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA DE LA MOLÉCULA NADH EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE RATA POR LA IRRADIACIÓN CON LÁSER IR DE BAJA INTENSIDAD.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 20 del mes de julio del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JOSE RAFAEL GODINEZ FERNANDEZ  
DR. FRANCISCO JAVIER RENERO CARRILLO  
DR. RUBEN RAMOS GARCIA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS (INGENIERIA BIOMEDICA)

DE: J TRINY HERNANDEZ JAIME

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



J TRINY HERNANDEZ JAIME  
ALUMNO

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISSASI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. JOSE GILBERTO CORDOBA HERRERA

PRESIDENTE

DR. JOSE RAFAEL GODINEZ FERNANDEZ

VOCAL

DR. FRANCISCO JAVIER RENERO CARRILLO

SECRETARIO

DR. RUBEN RAMOS GARCIA