

Carla Romero Sansano

Microscopía Holográfica Interferencial como herramienta de investigación en Biotecnología

Tutores:

Prof. Eduardo Fernández Jover

Prof. Antonio Fimia Gil

Instituto de Bioingeniería

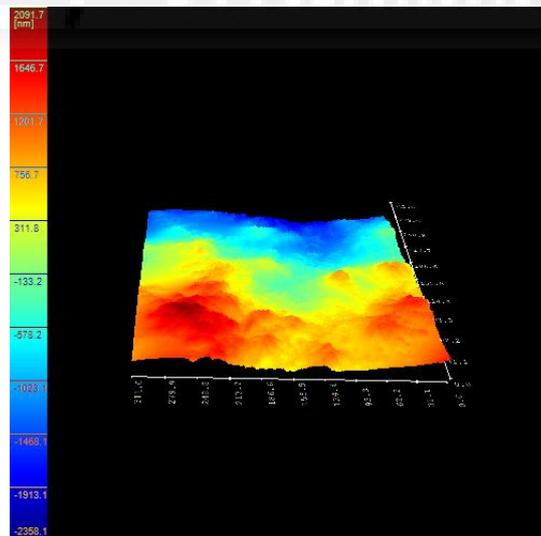
Departamento de Neuroprótesis y Rehabilitación Visual

Departamento de Ciencia de Materiales, Óptica y tecnología Electrónica

Grado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Experimentales

Curso 2015-2016



CONTENIDO

Resumen.....	pág. 3
Introducción.....	pág. 4
• Microscopía Holográfica.....	pág. 6
Antecedentes y objetivos.....	pág. 8
Material y métodos.....	pág. 9
1. Tipo de células.....	pág. 9
2. Microscopio.....	pág. 11
3. Láseres.....	pág. 11
4. Experiencias: Descripción de metodología y gráficas.....	pág. 11
Resultados.....	pág. 27
Discusión.....	pág. 34
Conclusiones y proyección futura.....	pág. 36
Bibliografía.....	pág. 37



Resumen

En este trabajo presentamos los resultados experimentales correspondientes al análisis de los procesos de interacción luz-célula con longitudes de onda 405 y 785 nm y baja intensidad. Las medidas se han realizado en tiempo real empleando el Microscopio Holográfico Digital e irradiando células del tipo fibroblastos, células de glioma y células de neuroblastoma. A partir de los resultados se puede deducir que el empleo de láseres de baja potencia provoca la aparición de un conjunto de procesos de dispersión y absorción de la radiación láser que enmascaran los resultados, considerando nuestras condiciones de trabajo. Trabajos posteriores serán necesarios para el análisis de tamaños diferentes de irradiación y de los tiempos de irradiación necesarios para el desarrollo de técnicas de medida 3D de los procesos Luz-célula en tiempo real. Demostramos en este trabajo las posibilidades de la Microscopía Holográfica Digital en la Biotecnología.

Palabras clave: Láser, células, microscopía, 3D.

In this project we present the experimental results corresponding to the analysis of the interaction light-cell processes with wavelengths of 405 and 785 nm and low density. The measurements were performed in real time using Digital Holographic Microscope and irradiating fibroblasts, glioma and neuroblastoma cells. From results it can be deduced that the use of low power lasers causes the appearance of a set of scattering and absorption of laser radiation processes that mask the results, considering our working conditions. Further work will be needed for the analysis of different sizes irradiation and the irradiation times required for the development of 3D measurement techniques of light-cell processes in real time. We show in this paper the possibilities of Digital Holographic Microscopy in Biotechnology.

Keywords: Laser, cells, microscopy, 3D.

Introducción

La Biotecnología, que es de carácter multidisciplinar, se centra en el estudio de los sistemas biológicos y los seres vivos o sus derivados como herramientas para aplicaciones de carácter médico, industrial, agrícola y aplicaciones en ambientes marinos y acuáticos. Un área relacionada con la Biotecnología es la fotobiología, que se ocupa de la interacción de la luz con los organismos vivos, tanto células, como tejidos, como especímenes vivos *in vivo*¹. Los tamaños de la materia viva son muy variados, abarcan desde nanómetros hasta escalas macroscópicas. Las interacciones pueden inducir efectos químicos, mecánicos, térmicos, físicos y la combinación de todos ellos. Estos procesos inducidos por la luz, generalmente se inician por una absorción lineal de la misma.

Las células presentan tamaños de dimensiones submicrométricas hasta más de 20 micras. Por lo tanto, pueden ser más pequeñas que la longitud de onda de la luz o mucho mayores. La interacción con la luz puede provocar la refracción, la reflexión, la absorción y la dispersión. La refracción se produce como consecuencia del cambio de ángulo de propagación de la luz cuando esta pasa de un medio a otro. El índice de refracción determina la fase y la velocidad de propagación de la luz. La reflexión se produce cuando la luz refleja en la superficie del material biológico sin llegar a penetrar en dicho material. Se debe al cambio en el índice de refracción del aire y el material biológico. La absorción de la luz es debida a varios constituyentes intracelulares y extracelulares, y se produce como consecuencia de la transición de un estado de baja energía (estado fundamental) a un estado de alta energía o estado excitado de una molécula. La dispersión se produce debido a la pérdida de direccionalidad de la luz y a la propagación del punto del haz de luz. Este fenómeno es el que determina la distribución de la intensidad de la luz en la muestra biológica. En la dispersión de Rayleigh, los componentes subcelulares como los orgánulos, pueden ser un centro de dispersión. Este tipo de dispersión depende de tres parámetros:

- El tamaño de los centros de dispersión (células u orgánulos)
- La diferencia en los índices de refracción entre un centro de dispersión y el medio que le rodea
- La longitud de onda de la luz

La dispersión de Rayleigh es inversamente proporcional a la cuarta potencia de la longitud de onda de la luz. Por lo tanto una luz azul (de longitud de onda más corta) será más dispersada que una luz roja. Al tomar solo la dispersión como el mecanismo de pérdida óptica, se deduce que cuanto más larga sea la longitud de onda, la luz penetrará con mayor profundidad en una muestra biológica.

Tanto la absorción como la dispersión que se producen a partir de un material biológico como las células son dependientes de la longitud de onda de la luz empleada y se dan más en la región azul del espectro electromagnético que en la roja².

Tras la absorción de luz, las células exhiben una amplia variedad de procesos fotoquímicos y fotofísicos. Algunos constituyentes celulares emiten fluorescencia cuando son excitados directamente o mediante la transferencia de energía de otro constituyente. Esta fluorescencia se llama *fluorescencia endógena* o *autofluorescencia*, y el constituyente que emite se llama *fluoróforo endógeno* (o *fluorocromo*). La fluorescencia³ se origina a partir de la transición de un estado singlete excitado a un modo vibracional del estado fundamental y tiene tiempos de vida media entre 1-10 nanosegundos.

Otros procesos a los que conduce la interacción de la luz con las células, aparte de la autofluorescencia que se ha comentado anteriormente y de los procesos fotoquímicos, son los efectos térmicos, los efectos de fotoablación, la ablación inducida por plasma y la fotodisrupción¹.

-Los efectos térmicos son el resultado de la conversión de la energía de la luz que absorbe el material biológico en calor. Pueden ser producidos por lámparas y láseres pulsados y de onda continua (CW). Son no específicos, lo que quiere decir que estos efectos no son dependientes de la longitud de onda. Dos parámetros importantes a tener en cuenta son: el valor máximo de temperatura que las células pueden alcanzar y la propagación del calor en las células.

-La fotoablación es un proceso que se produce debido a la acción de un pulso láser ultravioleta (UV) intenso que descompone fotoquímicamente varios componentes celulares y extracelulares. La ablación producida se encuentra muy localizada en el punto del haz de luz, fuera del cual no se produce. Las densidades de potencia son de 10^7 - 10^{10} W/cm².

-La ablación inducida por plasma se produce como consecuencia de exponer el material biológico a una densidad de potencia de 10^{11} W/cm² produciéndose un campo eléctrico de 10^7 V/cm asociado a la luz. Dicho campo eléctrico provoca la rotura dieléctrica en la materia y genera una alta densidad electrónica (plasma). Este plasma de alta densidad absorbe fuertemente en el ultravioleta, visible e infrarrojo provocando la ablación.

-La fotodisrupción ocurre al irradiar con alta intensidad la materia biológica provocando la formación de plasma. Con altas energías de plasma se rompe la estructura del material biológico por impacto mecánico. Al focalizar en el material biológico ocurre cavitación, es decir, se forman cavidades llenas de vapor o gas. La fotodisrupción no es localizada y puede propagarse en materiales biológicos o células adyacentes a la zona de rotura. Existen posibles aplicaciones de este proceso como la cirugía de cataratas o de córnea.

Microscopía holográfica

La holografía⁴ es el método de grabación y reconstrucción de un frente de onda, basado en el registro de un patrón de interferencia producido por la superposición de dos ondas coherentes, la onda objeto y la onda de referencia. El patrón de interferencia recibe el nombre de holograma. Dennis Gabor, Premio Nobel de Física en 1971, propuso el método de holografía para mejorar la resolución del microscopio electrónico. Y desde entonces, junto con el desarrollo de los ordenadores y los métodos para el procesamiento de datos digitales, se ha alcanzado una nueva etapa en la microscopía óptica. El primer microscopio holográfico digital (DHM) que genera una imagen tridimensional en tiempo real de objetos microscópicos de fase y que lleva a cabo medidas cuantitativas de sus parámetros geométricos, se ha creado en base al microscopio de interferencia holográfica. Las medidas cuantitativas que se realizan con los sistemas ópticos interferenciales, poseen una alta precisión y un bajo error relativo. En 1998 a partir del microscopio holográfico digital, se obtuvieron las primeras imágenes tridimensionales de glóbulos rojos humanos⁴. Estas metodologías holográficas permiten mejorar el estudio de los procesos biológicos.

Las células forman parte de los organismos vivos y su estudio supone una herramienta fundamental para poder entender los procesos que se dan a nivel de tejido, órgano y organismo. Durante los últimos años han aparecido un gran número de trabajos en los que se han presentado numerosas aplicaciones de la microscopía holográfica digital en el estudio de parámetros característicos celulares como el índice de refracción, espesor, tamaño y volumen, así como el estudio de mecanismos íntimos de difusión en el interior de células. La holografía es un método no destructivo para las muestras biológicas, por lo que pueden ser analizadas por otros métodos ópticos aunque se hayan observado con el microscopio holográfico digital. No ocurre lo mismo con la técnica de microscopía electrónica, que sí que es destructiva y la muestra biológica no puede ser utilizada otra vez cuando se analiza con dicha técnica⁴.

Bajo la acción de diversos efectos se pueden modificar las propiedades de las membranas celulares que producen cambios visibles por el microscopio holográfico digital. El efecto que una fuente de luz láser provoca en las células también puede ser visualizado a partir del microscopio holográfico digital mediante la reconstrucción tridimensional de la imagen en tiempo real.

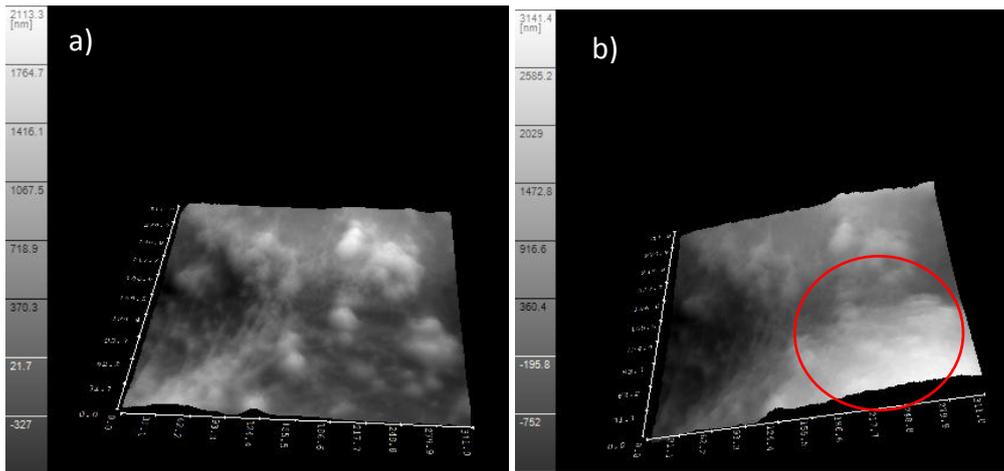


Fig. 1. Imágenes 3D de células embrionarias de hipocampo de rata (cultivo primario) obtenidas con el Microscopio Holográfico Digital. **a)** Imagen 3D de las células sin irradiación láser. **b)** Imagen 3D de las células irradiando con un láser continuo a 785 nm de longitud de onda con 1.11 miliwatios (mW) de intensidad en una zona concreta (círculo rojo).

La imagen tridimensional en tiempo real que proporciona el microscopio holográfico digital también puede visualizarse en una escala de colores distinta a la escala en blanco y negro, para poder apreciar mejor los componentes celulares de la muestra y la temperatura de la misma.

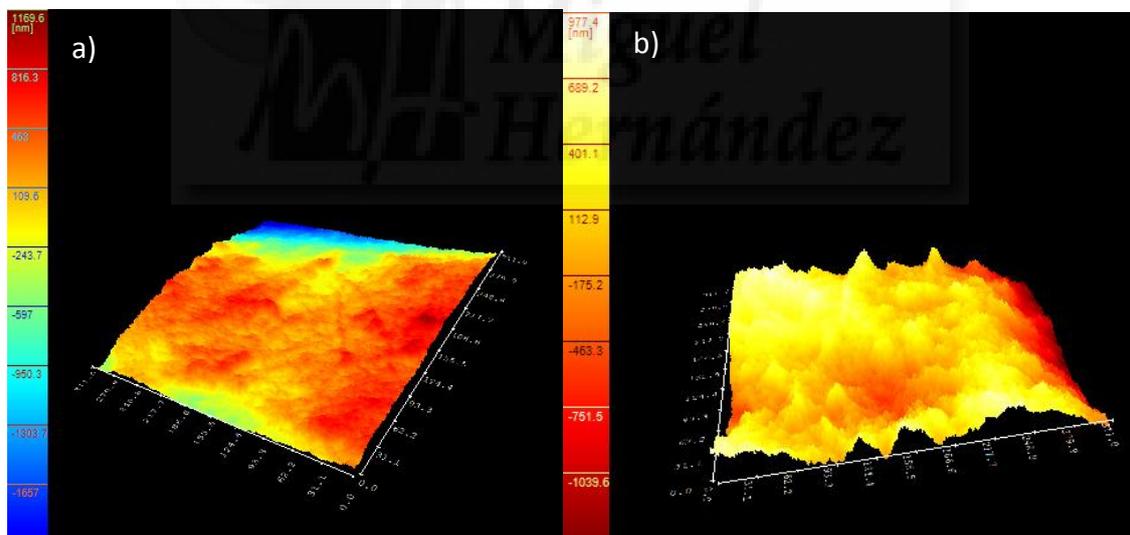


Fig. 2. Imágenes 3D de células embrionarias de hipocampo de rata (cultivo primario) obtenidas con el Microscopio Holográfico Digital. **a)** Imagen 3D de las células en escala de colores. **b)** Imagen 3D de las célula en una zona distinta de la muestra en escala infrarroja.

Con el microscopio holográfico digital se pueden realizar medidas cuantitativas de varios parámetros morfológicos de las células y se obtienen imágenes 3D que proporcionan información importante para su estudio. Es un instrumento que puede ofrecer varias posibilidades en el ámbito de la medicina, la biología y la técnica biomédica⁴.

Antecedentes y objetivos

En otros trabajos que se han realizado con anterioridad se han estudiado los valores de los índices de refracción de las células así como procesos de interacción luz-tejido que han aportado información sobre aplicaciones del láser en campos como la cirugía oftálmica. La nanocirugía, el estudio biológico y morfológico de las células y el estudio de diferentes patologías son algunos ejemplos de las aplicaciones que puede tener la microscopía holográfica digital. Gracias a la capacidad de obtener datos numéricos con información 3D a partir de una única imagen, se obtiene información de gran utilidad sobre las estructuras celulares que favorece y promueve el estudio de nuevos procesos y mecanismos fotocelulares.

En este proyecto de fin de carrera nos proponemos estudiar las posibilidades que tiene la microscopía holográfica digital. Para ello hemos tomado como campo de estudio los procesos de medida cuando irradiamos diferentes tipos de células con láseres continuos de baja potencia (405 y 785 nm). El estudio de interacción luz-célula se analiza en tiempo real. Las medidas de modificación de la longitud del camino óptico generadas al irradiar las células, en las que se producen efectos de absorción y dispersión de la luz, son estudiadas bajo condiciones de intensidad constante y variable, tiempo de irradiación constante, concentraciones celulares variables y son llevadas a cabo en zonas espaciales diferentes de la zona irradiada. Por lo tanto, varios de nuestros objetivos son los siguientes:

-Realizar un estudio cuantitativo al irradiar con láseres continuos a 405 y 785 nm de longitud de onda tres tipos de líneas celulares: fibroblastos (3T3), células de glioma (42-MG-BA) y células de neuroblastoma (SH-SY5Y).

-Cuantificar los cambios en la temperatura con el tiempo como consecuencia de irradiar la zona de trabajo con los dos láseres empleados, por la posibilidad de producir efectos térmicos.

-Medir las modificaciones que se producen en la longitud de camino óptico de la luz (LCO) cuando se aumenta la intensidad de irradiación.

-Medir las modificaciones de la longitud de camino óptico en el tiempo (cada 10 segundos hasta 300 segundos).

-Analizar el efecto de la concentración celular sobre la longitud de camino óptico comparando los resultados de la irradiación de muestras con mayor y menor concentración de células.

Finalmente, el estudio cuantificado de los efectos de la irradiación nos debe conducir a la modificación de un protocolo de actuación en los estudios fotobiológicos que se realizan a nivel celular, realizados en tiempo real y con precisión 3D espacial.

Material y métodos

1. Tipo de células

Los cultivos celulares se llevan a cabo sobre la superficie de una capa de plástico sobre la que pueden crecer las células. Sobre dicha capa, se añaden componentes de la matriz extracelular, aminoácidos, vitaminas, sales minerales, factores de crecimiento, etc., para que se desarrollen las células. Los distintos tipos celulares poseen necesidades nutritivas diferentes, por lo que los elementos del medio de cultivo varían dependiendo del tipo celular^{5,6}.

Las células empleadas para la realización de los experimentos pertenecen a las líneas celulares *3T3*^{7,8}, *42-MG-BA*⁹ y *SH-SY5Y*^{10,11}. Se utilizaron placas de 12 pocillos de los cuales se emplearon 6, en los que se colocaron cubreobjetos que habían sido esterilizados previamente con etanol 99% e irradiados con luz ultravioleta. Las células de las tres líneas celulares que se emplean en este trabajo estaban sembradas en placas de Petri de 100 mm de diámetro y 78 cm² de área e incubadas a 37 °C con un 5% de oxígeno y un 5% de CO₂. Una vez atemperados los medios de cultivo para cada tipo de células (ver tabla 1), se procedió a realizar un pase o repique en monocapa. Antes de finalizar el pase de células, mediante el contador automático ADAM (Automatic Cell counter) de Digital Bio, se analizó el número de células y la viabilidad celular en cada caso y para cada tipo celular. Mediante estos datos se sembraron los mililitros correspondientes para conseguir concentraciones celulares de 100.000, 40.000 y 20.000 células por pocillo, según el procedimiento experimental a realizar y el tiempo que pasa hasta que se lleva a cabo la experiencia con el microscopio holográfico digital.

Medio de cultivo	Composición
Medio para fibroblastos (<i>3T3</i>)	90% DMEM (Gibco, Life Technologies), 10% FBS (Biowest), 1:100 Pen-Strep (Gibco, Life Technologies)
Medio para gliales (<i>42-MG-BA</i>)	80% MEM (Earle's) (Gibco, Life Technologies)+RPMI (Gibco, Life Technologies), 20% FBS, 1:100 Pen-Strep
Medio de neuroblastoma (<i>SH-SY5Y</i>)	90% DMEM+Ham's (F ₁₂) (Gibco, Life Technologies), 10% FBS, 1:100 Pen-Strep

Tabla 1. Medios de cultivo y composición. DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium; FBS: Fetal Bovine Serum; Pen-Strep: Penicilina-Estreptomicina (antibióticos); MEM: Minimum Essential Medium; RPMI: Roswell Park Memorial Institute (medio nombrado así por el sitio donde se desarrolló); Ham's (F₁₂): mezcla de nutrientes.

Los fibroblastos utilizados en los experimentos con el Microscopio Holográfico Digital pertenecen a la línea celular *3T3* de la colección de líneas celulares DSMZ (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cells Cultures) de referencia ACC 173, establecida a partir de embriones de ratón albino suizo en 1962.

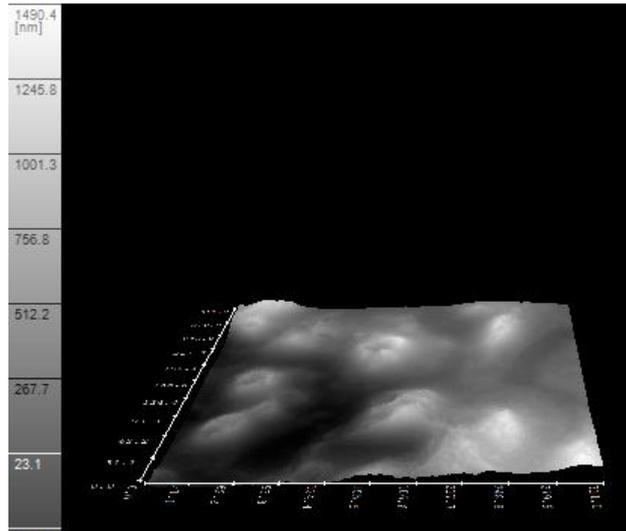


Fig. 3. Imagen 3D de fibroblastos (línea celular 3T3) tomada con el Microscopio Holográfico Digital.

Las células empleadas de la línea celular 42-MG-BA de la colección de líneas celulares DSMZ de referencia ACC 431, provienen del lóbulo temporal de un hombre con glioblastoma multiforme (1990).

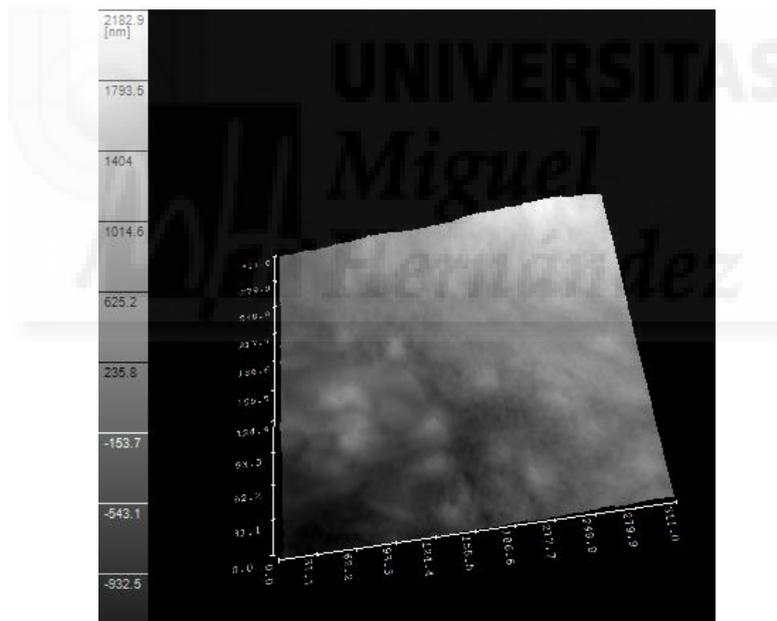


Fig. 4. Imagen tridimensional de células de glioma (línea celular 42-MG-BA) tomada con el Microscopio Holográfico Digital.

Las células que se han empleado de la línea celular SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™) provienen de una sublínea de la línea celular de neuroblastoma SK-N-SH que fue establecida en 1970.

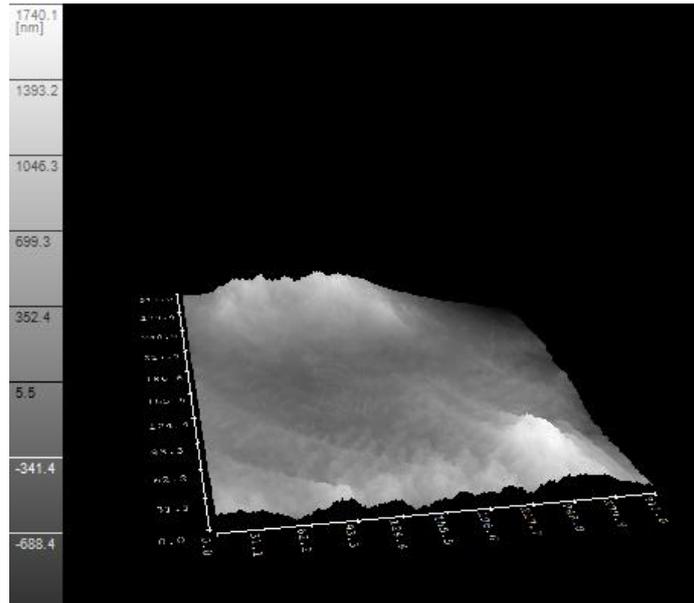


Fig. 5. Imagen tridimensional de células de neuroblastoma (línea celular *SH-SY5Y*) tomada con el Microscopio Holográfico Digital.

2. Microscopio

El instrumento empleado para llevar a cabo el estudio de la interacción de la luz con las células, es el Microscopio Holográfico Digital (DHM) Lyncée Tec^{DHM} (Reflection DHM[®]). Permite la observación tridimensional no invasiva, a tiempo real de las células y con una resolución nanométrica¹². Se utiliza una longitud de onda de medida de 685 nm y el objetivo LEICA 20x de apertura numérica 0,4.

3. Láseres

Los láseres empleados para la incidencia de luz en las células son láseres continuos con los que se han utilizado distintas longitudes de onda de irradiación: 405 nm (azul) y 785 nm (rojo). Para trabajar a 405 nm se utiliza el láser LINOS con un rango 0-100 mW de intensidad, mientras que a 785 nm se trabaja con el láser QIOPTIQ con un rango de 0-105 mW de intensidad.

4. Experiencias: Descripción de metodología y gráficas

Para llevar a cabo las experiencias, lo primero que se hace es calibrar el sistema de acoplamiento del láser al Microscopio Holográfico Digital (DHM). A continuación se muestra un esquema del sistema de acoplamiento:

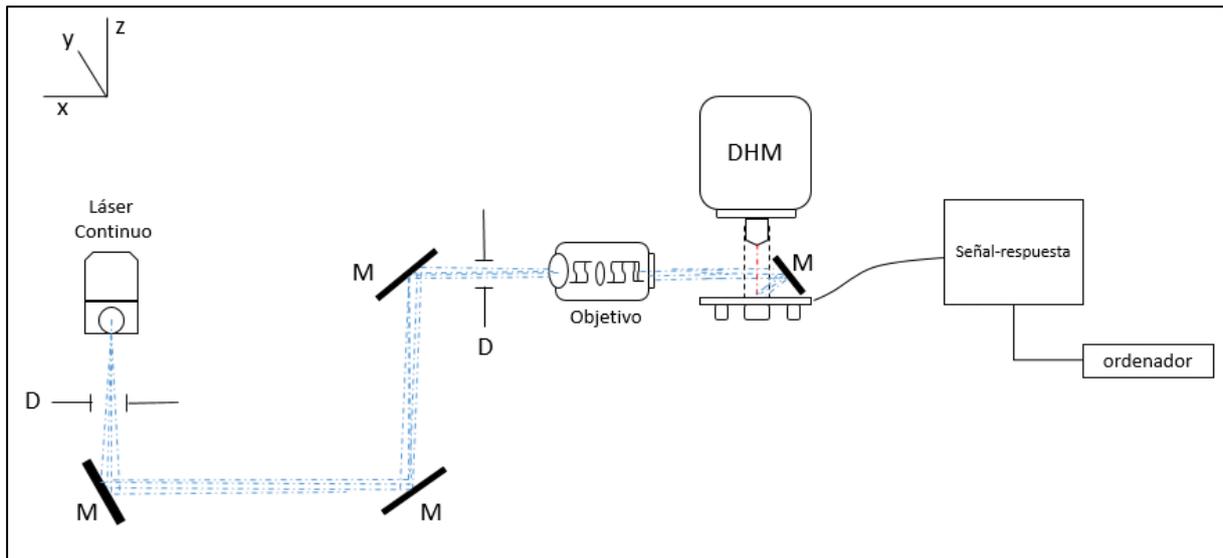


Fig. 6. **D**: diafragma; **M**: espejo; **DHM**: Microscopio Holográfico Digital. Dibujo esquemático del montaje. Se emplea el objetivo OPTEM 20x para la irradiación y el objetivo LEICA 20x del Microscopio Holográfico Digital.

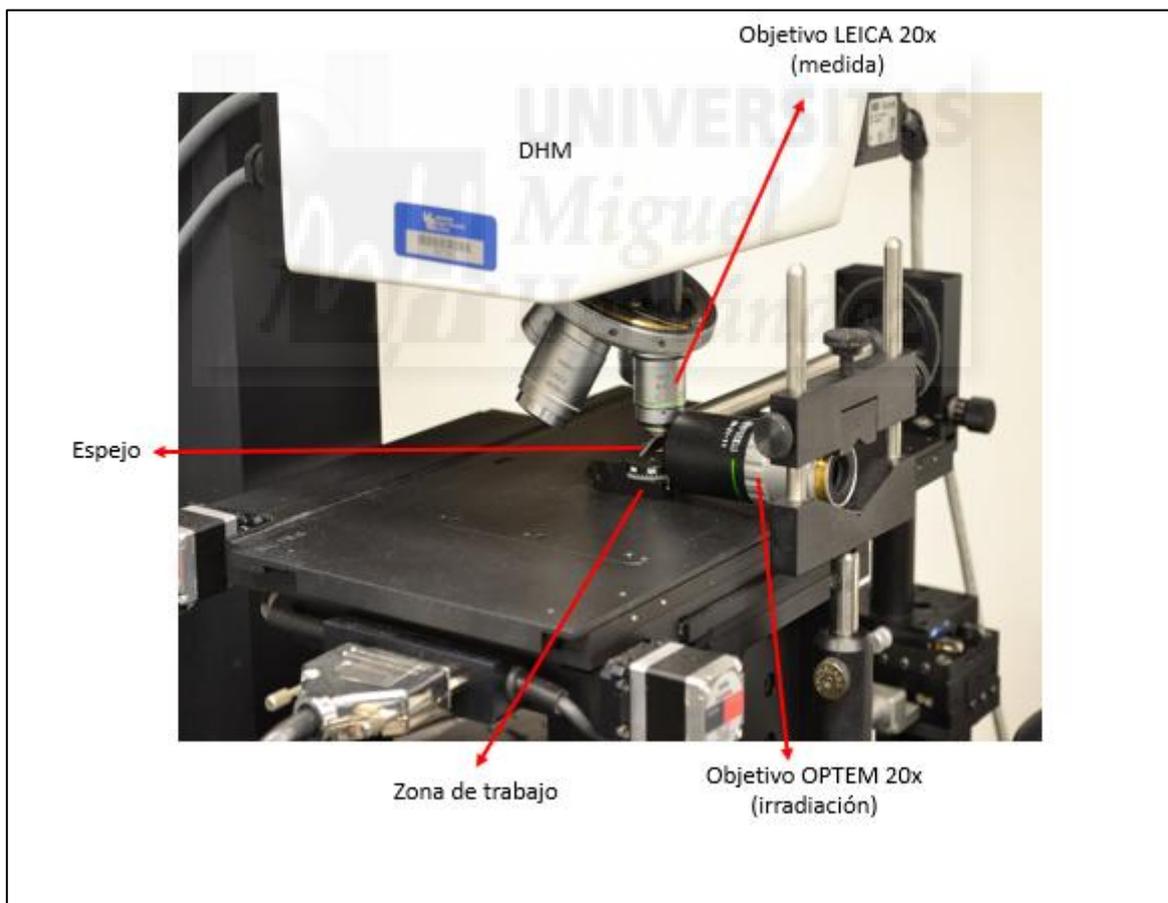


Fig. 7. **DHM**: Microscopio Holográfico Digital. Parte del montaje en el que se observan varios de los componentes: Se emplea el objetivo OPTEM 20x para la irradiación y el objetivo LEICA 20x del Microscopio Holográfico Digital para la medición

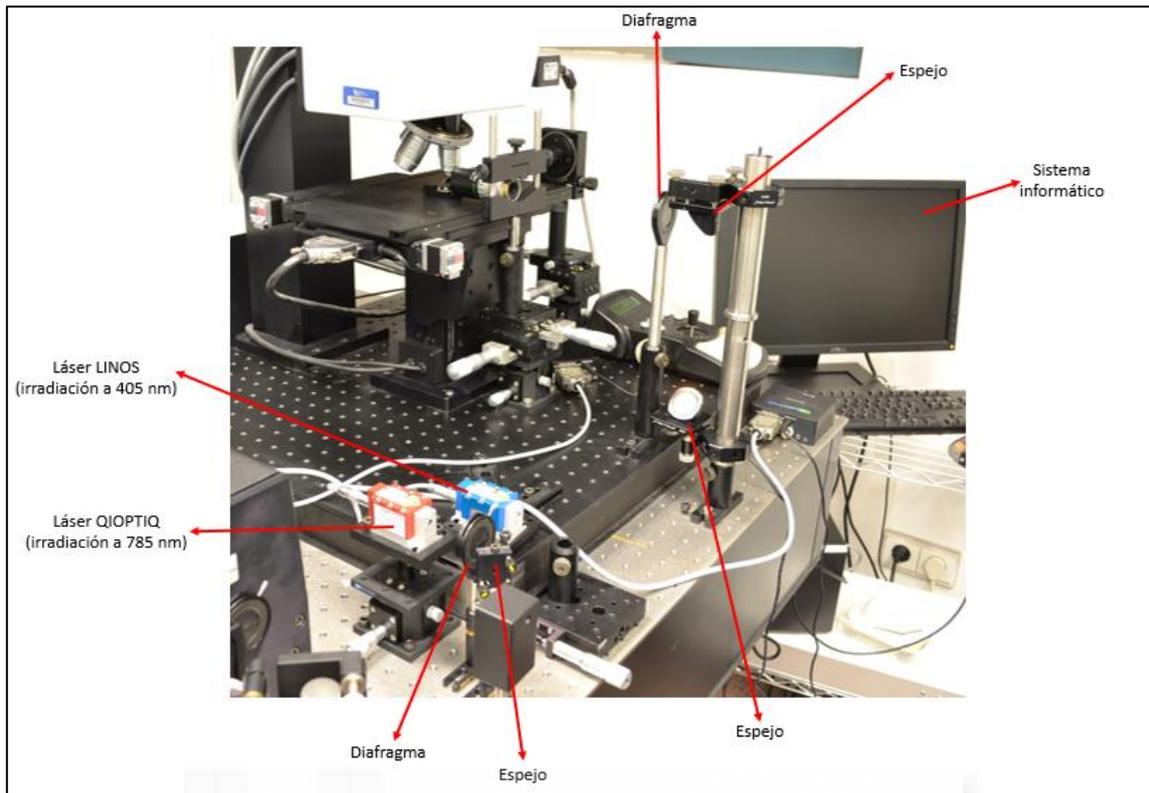


Fig. 8. Montaje con los componentes que lo conforman. Aparecen los dos láseres continuos (LINOS y QIOPTIQ) pero se emplea uno en cada ocasión. La parte superior izquierda se ha obviado debido a que aparecen los componentes con sus nombres en la Fig. 7. En el sistema informático se analizan los datos y se visualizan las imágenes 3D de las muestras biológicas.

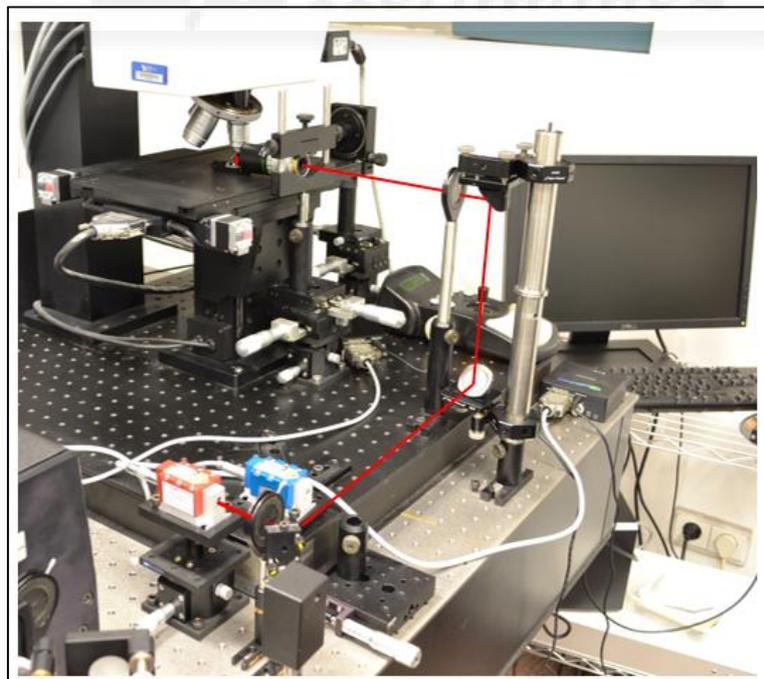


Fig. 9. Montaje en el que se indica con una línea roja el recorrido del haz del láser hasta la zona de trabajo en la que se encuentra la muestra biológica.

Una vez calibrado el sistema, se coloca la muestra biológica (cubreobjetos de 18x18 mm de espesor sobre el que han crecido las células) y se deja secar el medio de cultivo residual durante unos minutos. A continuación, se establecen las coordenadas de trabajo, se enfoca la imagen para poder observar las células y el haz de luz incidente, se toma una zona con una distancia determinada en la imagen de fase y se mide el parámetro longitud de camino óptico (LCO) en nm. El camino óptico [L] que atraviesa la luz cuando recorre una estructura biológica es igual al producto del índice de refracción (n) por el espesor o distancia geométrica recorrida por la luz (d).

$$[L] = n \cdot d \quad (1)$$

Así, gracias al sistema interferencial óptico se puede observar en tiempo real la variación del camino óptico que recorre la luz al atravesar la muestra biológica. También se puede obtener la imagen tridimensional de la muestra para visualizar los cambios morfológicos de la misma.

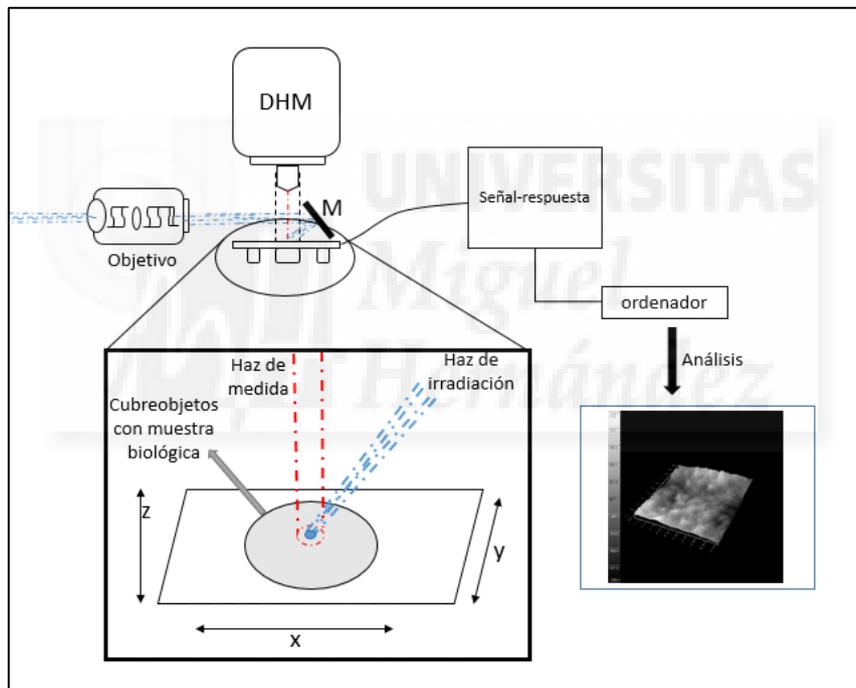


Fig. 10. **M**: espejo; **DHM**: Microscopio Holográfico Digital. Esquema ilustrativo de la zona de trabajo con los componentes asociados. En el ordenador se puede analizar la imagen tridimensional en tiempo real de la muestra biológica.

Uno de los primeros procedimientos que se llevó a cabo consistió en medir la temperatura en la zona de trabajo donde se irradiaba con los láseres a 405 y 785 nm. De esta forma, se puede determinar si aumenta la temperatura lo suficiente como para producir algún efecto térmico en las muestras biológicas. El tiempo de irradiación empleando el láser continuo a 405 nm fue de 5 minutos y a 785 nm el tiempo de irradiación fue de 4 minutos. En el primer caso, a 405 nm, se aumentó la intensidad en un rango de 0,097 a 0,378 mW. Mientras que a 785 nm se aumentó la intensidad hasta

9,888 mW comenzando con 1.110 mW. La temperatura de partida a tiempo 0 al irradiar tanto a 405 como a 785 nm fue de 24 °C. Irradiando a 405 nm la variación de temperatura que se produjo fue de 0,2 °C, mientras que a 785 nm se produjo un incremento de temperatura de 0,7 °C. Al irradiar con esta última longitud de onda se nota una variación lineal entre la intensidad de irradiación y la temperatura.

Otra de las experiencias llevadas a cabo fue la de ir aumentando la intensidad del láser tanto a 405 como a 785 nm, e ir midiendo en una zona con una distancia de alrededor 223-229 μm , la longitud de camino óptico (LCO) antes y después de irradiar los fibroblastos, las células de glioma y las células de neuroblastoma. Se tomó una distancia de aproximadamente 223-229 μm debido a que al escoger una distancia de pocas micras (10 μm) apenas se apreciaban cambios en LCO.

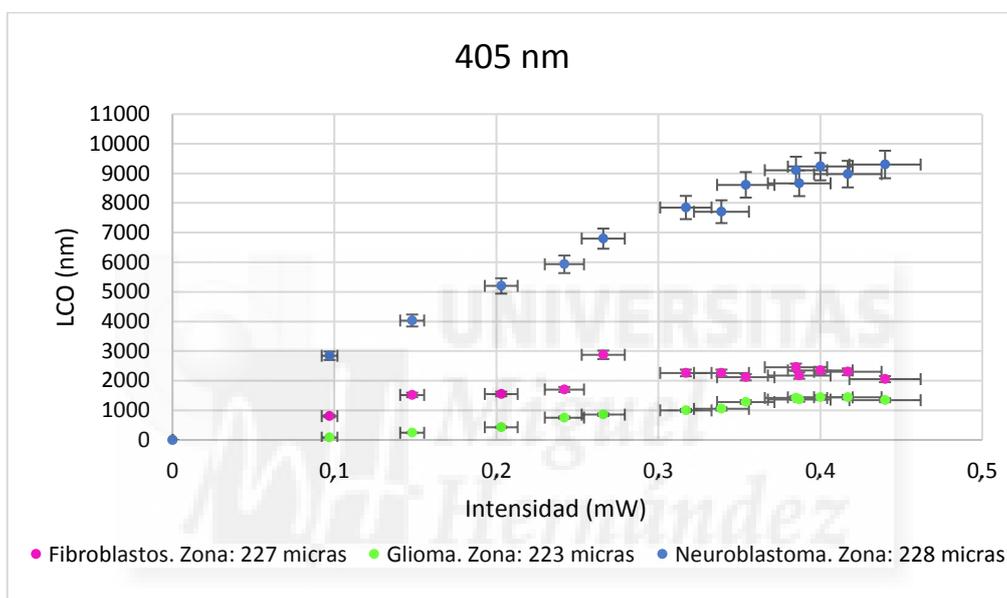


Fig. 11. Gráfica que representa la longitud de camino óptico en nanómetros (nm) frente la intensidad en miliwatios (mW) con una longitud de onda de irradiación de 405 nm. La intensidad se aumentó hasta 0,44 mW. Las células de glioma (42-MG-BA) y las células de neuroblastoma (SH-SY5Y), aparecen en esta gráfica y en el resto de gráficas del trabajo, con el nombre simplificado de glioma y neuroblastoma respectivamente. Los fibroblastos (3T3) se representan en color violeta, las células de glioma en verde y las células de neuroblastoma en azul. Cada valor de LCO viene representado con las barras de error del 5%.

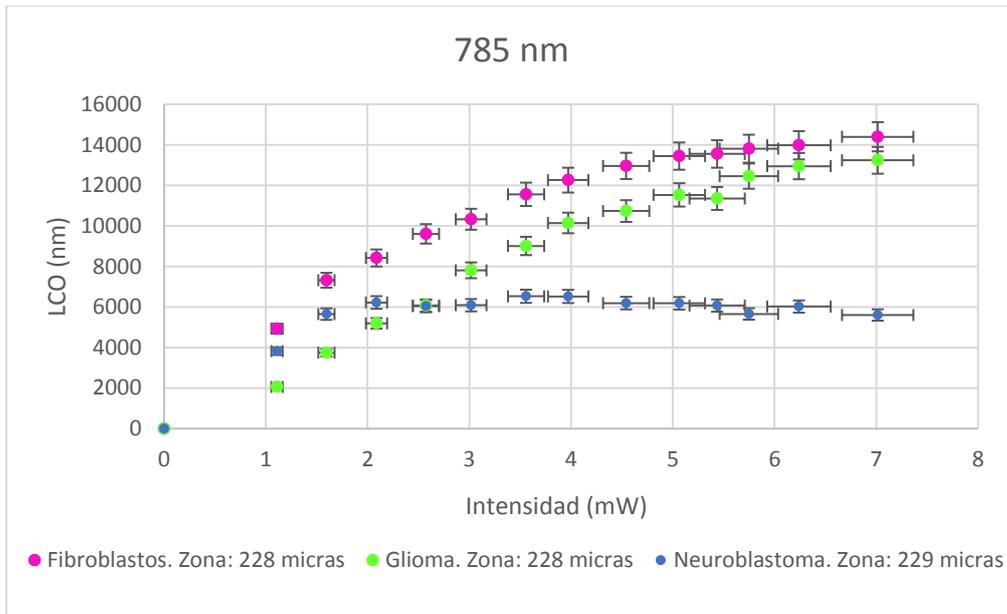


Fig. 12. Gráfica que representa la longitud de camino óptico en nanómetros frente la intensidad en miliwatios (mW) con una longitud de onda de irradiación de 405 nm. Se aumentó la intensidad hasta 7,014 mW. Los fibroblastos se representan en color violeta, las células de glioma en verde y las células de neuroblastoma en azul. Cada valor de LCO viene representado con las barras de error del 5%.

A la hora de realizar la irradiación sobre las células con cada uno de los láseres continuos a 405 y 785 nm, uno de los procedimientos experimentales consistió en ir anotando los datos numéricos de longitud de camino óptico (LCO) en nanómetros (nm) aportados por el DHM (una vez establecidos los ejes de coordenadas) cada 10 segundos alcanzando los 300 segundos. Se tomaron los datos de distintas zonas de la muestra biológica, a diferentes distancias de la zona irradiada. Se emplearon 3 cubreobjetos, uno por cada tipo celular: fibroblastos (3T3), células de glioma (42-MG-BA) y células de neuroblastoma (SH-SY5Y). Las células se sembraron sobre los cubreobjetos con una concentración celular de 100.000 células por pocillo. En cada pocillo se colocó 1 mL del medio de cultivo correspondiente, según el tipo celular sembrado. La intensidad de luz emitida para irradiar las muestras a 405 nm de longitud de onda fue de 0,097 mW, mientras que a 785 nm se irradió con una intensidad de 1,11 mW. Esta diferencia de intensidades se debe a que los procesos asociados a 405 nm son de absorción mientras que a 785 nm se producen posibles efectos térmicos.

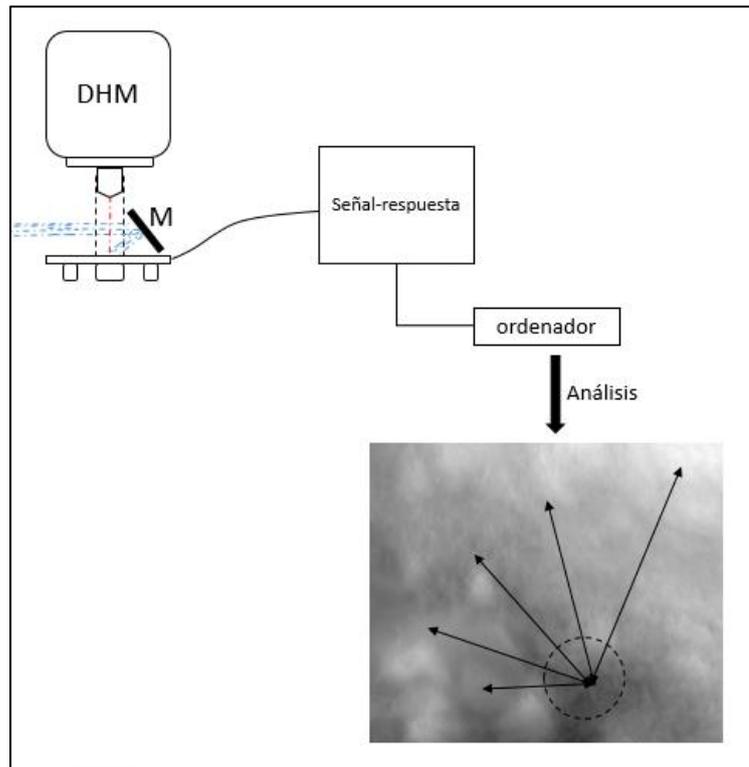


Fig. 13. **M**: espejo; **DHM**: Microscopio Holográfico Digital. Esquema que muestra cómo se toman las medidas en el ordenador de cada zona con diferentes distancias, a partir de la imagen proporcionada por el microscopio. En la imagen inferior las flechas representan las zonas medidas, cada una de las cuales con su correspondiente distancia, y el círculo punteado hace referencia a la zona de irradiación a 405 o 785 nm en cada caso.

Como se ha comentado anteriormente, se midieron varias zonas (en concreto 5) a diferentes distancias de la zona irradiada para cada tipo celular. Pero en las representaciones de la diferencia de LCO en valor absoluto (LCO menos LCO a tiempo cero) frente a tiempo se va a tener en cuenta una única zona de aproximadamente 130-134 micras de distancia, donde se perciben los cambios de LCO entre las dos longitudes de onda de irradiación (405 y 785 nm).

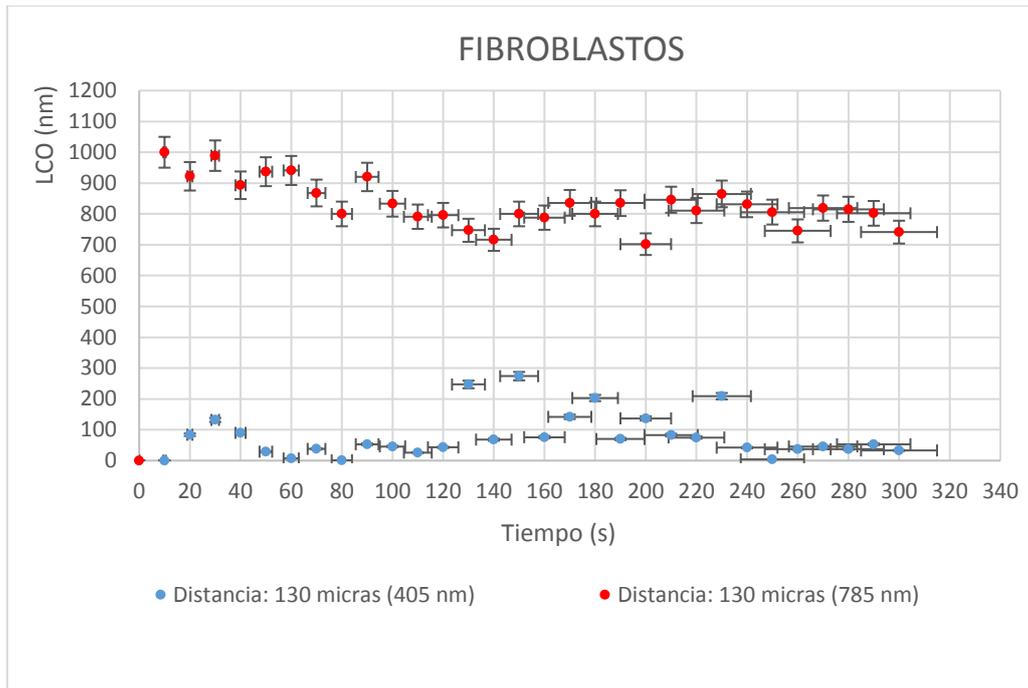


Fig. 14. Representación gráfica de la longitud de camino óptico en nanómetros frente el tiempo en segundos (s) con las longitudes de onda de irradiación de 405 y 785 nm en fibroblastos. En color azul aparecen los valores de LCO para una zona determinada de 130 micras (μm) irradiada a 405 nm. Mientras que en color rojo aparecen los valores de LCO para otra zona de 130 μm irradiada a 785 nm. Cada valor de LCO viene representado con las barras de error del 5%.

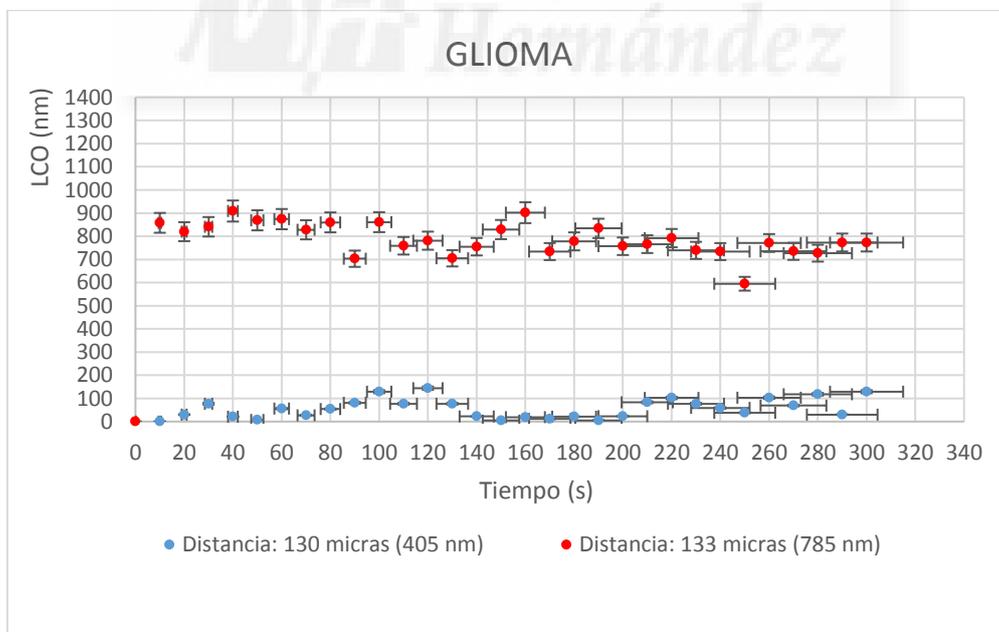


Fig. 15. Representación gráfica de la longitud de camino óptico en nanómetros frente el tiempo en segundos (s) a 405 y 785 nm en células de glioma. En color azul aparecen los valores de LCO para una zona determinada de 130 micras (μm) irradiada a 405 nm. Mientras que en color rojo aparecen los valores de LCO para otra zona de 133 μm irradiada a 785 nm. Cada valor de LCO viene representado con las barras de error del 5%.

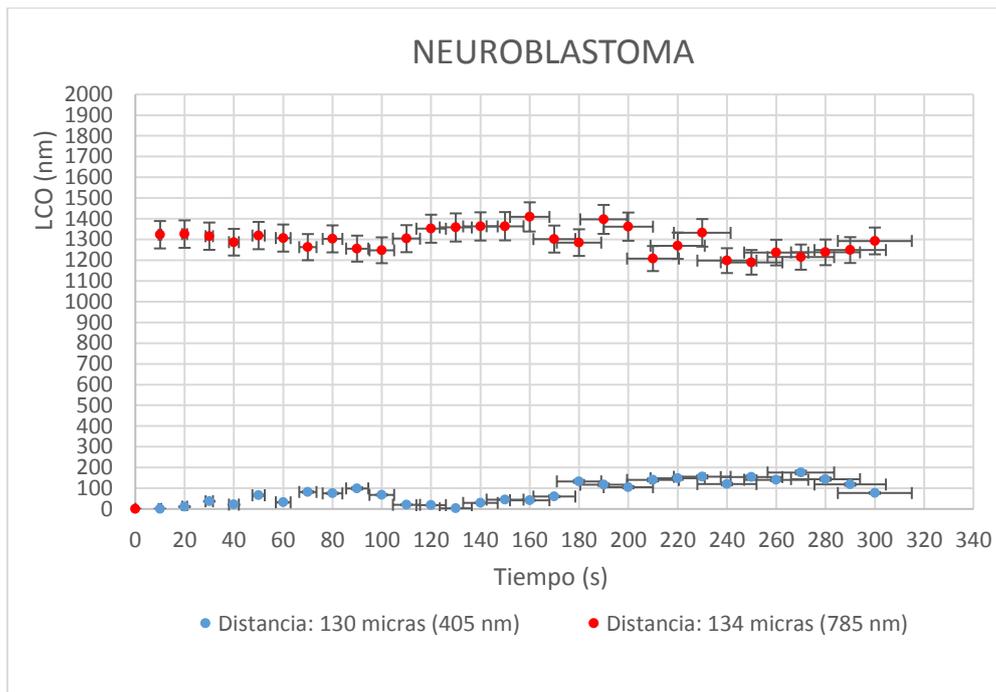


Fig. 16. Representación gráfica de LCO en nanómetros frente el tiempo en segundos (s) a 405 y 785 nm en células de neuroblastoma. En color azul aparecen los valores de LCO para una zona determinada de 130 micras (μm) irradiada a 405 nm. Mientras que en color rojo aparecen los valores de LCO para otra zona de 134 μm irradiada a 785 nm. Cada valor de LCO viene representado con las barras de error del 5%.

Se tomaron los máximos valores de LCO para cada una de las 5 zonas de los tres tipos celulares y se representaron frente a la distancia en micras (μm) tanto para la irradiación a 405 nm como a 785 nm. Al irradiar a 405 nm, se tomó la zona 1 de fibroblastos con una distancia de 10 μm , la zona 2 de 56 μm , la zona 3 de 94 μm , la zona 4 de 130 μm y la zona 5 de 226 μm . La zona 1 de las células de glioma presenta también una distancia de 10 μm , la zona 2 de 37,5 μm , la zona 3 de 97 μm , la zona 4 de 130 μm y la zona 5 de 225,75 μm . A la zona 1 de las células de neuroblastoma le corresponde también una distancia de 10 μm , la zona 2 presenta una distancia de 56,89 μm , la zona 3 de 95,86 μm , la zona 4 de 130 μm y la zona 5 de 227 μm :

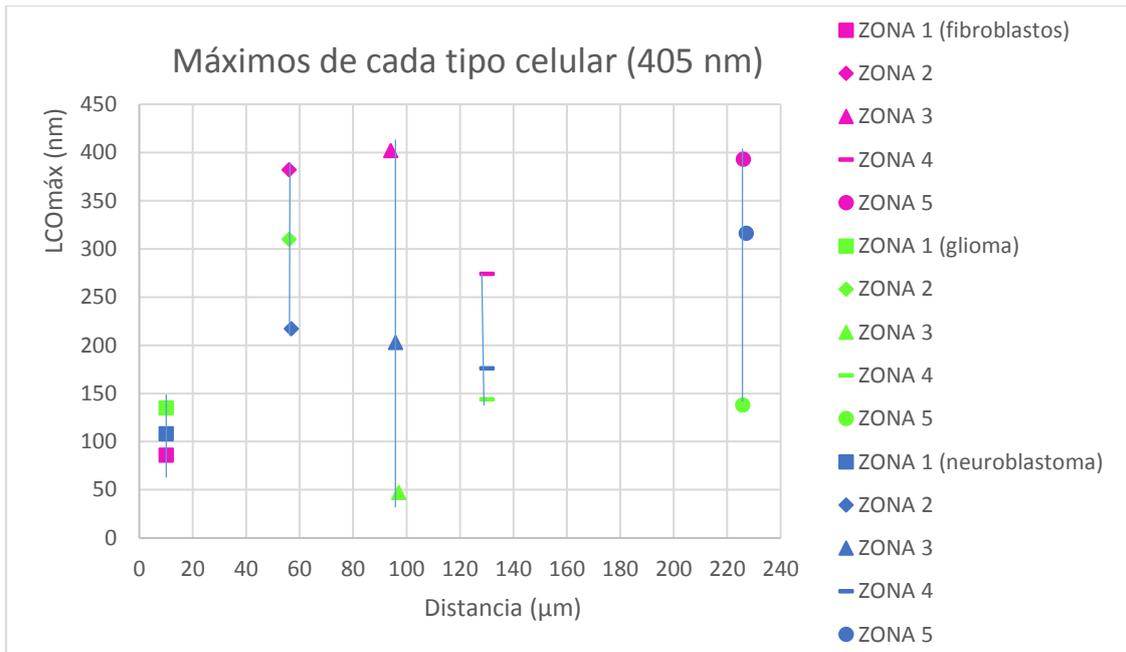


Fig. 17. Gráfica que representa los valores máximos de LCO en nanómetros para cada una de las zonas medidas de los tres tipos celulares (fibroblastos, células de glioma y células de neuroblastoma) frente a la distancia en micras (μm) irradiando a 405 nm. En color violeta se representan los valores máximos de LCO de las cinco zonas medidas en fibroblastos. En color verde aparecen los valores máximos de LCO de las respectivas zonas medidas en células de glioma y los de color azul se corresponden a los valores máximos para células de neuroblastoma. Las líneas verticales unen los valores máximos de LCO de los tres tipos celulares para cada zona (zona 1, zona 2, zona 3, zona 4 y zona 5).

Del mismo modo que irradiando a 405 nm, se irradiaron 5 zonas distintas con distancias diferentes a 785 nm. La zona 1 de fibroblastos posee una distancia de 10 μm , la zona 2 de 50 μm , la zona 3 de 95 μm , la zona 4 de 129,08 μm y la zona 5 de 228 μm . En el caso de las células de glioma, la zona 1 también presenta una distancia de 10 μm , la zona 2 de 37,3 μm , la zona 3 de 98,37 μm , la zona 4 de 133 μm y la zona 5 de 224,9 μm . En las células de neuroblastoma se tomó la zona 1 con una distancia de 10,59 μm , la zona 2 con 59,33 μm , la zona 3 con 96,65 μm , la zona 4 con 134 μm y la zona 5 con 232 μm .

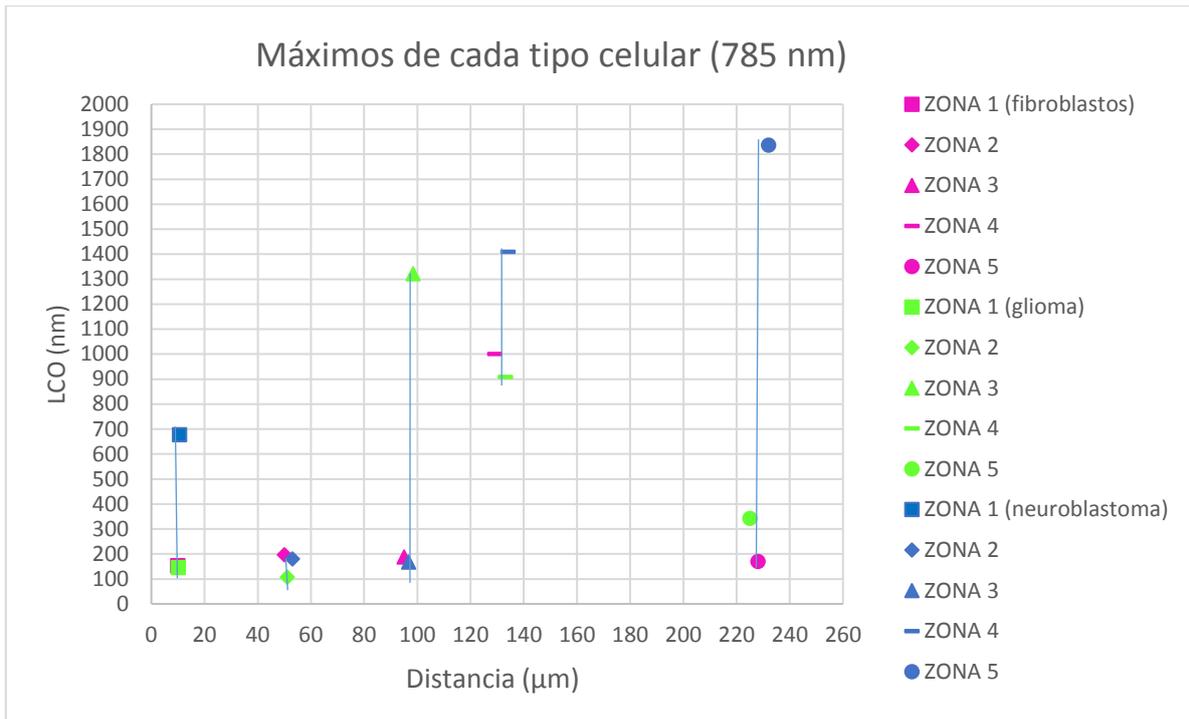


Fig. 18. Gráfica que representa los valores máximos de LCO (nm) para cada una de las zonas medidas de los tres tipos celulares (fibroblastos, células de glioma y células de neuroblastoma) frente a la distancia en micras (μm) irradiando a 785 nm. En color violeta se representan los valores máximos de LCO de las cinco zonas medidas en fibroblastos. En color verde aparecen los valores máximos de LCO de las respectivas zonas medidas en células de glioma y los de color azul se corresponden a los valores máximos para células de neuroblastoma. Las líneas verticales unen los valores máximos de LCO de los tres tipos celulares para cada zona (zona 1, zona 2, zona 3, zona 4 y zona 5).

También se realizó un barrido para cada tipo celular, es decir, se llevó a cabo el procedimiento explicado anteriormente en el que se mide la diferencia de LCO cada 10 segundos alcanzando los 300 segundos, pero esta vez se escogió una distancia fija de entre 214-215 micras y se fue cambiando el ángulo ($\sim 15^\circ$) en cada posición. Por lo que se tiene una distancia similar en las diferentes posiciones pero cada una presenta una orientación, un ángulo diferente a partir de un punto fijo.

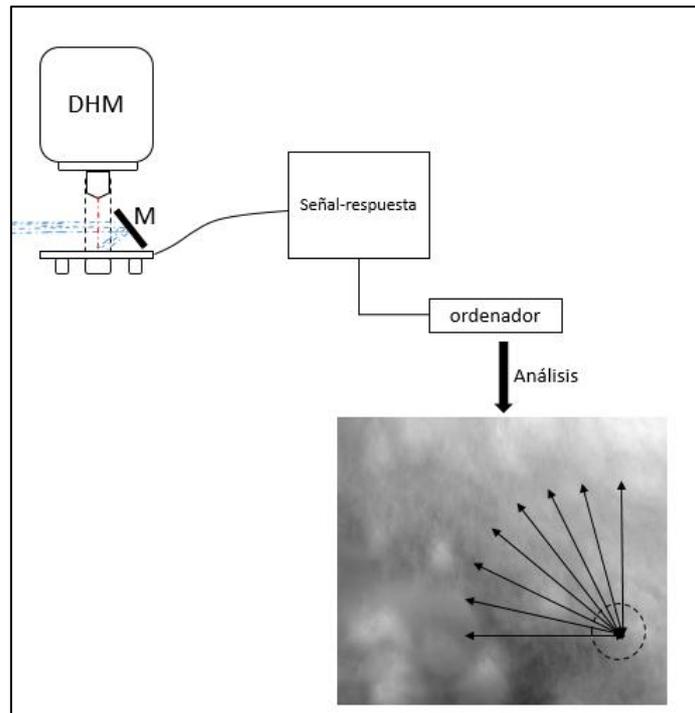


Fig. 19. **M**: espejo; **DHM**: Microscopio Holográfico Digital. Esquema que muestra cómo se toman las medidas en el ordenador de cada zona con diferentes distancias, a partir de la imagen proporcionada por el microscopio. En la imagen inferior las flechas representan las zonas medidas con la misma distancia, cambiando el ángulo para cada posición. El círculo punteado hace referencia a la zona de irradiación a 405 o 785 nm en cada caso.

En este caso, se sembró en 3 cubreobjetos una concentración de 40.000 células por pocillo cuatro días antes de llevar a cabo el procedimiento experimental con el DHM. Debido al crecimiento celular que se produce durante los días anteriores a la realización del procedimiento, se cultivó una menor concentración celular.

Se midieron 5 zonas diferentes con la misma distancia y distinta orientación para cada tipo celular a 405 y 785 nm, pero a la hora de representar los datos gráficamente, se ha simplificado la información mostrando solo una de las zonas de trabajo para cada longitud de onda de irradiación.

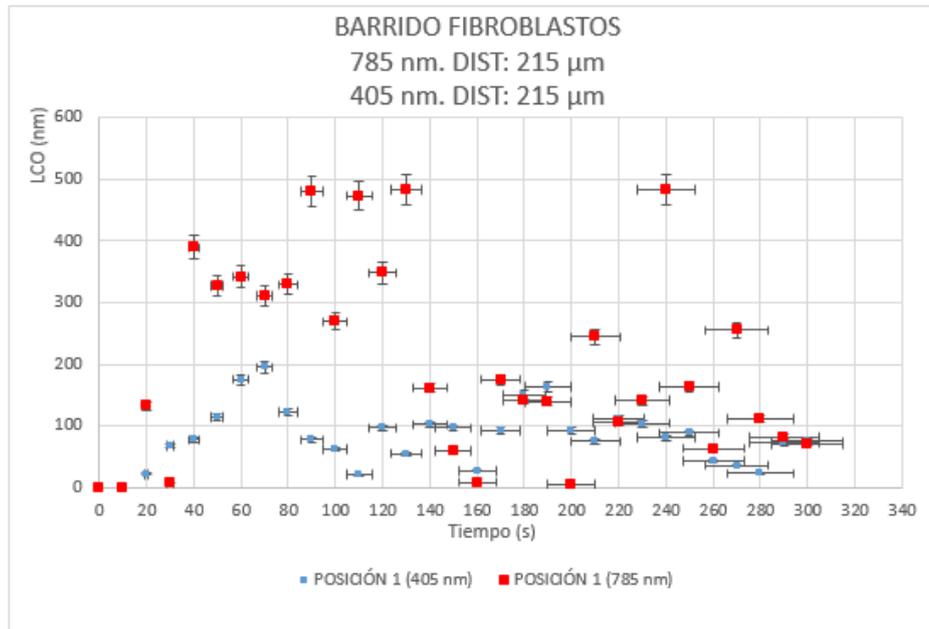


Fig. 20. Representación de los valores de LCO (nm) frente al tiempo en segundos (s) para la posición 1 de 5 con la distancia fija de 215 micras (μm) irradiando a 405 y 785 nm los fibroblastos. En color azul aparecen los valores cuando se irradia a 405 nm, mientras que en color rojo aparecen los correspondientes irradiando a 785 nm. Cada valor de LCO viene representado con las barras de error del 5%.

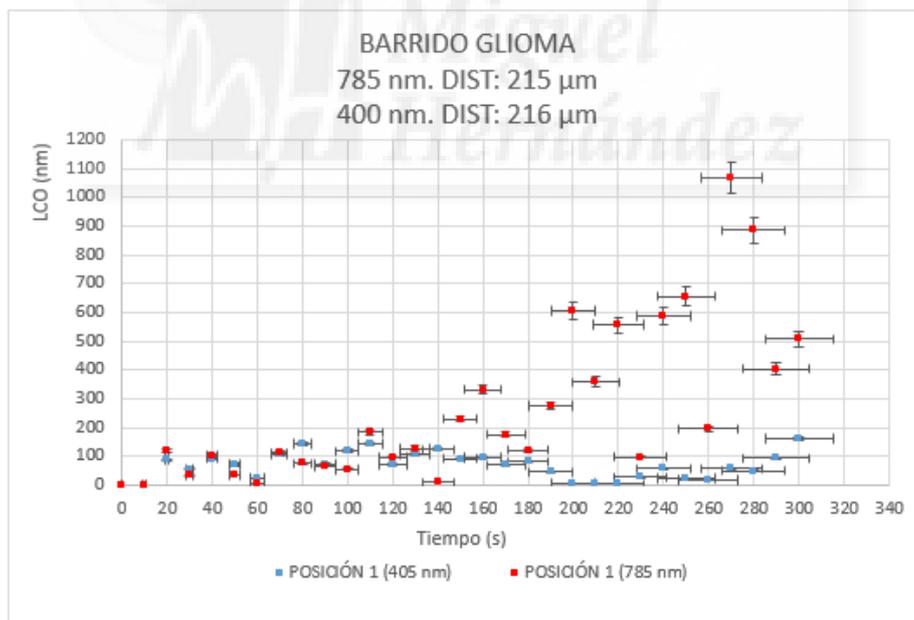


Fig. 21. Representación de los valores de LCO (nm) frente al tiempo en segundos (s) para la posición 1 de 5 con la distancia fija de 216 micras (μm) irradiando a 405 y de 215 μm irradiando a 785 nm las células de glioma. En color azul aparecen los valores cuando se irradia a 405 nm, mientras que en color rojo aparecen los correspondientes irradiando a 785 nm. Cada valor de LCO viene representado con las barras de error del 5%.

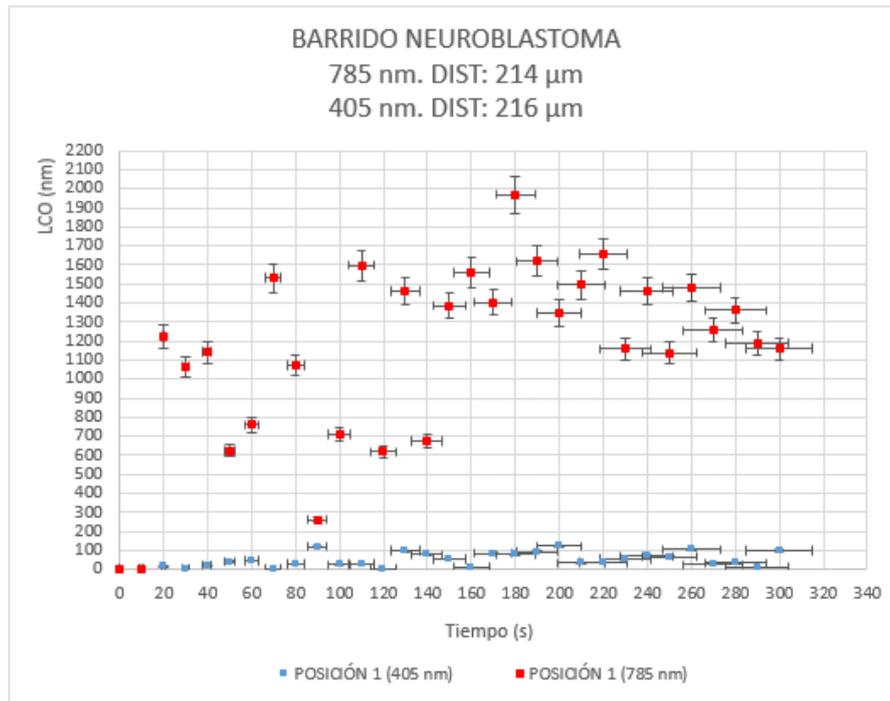


Fig. 22. Representación de los valores de LCO (nm) frente al tiempo en segundos (s) para la posición 1 de 5 con la distancia fija de 216 micras (μm) irradiando a 405 y de 214 μm irradiando a 785 nm las células de neuroblastoma. En color azul aparecen los valores cuando se irradia a 405 nm, mientras que en color rojo aparecen los correspondientes irradiando a 785 nm. Cada valor de LCO viene representado con las barras de error del 5%.

Se pueden apreciar las diferencias entre los valores máximos de LCO con las siguientes gráficas en las que se representan los valores máximos de LCO frente a las distintas posiciones que poseen la misma distancia de medida, tanto a 405 nm como a 785 nm de longitud de onda. Las 5 zonas irradiadas en fibroblastos a 405 nm presentan 215 μm de distancia, mientras que las 5 zonas de las células de glioma y neuroblastoma presentan 216 μm de distancia:

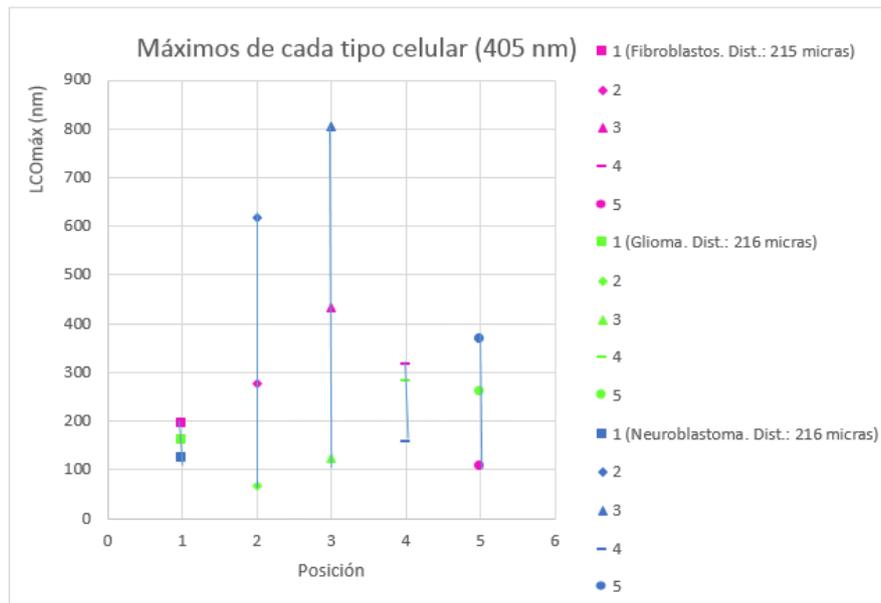


Fig. 23. Gráfica que muestra los valores máximos de LCO (nm) para cada posición (de la 1 a la 5) con la distancia fija de 215 μm en el caso de los fibroblastos (color violeta) y 216 μm en el caso de las células de glioma (color verde) y las células de neuroblastoma (color azul), irradiando a 405 nm. Las líneas verticales unen los valores máximos de LCO de los tres tipos celulares para cada zona.

Al irradiar las distintas zonas de cada tipo celular a 785 nm, en el caso de los fibroblastos y las células de glioma las 5 zonas poseen 215 μm de distancia. Mientras que las 5 zonas de las células de neuroblastoma poseen 214 μm de distancia.

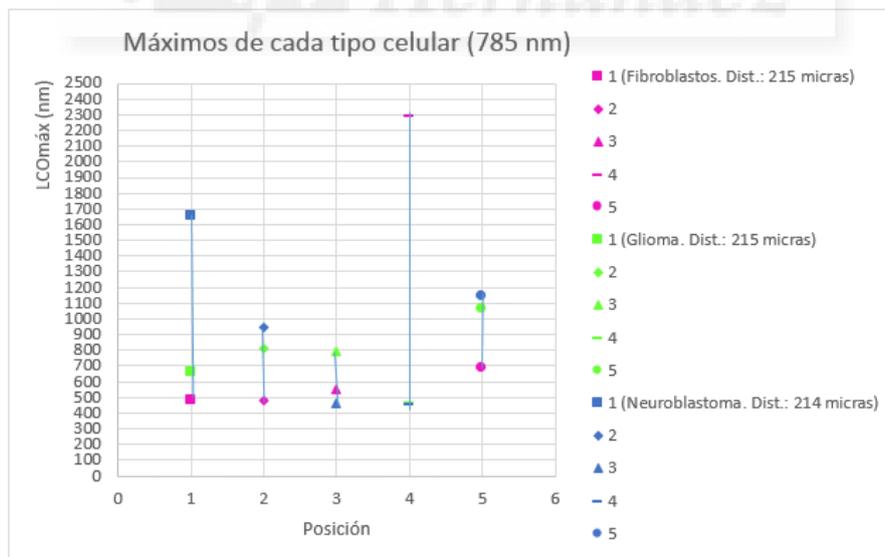


Fig. 24. Gráfica que muestra los valores máximos de LCO (nm) para cada posición (de la 1 a la 5) con la distancia fija de 215 μm en el caso de los fibroblastos (color violeta) y de las células de glioma (color verde) y 214 μm para las células de neuroblastoma (color azul), irradiando a 785 nm. Las líneas verticales unen los valores máximos de LCO de los tres tipos celulares para cada zona.

Otra parte del procedimiento experimental consistió en comparar cubres en los que se sembró una mayor concentración celular (40.000 células por pocillo) con cubres de menor concentración celular (20.000 células por pocillo) y ver si había diferencias en los valores de LCO. Para ello, de forma similar a como se ha hecho en los procedimientos anteriores, cada 10 segundos se midió la diferencia de LCO en nm hasta alcanzar los 300 segundos, empleando las dos longitudes de onda de irradiación 405 y 785 nm. En esta ocasión, se comparó una misma posición con una distancia similar alrededor de 214-217 μm , para los cubres de mayor y menor concentración de células. La experiencia se llevó a cabo en fibroblastos y células de glioma por poseer el mismo tiempo de duplicación (40 horas) y una morfología no demasiado diferente. A continuación se muestra una tabla con las medias ($\langle \bar{x} \rangle$) y los valores de dispersión promedio de los datos correspondientes a cada tipo celular y para cada longitud de onda de irradiación:

		$\lambda = 405 \text{ nm}$		$\lambda = 785 \text{ nm}$	
		Menor concentración. Distancia: 216 μm	Mayor concentración. Distancia: 216 μm	Menor concentración. Distancia: 216 μm	Mayor concentración. Distancia: 215 μm
Fibroblastos		86(62) nm	81(37) nm	130(84) nm	203(135) nm
		Menor concentración. Distancia: 216 μm	Mayor concentración. Distancia: 218 μm	Menor concentración. Distancia: 214 μm	Mayor concentración. Distancia: 215 μm
Células de glioma		186(168) nm	68(37) nm	192(126) nm	260(217) nm

Tabla 2. Se muestran las medias ($\langle \bar{x} \rangle$) y los valores de dispersión entre paréntesis de los datos de longitud de camino óptico (nm) en el tiempo a menor concentración (20.000 células por pocillo) y a mayor concentración (40.000 células por pocillo) de fibroblastos y células de glioma al irradiar con las dos longitudes de onda de trabajo (405 y 785 nm).

Resultados

-Análisis de los resultados

Tabla de medias \bar{x} y valores de dispersión promedio de los datos de LCO (nm):

Zonas de trabajo	$\lambda = 405 \text{ nm}$			$\lambda = 785 \text{ nm}$		
	Fibroblastos (nm)	Glioma (nm)	Neuroblastoma (nm)	Fibroblastos (nm)	Glioma (nm)	Neuroblastoma (nm)
Zona 1	28(16)	63(31)	47(31)	57(34)	85(25)	516(64)
Zona 2	162(114)	163(89)	103(62)	118(39)	46(26)	57(39)
Zona 3	146(77)	18(18)	76(45)	69(42)	1156(106)	66(47)
Zona 4	77(54)	55(36)	79(47)	806(81)	763(78)	1254(97)
Zona 5	137(95)	50(34)	180(150)	82(39)	78(66)	1640(129)
Barrido	Fibroblastos (nm)	Glioma (nm)	Neuroblastoma (nm)	Fibroblastos (nm)	Glioma (nm)	Neuroblastoma (nm)
Posición 1	81(37)	68(37)	48(32)	203(134)	260(217)	1141(363)
Posición 2	80(57)	32(17)	218(109)	196(130)	331(183)	372(226)
Posición 3	209(72)	53(30)	332(235)	213(163)	372(150)	133(79)
Posición 4	164(117)	110(75)	58(42)	1425(572)	219(114)	141(94)
Posición 5	44(23)	82(53)	83(56)	154(141)	617(308)	617(246)

Tabla 3. Se muestran las medias \bar{x} y valores de dispersión promedio de los datos de la longitud de camino óptico (nm) en el tiempo, midiendo distintas zonas con distancias diferentes y las distintas posiciones con la misma distancia pero diferente orientación, tanto a 405 nm como a 785 nm.

En general se obtienen valores de dispersión altos en comparación con los valores medios de LCO.

Las gráficas con las medias y valores de dispersión son las siguientes:

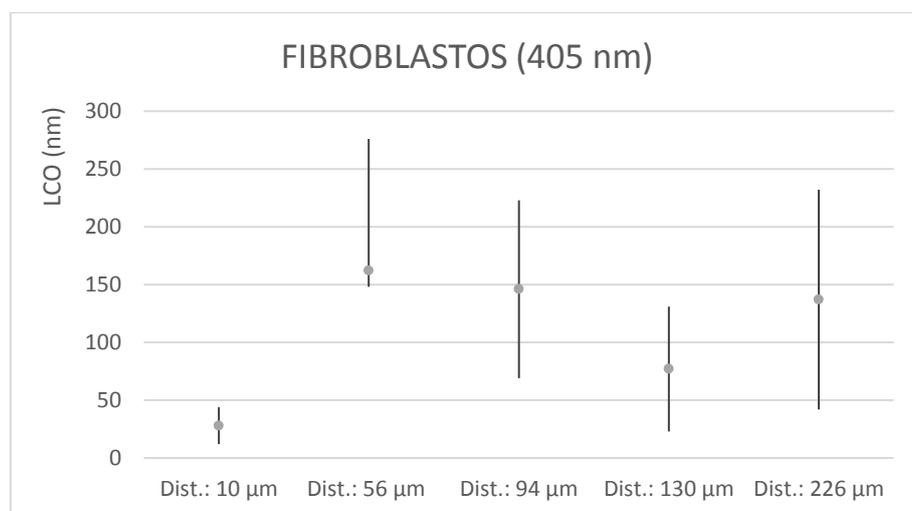


Fig. 25. Gráfica que muestra la media de los valores de LCO (nm) junto con la suma y resta del error de dispersión para cada una de las 5 zonas irradiadas en fibroblastos a 405 nm con las diferentes distancias indicadas.

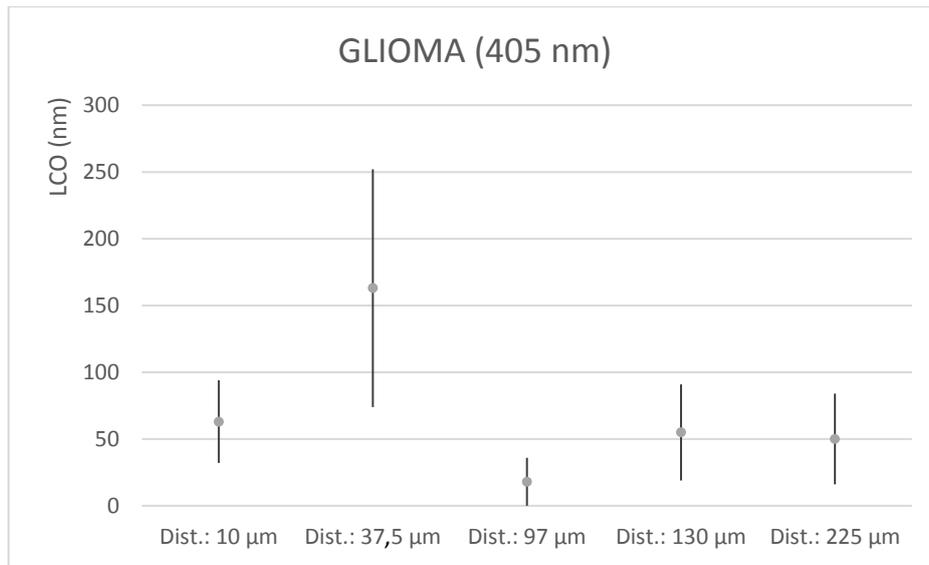


Fig. 26. Gráfica que muestra la media de los valores de LCO (nm) junto con la suma y resta del error de dispersión para cada una de las 5 zonas irradiadas en células de glioma a 405 nm con las diferentes distancias indicadas.

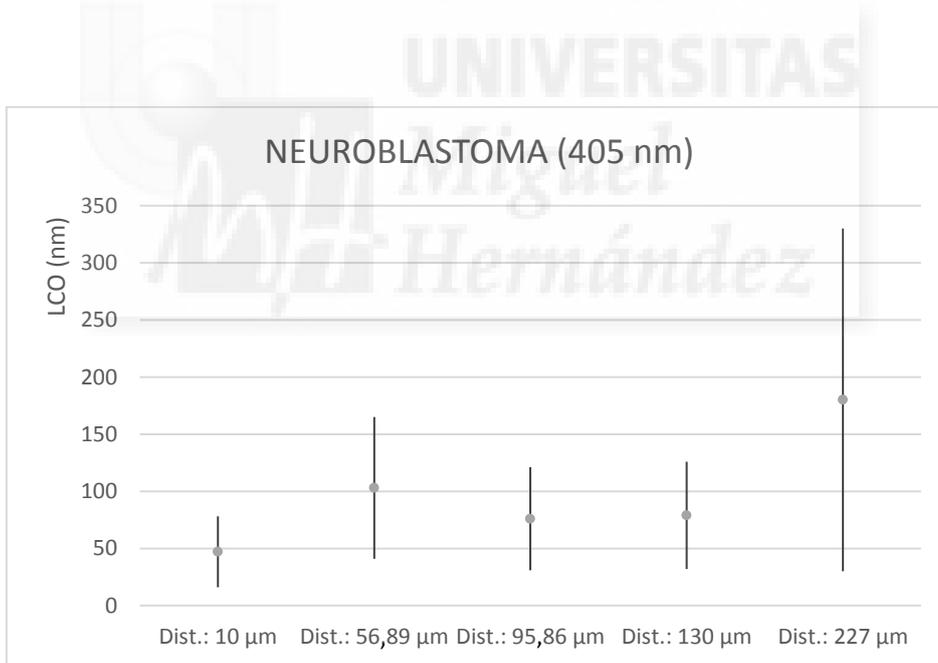


Fig. 27. Gráfica que muestra la media de los valores de LCO (nm) junto con la suma y resta del error de dispersión para cada una de las 5 zonas irradiadas en células de neuroblastoma a 405 nm con las diferentes distancias indicadas.

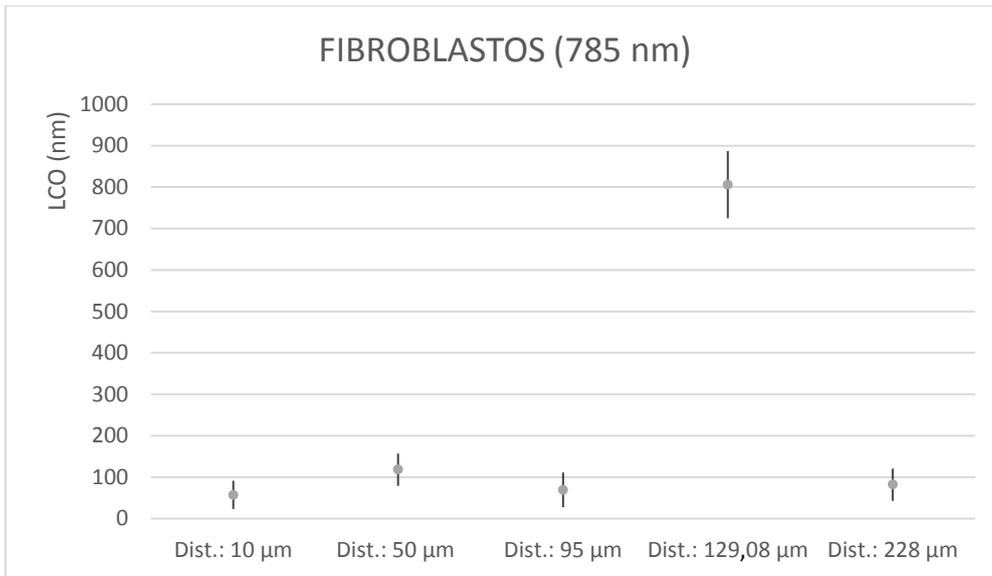


Fig. 28. Gráfica que muestra la media de los valores de LCO (nm) junto con la suma y resta del error de dispersión para cada una de las 5 zonas irradiadas en fibroblastos a 785 nm con las diferentes distancias indicadas. El error de dispersión es más pequeño y se observa debido a que las barras de error son más cortas.

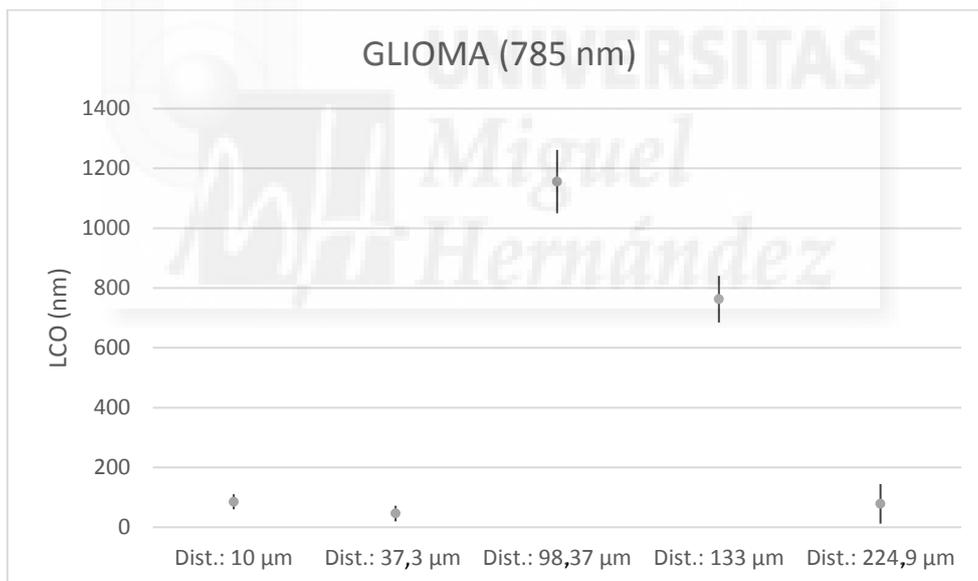


Fig. 29. Gráfica que muestra la media de los valores de LCO (nm) junto con la suma y resta del error de dispersión para cada una de las 5 zonas irradiadas en células de glioma a 785 nm con las diferentes distancias indicadas. El error de dispersión es más pequeño y se observa debido a que las barras de error son más cortas.

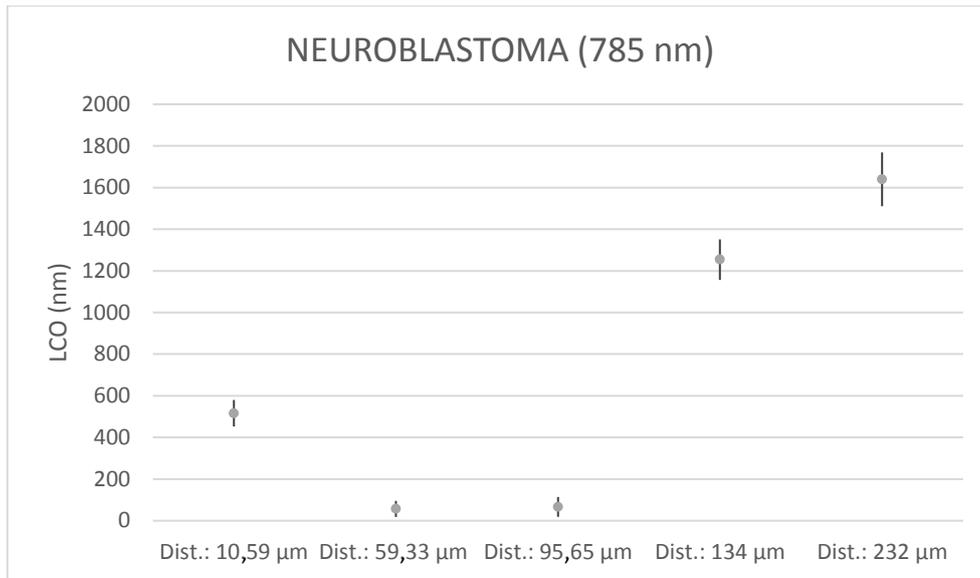


Fig. 30. Gráfica que muestra la media de los valores de LCO (nm) junto con la suma y resta del error de dispersión para cada una de las 5 zonas irradiadas en células de neuroblastoma a 785 nm con las diferentes distancias indicadas. El error de dispersión es más pequeño y se observa debido a que las barras de error son más cortas.

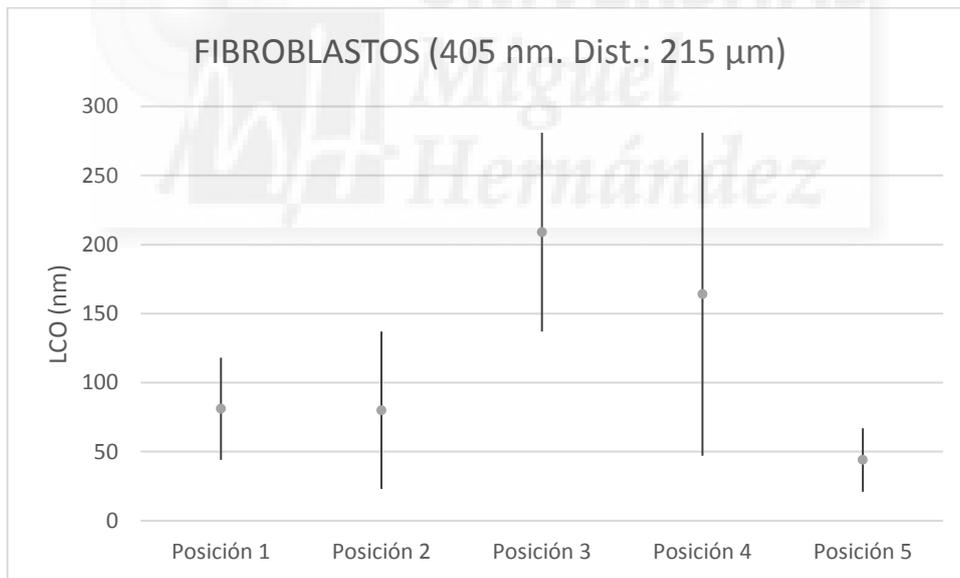


Fig. 31. Gráfica que muestra la media de los valores de LCO (nm) junto con la suma y resta del error de dispersión para cada una de las 5 posiciones irradiadas en fibroblastos a 405 nm con la misma distancia de 215 µm.

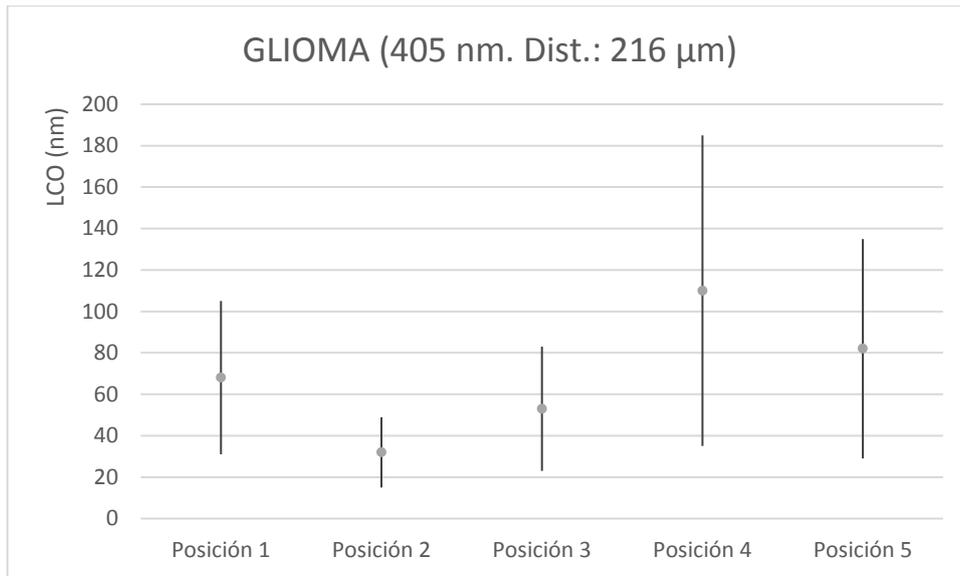


Fig. 32. Gráfica que muestra la media de los valores de LCO (nm) junto con la suma y resta del error de dispersión para cada una de las 5 posiciones irradiadas en células de glioma a 405 nm con la misma distancia de 216 μm.

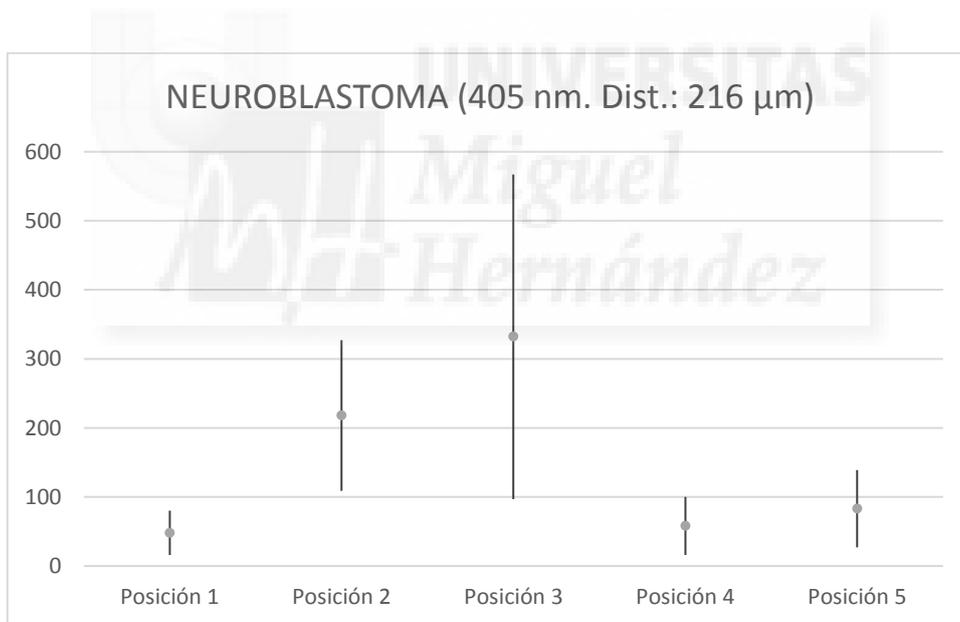


Fig. 33. Gráfica que muestra la media de los valores de LCO (nm) junto con la suma y resta del error de dispersión para cada una de las 5 posiciones irradiadas en células de neuroblastoma a 405 nm con la misma distancia de 216 μm.

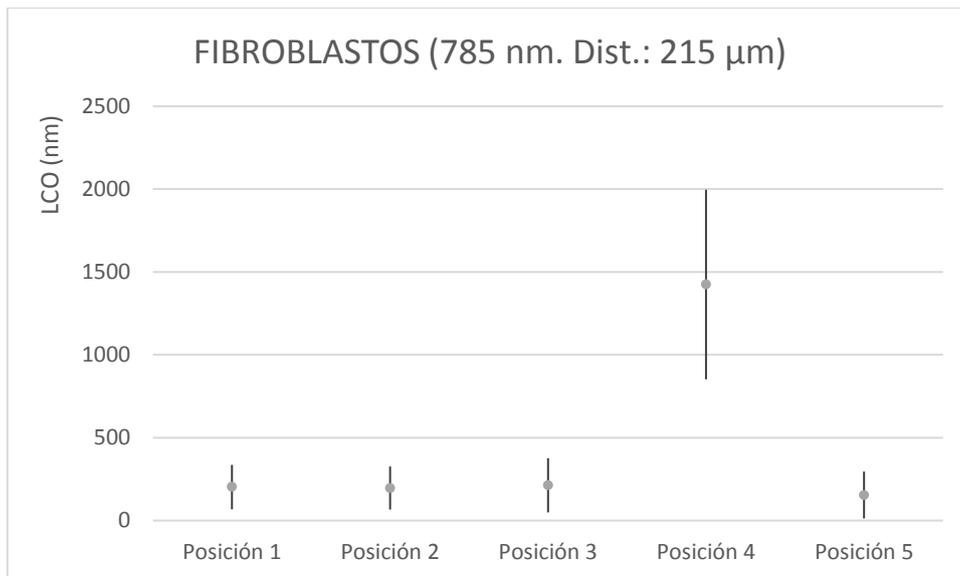


Fig. 34. Gráfica que muestra la media de los valores de LCO (nm) junto con la suma y resta del error de dispersión para cada una de las 5 posiciones irradiadas en fibroblastos a 785 nm con la misma distancia de 215 μm.

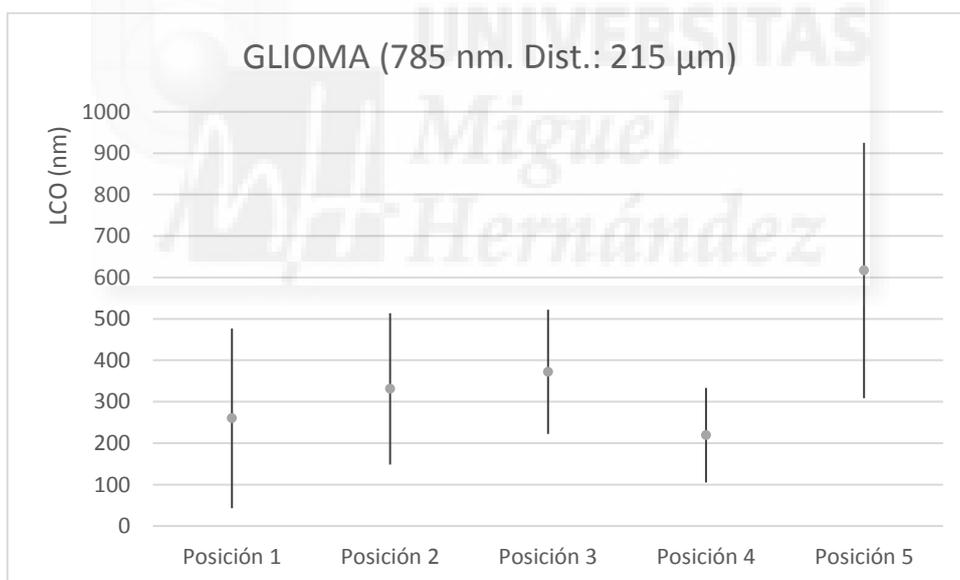


Fig. 35. Gráfica que muestra la media de los valores de LCO (nm) junto con la suma y resta del error de dispersión para cada una de las 5 posiciones irradiadas en células de glioma a 785 nm con la misma distancia de 215 μm.

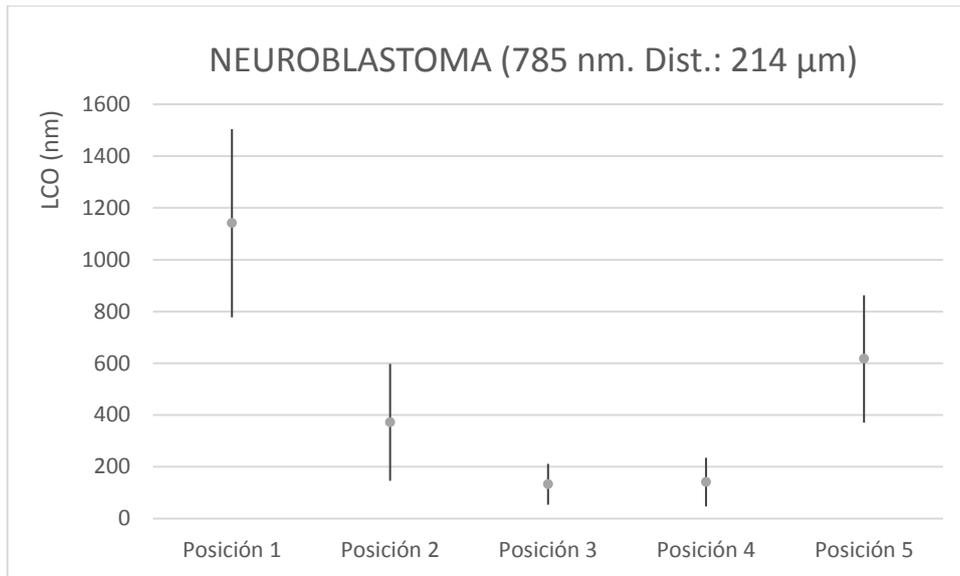


Fig. 36. Gráfica que muestra la media de los valores de LCO (nm) junto con la suma y resta del error de dispersión para cada una de las 5 posiciones irradiadas en células de neuroblastoma a 785 nm con la misma distancia de 214 μm .



Discusión

A partir del procedimiento de medición de la temperatura con el aumento de intensidad, nuestros resultados no mostraron cambios significativos en la temperatura para la longitud de onda de trabajo de 405 nm, esta apenas varía 0,15-0,2 °C a partir de 0,378 mW de intensidad. Mientras que para la longitud de onda de 785 nm, nuestros resultados muestran un comportamiento lineal, en el que cada vez que se aumenta la intensidad 1 mW, la temperatura aumenta aproximadamente 0,1 °C. Con esta última longitud de onda de irradiación (785 nm) se incrementa la temperatura finalmente 0,7 °C, no llegando al grado centígrado de aumento. Para el rango de intensidades en el que hemos trabajado, la temperatura no parece ser un parámetro que dé lugar a efectos térmicos negativos para las muestras biológicas a 405 nm, debido a las pequeñas variaciones de temperatura que se han producido. Mientras que a 785 nm, el incremento de 0,7 °C observado, podría estar influyendo de alguna manera, generando efectos térmicos secundarios muy rápidos que no hemos podido analizar.

En las experiencias en las que se va aumentando la intensidad y se van midiendo los valores de LCO para los tres tipos celulares tanto a 405 como a 785 nm, se observa una tendencia positiva, conforme aumenta la intensidad aumenta la longitud de camino óptico. En el caso de la irradiación 405 nm, nuestros resultados muestran que las células de neuroblastoma son las que poseen valores más altos de LCO, las siguientes son los fibroblastos y por último, las células de glioma son las que presentan valores más pequeños. Mientras que cuando se irradia a 785 nm, son los fibroblastos los que presentan valores de LCO superiores, seguidos de las células de glioma y por último, las células de neuroblastoma, que presentan valores de LCO inferiores y cuando llegan a aproximadamente 6000 nm de LCO (Fig. 12) permanecen invariables, no siguen aumentando. Nuestros resultados sugieren que existe dependencia entre los valores de LCO y la intensidad, ya que en general a partir de nuestros datos se ha visto que para las dos longitudes de onda de trabajo, conforme aumenta la intensidad también lo hace la diferencia de LCO para los tres tipos celulares con nuestras condiciones de trabajo.

En el caso de la irradiación de células cada 10 segundos, al representar la diferencia de LCO frente al tiempo de un zona (elegida entre 5 zonas) con una distancia similar o igual al irradiar tanto a 405 nm como a 785 nm, se observa que los valores de LCO son mayores a 785 nm que a 405 nm. Con el láser continuo a 785 nm, se puede apreciar que la zona elegida con una distancia de aproximadamente 130 μm en los tres tipos de células, muestra unos datos de LCO cercanos a 1000 nm (Fig. 14-16). Sin embargo, en comparación con la anterior longitud de onda, los valores de LCO empleando el láser continuo a 405 nm son menores y no superan los 300 nm (Fig. 14-16). A partir de esta experiencia, se observa que hay una dependencia entre los valores de LCO y la longitud de onda

empleada, indicando que cuanto mayor es la longitud de onda de irradiación, mayores son los valores de LCO.

Cuando se comparan los máximos valores de LCO de cada una de las 5 zonas irradiadas en cada tipo celular y con una distancia diferente, se observa que a 405 nm (Fig. 17) en todas las posiciones salvo en la primera, son los fibroblastos los que poseen valores de LCO más altos. Además, se observa que en todas las posiciones salvo en la primera, los valores de LCO divergen entre los tres tipos celulares. Mientras que al comparar máximos valores de LCO a 785 nm (Fig. 18), las células de neuroblastoma son las que presentan valores de LCO más altos en las zonas 1, 4 y 5. Al igual que a 405 nm, los valores de LCO de cada tipo celular para cada posición divergen bastante a 785 nm salvo en la zona 2.

Al realizar el barrido en los tres tipos de células con distintas posiciones pero con la misma distancia, al comparar una de esas posiciones para cada longitud de onda de irradiación (405 y 785 nm), se observa que generalmente para los tres tipos celulares, los valores de LCO son superiores a 785 nm que a 405 nm (Fig. 20-22). Al comparar los valores máximos de LCO para los tres tipos celulares a 785 nm, las células de glioma presentan valores máximos de LCO en torno a los 1000 nm mientras que los fibroblastos no alcanzan los 500 nm. Mientras que a 405 nm, los fibroblastos presentan valores de LCO con máximos superiores que las células de glioma y neuroblastoma.

Comparando los máximos valores de LCO para las cinco posiciones irradiadas en cada tipo celular, a 405 nm se observa que las células de neuroblastoma presentan los máximos valores de LCO en todas las posiciones salvo en la 1 y la 4, que son superiores los valores de LCO de los fibroblastos (Fig. 23). Irradiando a 785nm de longitud de onda, las células de neuroblastoma presentan el máximo valor de LCO en tres posiciones, salvo en la 3, cuyo máximo valor es el de glioma, y en la 4, que es el de fibroblastos (Fig. 24). En la posición 4 los valores máximos de LCO de glioma y neuroblastoma se superponen (463 y 455 nm respectivamente) debido a su similitud. Los valores de LCO de cada tipo celular para cada posición divergen salvo en la posición 1 a 405 nm. En el caso de los valores a 785 nm, en la posición 3 los valores divergen menos.

Cuando se comparan los cubres en los que se sembraron las células con mayor y menor concentración, se aprecia que irradiando a 405 nm para ambos tipos celulares (fibroblastos y glioma) el valor medio de LCO (nm) es superior a menor concentración, lo que implicaría que a mayor concentración se produjera una mayor dispersión. Estos resultados cabrían esperarse debido a que a mayor concentración celular aumentan los centros de dispersión. No ocurre lo mismo a 785 nm, cuyos resultados muestran valores medios de LCO superiores a mayor concentración, implicando mayor dispersión a menor concentración celular.

Conclusiones y proyección futura

-Los procesos de interacción luz-célula con bajas intensidades y con longitudes de onda de 405 y 785 nm son fundamentales para conocer los mecanismos fotofísicos y fotobiológicos que en la actualidad se centran en el campo de la optogenética y fotónica de biomoléculas.

-Las medidas en tiempo real de los procesos de interacción luz-célula están relacionadas con procesos de absorción, dispersión y efectos térmicos. Irradiando las células a 785 nm, el incremento de 0,7 °C observado, podría estar generando efectos térmicos secundarios muy rápidos que no hemos podido analizar.

-Las medidas realizadas con el microscopio holográfico digital quedan enmascaradas por los efectos de dispersión de forma no local e implican un serio problema cuando se desea realizar procesos de medida con alta precisión.

-Gracias a las experiencias en las que se ha ido aumentando la intensidad y se ha ido midiendo la modificación de LCO, con las dos longitudes de onda de irradiación, nuestros resultados sugieren que conforme aumenta la intensidad también aumenta la diferencia de LCO para los tres tipos celulares empleados.

- Al irradiar las células a 405 y 785 nm y medir las modificaciones de LCO cada 10 segundos en distintas zonas de distancia variable, se puede observar que hay una dependencia entre los valores de LCO y la longitud de onda empleada. Es decir, parece que cuanto mayor es la longitud de onda de irradiación, mayores son los valores de LCO. Se obtiene la misma conclusión cuando se irradian las células a 405 y 785 nm, en zonas con una distancia constante y ángulo diferente (distinta orientación).

-Con la comparación del efecto en el valor de LCO entre dos concentraciones celulares diferentes, a partir de nuestros resultados se observa cierta influencia, pudiéndose producir mayor dispersión en las muestras más concentradas, debido también a que cuantas más células haya la luz se va dispersando entre células vecinas. Aunque no está claro del todo, puesto que al irradiar a 405 nm los valores medios de LCO se dan en los cubres de menor concentración, pero al irradiar a 785 nm los valores de LCO de los cubres de mayor concentración alcanzan valores medios más elevados que los de menor concentración. Por lo que haría falta realizar más experiencias para poder corroborar nuestros resultados y estudiar si hay efectos térmicos implicados.

En trabajos futuros se deben considerar como variables muy importantes, la concentración de células que se emplean, la intensidad de irradiación y el tamaño de la zona de irradiación, que en este caso no ha sido estudiada su influencia (el diámetro de la zona de trabajo ha sido de 25 μm).

Bibliografía

- 1.- **Introduction to Biophotonics.** Paras N. Prasad, 2003. Ed. John Wiley & Sons
- 2.- Muhammad Z. K. "Mechanism of Laser/light beam interaction at cellular and tissue level and study of the influential factors for the application of low level laser therapy". Physics.med-ph
arXiv.org: 1606.04800v1
- 3.-**Técnicas instrumentales de análisis en bioquímica.** García-Segura et al. Ed. Síntesis, 2007
- 4.- **Holographic Microscopy of Phase Microscopic Objects.** Tatyana T., Tishko D., Titar V. Ed. World Scientific
- 5.- **Biología celular** 3ª ed. Paniagua G. R. Ed. McGraw-Hill Interamericana
- 6.- **Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos** 6ª ed. Gerald K. Ed. McGraw-Hill
- 7.- George J. T., Karl H., Howard G. "Antigenic and cultural properties of cells doubly transformed by polyoma virus and SV40". Virology. 1965 Oct;27(2):179-85
DOI: 10.1016/0042-6822(65)90157-1
- 8.- George J. T., Howard G. "Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines". J Cell Biol. 1963 May 1; 17(2): 299–313
DOI: 10.1083/jcb.17.2.299
- 9.- Perzelová A., Máčiková I., Mráz P., Bízík I., Steno J. "Characterization of two new permanent glioma cell lines 8-MG-BA and 42-MG-BA". Neoplasma. 1998;45(1):25-9
- 10.- Ross RA., Spengler BA., Biedler JL. "Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells". J Natl Cancer Inst. 1983 Oct;71(4):741-7
DOI: 10.1093/jnci/71.4.741
11. Biedler JL., Roffler-Tarlov S., Schachner M., Freedman LS. "Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones". Cancer Res. 1978 Nov;38(11 Pt 1):3751-7
- 12.- <http://www.lynceotec.com/reflection-dhm/>
- 13.- **Citología e histología vegetal y animal** 4ª ed. Paniagua G. R. Ed. McGraw-Hill Interamericana

14.- Christopher V. G. "Femtosecond lasers in biology: nanoscale surgery with ultrafast optics". Contemporary Physics, Volume 49, Nº 6, November-December 2008, 391-411

DOI: 10.1080/00107510802628263

15.- I. Maxwell, S. Chung, E. Mazur. "Nanoprocessing of subcellular targets using femtosecond laser pulses". Medical Laser Application 20, 2005, 193-200

DOI: 10.1016/j.mla.2005.07.005

16.- K.König, T. W. Becker, P. Fischer, I. Riemann, and K.-J. Halbhuber. "Pulse-length dependence of cellular response to intense near-infrared laser pulses in multiphoton microscopes". Optics Letters, January 15, 1999, Vol. 24, Nº 2

DOI: 10.1364/OL.24.00013

17.- P. S Tsai, P. Blinder, B. J Migliori, J. Neev, Y. Jin, J. A Squier and D. Kleinfeld. "Plasma-mediated ablation: an optical tool for submicrometer surgery on neuronal and vascular systems". Current Opinion in Biotechnology 2009, 20:90-99.

DOI: 10.1016/j.copbio.2009.02.003

18.- P.S Tsai, B. Friedman, A. I. Ifarraguerri, B. D. Thompson, V. Lev-Ram, C. B. Schaffer, Q. Xiong, R. Y. Tsien, J. A. Squier, and D. Kleinfeld. "All-Optical Histology Using Ultrashort Laser Pulses". Neuron, Vol. 39, 27-41, July 3, 2003, by Cell Press.

DOI: 10.1016/S0896-6273(03)00370-2