

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN ÓPTICA**

**EFFECTOS DE CALENTAMIENTO Y FORMACIÓN DE BURBUJA INDUCIDOS
CON LÁSERES PULSADOS EN MODELOS DE TEJIDO-BIOLÓGICO**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

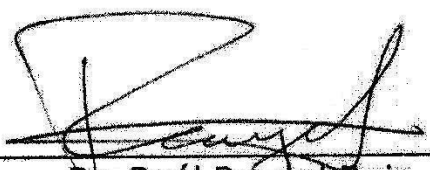
GERARDO SALVADOR ROMO CÁRDENAS

Ensenada, Baja California, México, Agosto del 2007.


TESIS DEFENDIDA POR
Gerardo Salvador Romo Cárdenas
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ




Dr. Santiago Camacho López
Director del Comité




Dr. Raúl Rangel Rojo
Miembro del Comité




Dr. Pedro Negrete Regagnon
Miembro del Comité



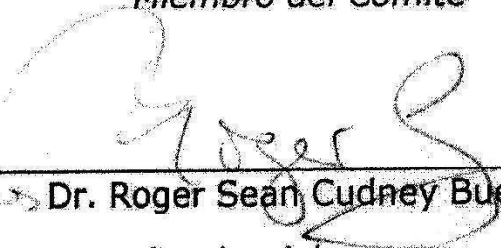
Dr. Guillermo Aguilar Mendoza
Miembro del Comité



Dr. Manuel Alberto Segovia Quintero
Miembro del Comité



Dr. Marco Antonio Barrera Vargas
Miembro del Comité



Dr. Roger Sean Cudney Bueno
*Coordinador del programa de
posgrado en óptica*



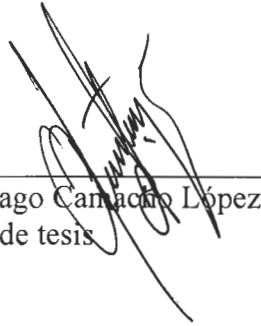
Dr. Edgar Gerardo Pavía López
Director de Estudios de Posgrado

27 de Agosto de 2007

Resumen de la tesis de *Gerardo Salvador Romo Cárdenas*, presentada como requisito parcial, para obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Óptica**. Ensenada, Baja California, México, Agosto del 2007

EFFECTOS DE CALENTAMIENTO Y FORMACIÓN DE BURBUJA INDUCIDOS CON LÁSERES PULSADOS EN MODELOS DE TEJIDO-BIOLÓGICO

Resumen aprobador por:



Dr. Santiago Camacho López
Director de tesis

Este trabajo presenta un estudio de efectos fotoinducidos en modelos de tejido biológico contruidos a partir de gel de agar. El objetivo de nuestro estudio es comprender la dinámica de interacción de láseres pulsados con el tejido biológico y en particular con el tejido vascular. Además de los efectos térmicos fotoinducidos, también analizamos la formación de burbujas en los modelos de tejido. Las muestras fueron irradiadas por un láser Nd:YAG pulsado (5ns) y también por un láser Ti:Zafiro pulsado (100fs). Los modelos de tejido se construyen a partir de un gel de agar en forma de capas de entre 200 y 500 μ m de espesor. Las irradiaciones se llevaron a cabo enfocando el haz a una profundidad de entre 100 y 600 μ m dentro de los modelos de tejido.

Nuestros resultados muestran que existe una bien determinada fluencia umbral de formación de burbuja; y que estas puedan ser permanentes o transitorias dependiendo de los parámetros de la irradiación. Así también mostramos que el tamaño de la burbuja depende directamente de la fluencia del láser. Por otra parte, mostramos el calentamiento fotoinducido en los modelos de tejido como función de los parámetros de la irradiación y del coeficiente de absorción lineal de los mismos. Se presentará también posibles aplicaciones de estos resultados en dermatología.

Palabras Clave: Láseres pulsados, nanosegundos, femtosegundos, modelos de tejido biológico, aplicaciones médicas

Abstract from thesis by *Gerardo Salvador Romo Cárdenas*, presented as a partial requirement to obtain the degree of **Master in Sciences in Optics**. Ensenada, Baja California, México, August 2007.

HEATING AND BUBBLE FORMATION EFFECTS INDUCED IN BIOLOGICAL-TISSUE MODELS BY LASER PULSES.

Abstract approved by:



Santiago Camacho, Ph.D.
Thesis Director

This work presents a study of photo-induced effects in agar gel biological-tissue models. The objective of our study is to understand the interaction mechanism between laser pulses and biological-tissue; in particular with vascular-tissue. Besides the thermal photo-induced effects, we also analyzed the bubble formation in this tissue models. The samples were irradiated with a Nd:YAG pulsed laser (5ns) and also by a pulsed Ti:Sapphire laser (100fs). The models are made of agar layers with a width range between 200 and 500 μ m. The irradiations were made focusing the beam at a depth of 100 to 600 μ m inside the tissue models.

Our results show that a well defined bubble formation threshold fluence exists; and that these can be permanent or transients depending on the irradiation parameters. It is also proved that the size of the bubble depends directly on the laser pulse fluence. There are also results that prove the correspondence of the thermal photo-induced effect on the sample on the irradiation parameters, as well of the lineal absorption coefficient of the bio-tissue models. Possible dermatological and ophthalmic applications are mention during this work.

Keywords: Pulsed lasers, nanoseconds, femtoseconds, biological-tissue models, medical applications.

Agradecimientos

A Dios por permitirme alcanzar esta meta.

A mis padres por haberme guiado y acompañado en cada momento de mi vida, su apoyo incondicional es algo que nunca terminaré de agradecer.

A Erika, por su cariño, su gran apoyo y comprensión. Haber hecho la maestría a tu lado fue una aventura fantástica.

Al Dr. Santiago Camacho López por haber confiado en mí para hacer este proyecto. Sus consejos y sus enseñanzas han sido muy valiosas para mi crecimiento personal y profesional.

A los doctores Raúl Rangel, Pedro Negrete, Guillermo Aguilar, Manuel Segovia y Marco Barrera por haber aceptado estar en mi comité. Sus aportaciones aumentaron la calidad de este trabajo.

A los investigadores, técnicos y trabajadores de CICESE por haber cooperado de alguna manera para que este proyecto se pudiera llevar a cabo. A Marcia Padilla, a las secretarías, Carmen, Olga, Ana.

A Dolores Sarracino, Citlali Romero e Ivonne Best por toda su ayuda en todo momento desde mi admisión, hasta mi salida de CICESE.

A Rodger Evans, Rodrigo Maisterrena, Alejandra Mina, Alexandro Ruíz, Eliseo Hernandez, Francisco Pérez. De todos ustedes me llevo algo que me ayudará a crecer como persona y como científico. Trabajar a su lado fue una delicia.

A mis amigos de Ensenada. Josué, Israel, Beto, Sandra, Lily, China, Fernanda, gracias por recibirme como uno más de su familia. A mis amigos de la maestría, Karina, Yasser, Norma, Noemí, Daniel, Verónica, Joel, José Daniel, Cesar y Thet; ustedes hicieron este proceso muy agradable.

A CONACyT por proporcionar la beca para poder hacer mis estudios y también por patrocinar parcialmente este y otros proyectos de investigación.

Índice General

Índice de Figuras.....	VI
Índice de Tablas.....	XI
Capítulo I Introducción.....	1
I.1 Antecedentes.....	1
I.2 Propiedades ópticas y termo-mecánicas del tejido biológico.....	3
I.3 Interacción de un láser pulsado con tejido.....	3
I.4 Definición del problema.....	5
I.5 Objetivos.....	7
I.6 Metas.....	7
Capítulo II Métodos y Materiales.....	9
II.1 Modelos de Tejido.....	9
II.2 Estación de micromaquinado.....	13
II.3 Diseño experimental.....	20
II.4 Experimentos preliminares de irradiación de células.....	27
Capítulo III Resultados.....	30
III.1 Formación de burbuja.....	30
III.2 Obtención de perfiles de burbujas generadas con un solo pulso (ns).....	36
III.3 Tamaño de la burbuja de cavitación formada por un solo pulso.....	41
III.4 Difusión de temperatura.....	46
III.5 Experimentos preliminares de irradiación de células.....	58

Capítulo IV Discusión	61
IV.1 Formación de burbujas	61
IV.2 Dimensión de la burbuja en función de la fluencia de irradiación	63
IV.3 Difusión de calor	67
IV.4 Irradiación con pulsos de 90 fs	72
IV.5 Conclusiones y propuesta para futuros estudios.....	74
Literatura Citada	77
Apéndice A	79
Apéndice B	82
Apéndice C	83

Índice de Figuras

Figura	Página
1a. Niña de dos años de edad con marcas de nacimiento en el lado izquierdo de la cara	5
1b. Joven de 24 años con marcas de nacimiento en el rostro, nótese la hipertrofia del tejido suave.	5
2. Bebé de origen asiático. (A) Antes del tratamiento con láser. (B) Dos años después de ocho sesiones con láser, con una dosificación de 7-10 J/cm ² . Nótese lo incompleto del proceso después de ocho dosis.	6
3. Ablación de un material cerámico y una pieza dental a través de pulsos láser ultracortos. En ambos materiales se alcanzó la ablación por medio de trenes de pulsos de aproximadamente 2 a 5µm (duración del pulso ultracorto, 1.2 ps; separación entre pulsos 7.5 ns) Robin Marjoribanks, Santiago Camacho López, Rodger Evans, Catherine Greenhalgh, Christian Torti (University of Toronto, 2003).....	6
4. Espectro de absorción óptica para los principales cromóforos del tejido para distintas longitudes de onda [Vogel y Venugopalan, 2003].	10
5. Espectro de absorción del agar utilizado en nuestros experimentos.....	11
6. Coeficientes de absorción óptica para distintas concentraciones de colorante Direct Red en agua, para $\lambda = 532\text{nm}$	12
7. Espectro de absorción de agar con colorante (Direct Red) a una concentración de .001gr/ml, para distintas longitudes de onda.	13
8. Esquema de sistema de amplificación de pulsos ultracortos [Mina Rosales, 2007].	14
9. Esquema de estación de micromaquinado.	16
10. Diagrama de arreglo PEB.	17
11. a) Propagación de un haz enfocado, b-d) Reflexión a incidencia normal sobre una superficie plana a distintas posiciones con respecto a la cintura del haz. [Maisterrena- Epstein, 2006].	18

Figura	Página
12a.	Imagen de la cintura del haz obtenida por el <i>PEB</i>19
12b.	Perfil de de la imagen de la cintura del haz.19
13	Configuración de los modelos de tejido utilizados al estudiar la formación de burbuja bajo irradiación de un solo pulso.22
14a.	Espaciadores de distintos espesores.22
14b.	Recipientes con agar.22
15.	Esquema de irradiación del modelo de tejido para la determinación del umbral de generación de burbuja en muestra de capa sencilla.23
16.	Esquema de irradiación del modelo de tejido para la determinación de umbral de generación de daño en una muestra de 3 capas.24
17.	Esquema experimental para determinar el comportamiento térmico de modelo de tejido irradiado por pulsos láser directamente en la capa absorbidora. Las figuras inferiores tanto en A) como en B) corresponden a la vista superior del modelo de tejido; en donde se aprecian los puntos que fueron irradiados.25
18.	Modelo de tejido de $\alpha=251\text{cm}^{-1}$ antes de ser irradiado. Donde a) y b) representan los puntos en el modelo de tejido donde se llevaría a cabo la irradiación26
19.	Modelo de tejido de substrato de colágeno y una capa de células de hígado de ratón.27
20.	Procedimiento de irradiación de modelos de tejido con células vivas de ratón.28
21.	Configuración de los modelos de tejido utilizados al estudiar la formación de burbuja bajo irradiación de un solo pulso32
22.	Fluencia umbral de formación de burbuja para modelos de tejido de agar de una capa.....33
23.	Fluencia umbral de formación de burbuja para modelos de tejido de agar de tres capas34
24.	Absorción de la energía en cada capa del modelo de tejido de tres capas.....35

Figura	Página
25. Imagen a analizar tomada en el microscopio óptico (Apéndice A).....	36
26. Imagen con aumento en contraste.....	37
27. Perfil obtenido haciendo un aumento en el contraste de la imagen.....	38
28. Obtención de perfil base.....	39
29. Perfil obtenido restando el perfil base al perfil de las burbujas.....	39
30. Perfil normalizado.....	40
31. Diámetro de la burbuja en modelos de tres capas a 100 μm de profundidad de la capa absorbedora para un modelo de $\alpha=7\text{ cm}^{-1}$	42
32. Diámetro de la burbuja en modelos de tres capas a 100 μm de profundidad de la capa absorbedora para un modelo de $\alpha=45\text{cm}^{-1}$	43
33. Diámetro de la burbuja en modelos de tres capas a 100 μm de profundidad de la capa absorbedora para un modelo de $\alpha=130\text{cm}^{-1}$	43
34. Diámetro de la burbuja en modelos de tres capas a 100 μm de profundidad de la capa absorbedora para un modelo de $\alpha=215\text{cm}^{-1}$	44
35. Comparación del diámetro de la burbuja en modelos de tres capas a 100 μm de la capa absorbedora para distintos coeficientes de absorción.....	44
36. Configuración experimental para medición de difusión de temperatura.....	46
37. Cambio de temperatura inducido en una muestra con $\alpha=7\text{ cm}^{-1}$ por irradiación de pulsos de 5ns enfocando en el centro de la capa absorbedora, medido a 520 μm de la irradiación.....	48
38. Cambio de temperatura inducido en una muestra con $\alpha=7\text{ cm}^{-1}$ por irradiación de pulsos de 5ns enfocando en el centro de la capa absorbedora, medido a 820 μm de la irradiación.....	48
39. Cambio de temperatura inducido en una muestra con $\alpha=7\text{ cm}^{-1}$ por irradiación de pulsos de 5ns enfocando en la superficie de la muestra, medido a 560 μm de la irradiación.....	49

Figura	Página
40. Cambio de temperatura inducido en una muestra con $\alpha=7\text{cm}^{-1}$ por irradiación de pulsos de 5ns enfocando en la superficie de la muestra, medido a $900\mu\text{m}$ de la irradiación.	49
41. Cambio de temperatura inducido en una muestra con $\alpha=130\text{ cm}^{-1}$ por irradiación de pulsos de 5ns enfocando en la capa absorbadora, medido a $520\mu\text{m}$ de la irradiación.	50
42. Cambio de temperatura inducido en una muestra con $\alpha=130\text{ cm}^{-1}$ por irradiación de pulsos de 5ns enfocando en la capa absorbadora, medido a $820\mu\text{m}$ de la irradiación.	50
43. Cambio de temperatura inducido en una muestra con $\alpha=130\text{ cm}^{-1}$ por irradiación de pulsos de 5ns enfocando en la superficie de la muestra, medido a $560\mu\text{m}$ de la irradiación.	51
44. Cambio de temperatura inducido en una muestra con $\alpha=130\text{ cm}^{-1}$ por irradiación de pulsos de 5ns enfocando en la superficie de la muestra, medido a $900\mu\text{m}$ de la irradiación.	51
45. Cambio de temperatura inducido en una muestra con $\alpha=215\text{ cm}^{-1}$ por irradiación de pulsos de 5ns enfocando en la capa absorbadora, medido a $520\mu\text{m}$ de la irradiación.	52
46. Cambio de temperatura inducido en una muestra con $\alpha=215\text{ cm}^{-1}$ por irradiación de pulsos de 5ns enfocando en la capa absorbadora, medido a $820\mu\text{m}$ de la irradiación.	52
47. Cambio de temperatura inducido en una muestra con $\alpha=215\text{ cm}^{-1}$ por irradiación de pulsos de 5ns enfocando en la superficie de la muestra, medido a $560\mu\text{m}$ de la irradiación.	53
48. Cambio de temperatura inducido en una muestra con $\alpha=215\text{ cm}^{-1}$ por irradiación de pulsos de 5ns enfocando en la superficie de la muestra, medido a $900\mu\text{m}$ de la irradiación.	53
49. Configuración de modelo computacional de difusión de temperatura.	55
50. Resultado de simulación numérica para cambio de temperatura inducido por pulsos láser de 5 ns irradiando en la capa absorbadora.	56

Figura	Página
51. Comparación en las mediciones de cambio temperatura de una misma muestra irradiada con pulsos de ns y fs.	57
52. Imagen obtenida del microscopio confocal (20X) donde se observa el efecto de la irradiación de células vivas de ratón a una fluencia de $11\text{kJ}/\text{cm}^2$	59
53. Correspondencia entre irradiación e imagen obtenida en microscopio confocal.....	60
54. Comparación de resultados para la fluencia umbral de formación de burbuja permanente en modelos de una y tres capas de agar.	62
55. Esquema de experimentos para detección de burbujas transitorias.....	66
56. Secuencia de fotos que describen el cambio en el diámetro de burbuja transitoria en el tiempo.	66
57. Comparación de mediciones de difusión de calor para muestras con distinto coeficiente de absorción.....	68
58. Comparación de resultados experimentales y numéricos para la irradiación de una muestra de agar con $\alpha=215\text{cm}^{-1}$	70
59. Comparación de mediciones de difusión de temperatura para modelos de tejido con distinto coeficiente de absorción irradiados a la fluencia umbral F_u	71
60. Comparación en las mediciones de cambio de temperatura de una misma muestra irradiada con pulsos de 5ns y 90fs.	73

Índice de Tablas

Tabla	Página
I Dimensiones medidas de la cintura del haz	34
II Fluencias umbrales de formación de burbuja para distintos coeficientes de absorción en modelos de una capa (figura 19a).....	43
III Fluencias umbrales de formación de burbuja para distintos coeficientes de absorción en modelos de agar de tres capas (figura 19b).....	44

Capítulo I Introducción

I.1 Antecedentes

Desde la invención del láser se ha reportado acerca de la ablación de materiales usando fuentes pulsadas. Durante la década de los setentas se había estado investigando acerca de los efectos de la luz en los materiales, en particular, de la radiación ultravioleta en cristales de silicio. Posteriormente en los ochentas se reportó que era posible utilizar luz ultravioleta para hacer cortes por ablación en polímeros en dimensiones del orden de micras, generando daños mínimos en la región circunvecina al área irradiada. Esto motivó a investigar más acerca de este *micromaquinado*. Posteriormente en la década de los 90, las investigaciones fueron dirigidas hacia el efecto de los láseres pulsados de femtosegundos en el rango del visible al infrarrojo sobre ciertos cristales, un resultado importante fue que se descubrió que era posible crear cambios de índice de refracción en estos materiales; los cuales se podrían utilizar como guías de onda y por lo tanto fue posible diseñar circuitos ópticos tridimensionales dentro de estos cristales como una primera aplicación [Davis, 1996].

Posteriormente vinieron nuevas aplicaciones para esta microtecnología. Por ejemplo, estos canales, cuyos diámetros son del orden de micras, pueden utilizarse en ingeniería química para realizar procesos altamente controlados, ya que su dimensión,

aunada a la interacción con ciertos fluidos, se usa para la extracción de iones en la separación de metales. Esto deja a la industria en una posición bastante ventajosa, ya que el equipo necesario para construir estos canales existe comercialmente [Glower, 2000].

Por otro lado, también la industria del micromaquinado generó aditamentos que tienen aplicaciones médicas, donde podemos mencionar agujas y catéteres como casos particulares. A su vez, se ha generado un gran interés en lo concerniente a la interacción de láseres pulsados con tejido biológico, ya que obviamente se vislumbran importantes avances en tecnología aplicada a la medicina.

Es bastante familiar escuchar acerca de cirugías láser en oftalmología. Desde las primeras aplicaciones del láser en la medicina, se han hecho grandes esfuerzos por sustituir herramientas tradicionales de ese campo por láseres. Ya que estos son fáciles de controlar, seguros, efectivos en cortar y remover tejido; el hecho de que en la industria se haya encontrado que los cortes hechos con láseres de pulsos cortos, tienen una gran precisión y generan menos daños colaterales, originó que se investigara al respecto, obteniéndose buenos resultados [Kim, et al, 1998], ya que por ejemplo, se encontró que es posible llevar a cabo cirugías de cornea con mayor precisión [Juhasz *et al*, 1999]. La misma ventaja referente a los cortes, ha hecho que este tipo de láseres sea utilizado en otras ramas de la medicina, como en odontología y en neurocirugía [Loesel *et al*, 1998].

En medicina, los láseres de pulsos cortos también tienen aplicaciones diferentes a la de hacer cortes, ya que se puede hacer una caracterización de los componentes de un tejido a partir de un monitoreo del periodo de vida de la fluorescencia que de este tejido se obtenga al ser sometido a la excitación de un láser de femtosegundos [Jones *et al*, 1999].

Como la intención de la investigación científica es la de obtener avances, también se ha estudiado acerca del tejido biológico como medio óptico ya que, esto permitiría entender la interacción entre los láseres ultrarrápidos con estos materiales y posiblemente encontrar más aplicaciones.

I.2 Propiedades ópticas y termo-mecánicas del tejido biológico

Cualquier proyección de imagen o método espectroscópico utilizado para la investigación bio-óptica debe tratar tanto la absorción por el componente primario del tejido, i.e. agua, como el esparcimiento por varios tipos de partículas del tejido. El conocimiento de las características ópticas de tejido biológico es un requisito previo para los estudios que se realizan en proyección de imágenes bio-ópticas, así como para el diseño de instrumentos para la diagnosis médica.

Una investigación previa, muestra que por medio de un modelo de transferencia radiativa, es decir, a través de la medición de la luz esparcida, es posible encontrar los coeficientes de absorción y esparcimiento, así como el factor de esparcimiento asimétrico para un sistema aire-tejido [Zhang *et al*, 2004].

I.3 Interacción de un láser pulsado con tejido.

Una vez que se estableció lo eficiente que es hacer micromaquinado en materiales con fines industriales, se encontró que durante este proceso, en el caso particular de hacer

un agujero en un metal, la morfología del fondo de dicho agujero depende de la fluencia del láser, del número de disparos y de la polarización del haz con el que se lleva a cabo el proceso [Banks *et al*, 1999]. Y de igual manera se ha investigado sobre el comportamiento térmico de los materiales al ser sometidos a un láser pulsado [Isakov *et al*, 2000] donde se ha notado que la transferencia de calor es lineal [Kanavin *et al*, 1998].

De igual manera se ha investigado al sobre los efectos de la irradiación del tejido orgánico por medio de pulsos láser, esto se ha hecho tomando muestras de dicho tejido, considerándolas como un medio óptico genérico y analizando su comportamiento al someterlo a la acción de un láser pulsado.

Se sabe que al usar un láser de pulsos ultracortos para la ablación de tejido, se observa un efecto termoelástico que se refleja en la generación de burbujas de cavitación en el volumen irradiado [Paltauf, 1995]. Esto lo sabemos ya que existe cierta onda de choque, que también ha sido observada en operaciones de oftalmología, donde los daños colaterales generados por esta onda deben ser corregidos por medio de agentes químicos [Lu, 1993].

Por otro lado, tenemos que tomar en cuenta que al usar un láser de pulsos ultracortos tendremos como ventaja que el umbral de fluencia necesario para la ablación de tejido, decrece al disminuir el ancho temporal del pulso, lo cual repercute en menos daños colaterales [Kurtz *et al*, 1994].

I.4 Definición del problema

La investigación desarrollada en esta tesis consiste, en una primera etapa, en estudiar los efectos foto-inducidos en modelos de tejido a partir de un haz enfocado de pulsos láser. Se desea explorar la posibilidad de eliminar lesiones vasculares de la piel, tales como las llamadas manchas de vino de oporto, que son marcas de nacimiento. Para lograrlo, proponemos un mecanismo de ablación basado en la dependencia con la intensidad del pulso láser, asociada a la interacción láser-materia cuando se usan pulsos cortos de intensidad pico muy alta. De manera tal que como en otros materiales, se pueda llevar a cabo una ablación controlada con mínimos daños colaterales.

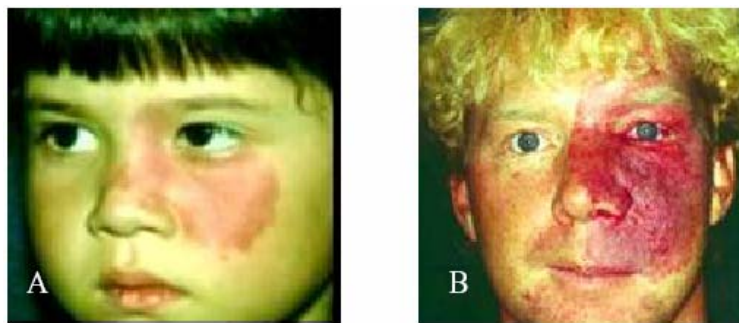


Figura 1. (A) Niña de dos años de edad con marcas de nacimiento en el lado izquierdo de la cara. (B) Joven de 24 años con marcas de nacimiento en el rostro. Nótese la hipertrofia del tejido suave

Inicialmente usaremos muestras plásticas dopadas con colorantes orgánicos para simular los vasculares sanguíneos, los cuales intentaremos eliminar por ablación. Una de las características más importantes que se planea explotar, es el reducido, e incluso no existente, grado de lesión térmica colateral, consecuencia de la velocidad de la interacción

y la alta intensidad pico de los pulsos láser cortos, donde la mayor parte de la energía óptica contenida en el pulso se transfiere rápidamente a la ionización del material, y un porcentaje mínimo de la energía óptica se deposita en el material en forma de energía térmica.



Figura 2. Bebé de origen asiático. (A) Antes del tratamiento con láser. (B) Dos años después de ocho sesiones con láser, con una dosificación de 7-10 J/cm². Nótese lo incompleto del proceso después de ocho dosis.

Esta primera etapa experimental nos permitirá determinar los parámetros ópticos de la interacción como lo son, fluencia umbral de ablación, longitud del pulso, frecuencia de repetición.

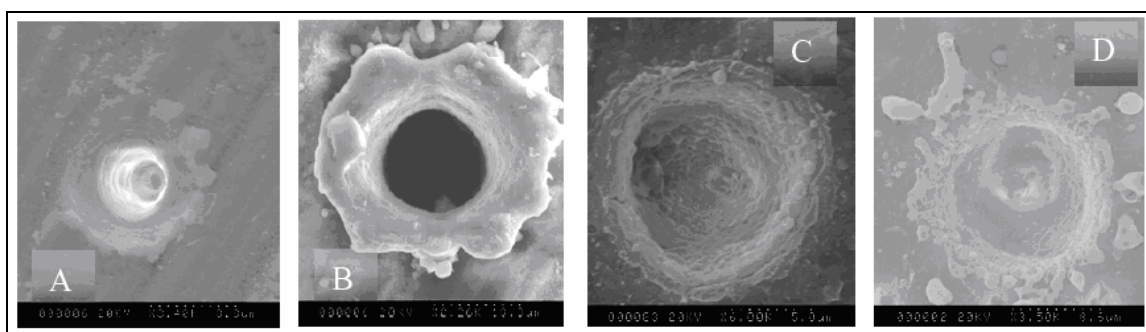


Figura 3. Ablación de un material cerámico y una pieza dental a través de pulsos láser ultracortos. En ambos materiales se alcanzó la ablación por medio de trenes de pulsos de aproximadamente 2 a 5 μm (duración del pulso ultracorto, 1.2 ps, separación entre pulsos 7.5 ns) Robin Marjoribanks, Santiago Camacho López, Rodger Evans, Catherine Greenhalgh, Christian Torti (University of Toronto, 2003).

I.5 Objetivos

El objetivo en este trabajo es comenzar los estudios preliminares de la interacción de los pulsos láser cortos con modelos de tejido, diseñados por el doctor Guillermo Aguilar (Universidad de California en Riverside) construidos principalmente de gel de agar, que es un modelo de tejido que tiene las mismas propiedades termo-mecánicas del tejido dermatológico. La meta en esta etapa es fijar los parámetros del láser para alcanzar las condiciones de formación de daño en las muestras, ya sea éste térmico o mecánico y de ahí poder caracterizar dicho daño, así como la fluencia umbral necesaria para inducirlo.

I.6 Metas

Lo que se pretende en esta investigación es alcanzar una buena comprensión de la interacción de pulsos láser cortos con modelos de tejido biológico. A largo plazo en esta investigación se propone conseguir un modelo de fotocoagulación localizada de los vasos sanguíneos más pequeños en una lesión dermatológica, como las marcas de nacimiento, mientras que se conserva intacto el tejido perivasculario circundante. Esto es un aspecto crucial para tratar las lesiones ubicadas cerca de regiones vulnerables, e.g., párpados. De tener éxito, este procedimiento puede probar ser útil para la eliminación de lesiones pigmentadas, incluyendo maligna del lentigo, un precursor del melanoma devastador. Planeamos utilizar marcas de nacimiento y otras lesiones pigmentadas como modelo para

ampliar nuestro conocimiento acerca del uso de pulsos láser cortos en el tratamiento de otras patologías del tejido.

Capítulo II Métodos y Materiales

II.1 Modelos de Tejido

En nuestro trabajo de investigación usamos sustitutos artificiales de tejido biológico llamados “*modelos de tejido*”. Diseñados por el Dr. Guillermo Aguilar (University of California Riverside), constituidos principalmente de agar y colorantes orgánicos.

El agar es un ficocoloide, es decir, un agente coloidal extraído principalmente de algas marinas. En estado sólido el agar es poroso, translucido y membranoso, presenta una coloración blanco-amarillento, es muy quebradizo cuando está seco y prácticamente insoluble en agua a 25°C, pero se solubiliza en agua a 100°C. La temperatura de gelificación varía entre 30°C y 40°C para soluciones al 1.5% en peso y se funde alrededor de los 85°C [Matsui *et al*, 2001]. Esta característica térmica lo hace particularmente útil para hacer nuestros “*modelos de tejido*”, o sustitutos de tejido biológico, ya que al mantenerse en estado coloidal a temperaturas mayores a los 50°C, permitirá analizar los efectos de difusividad térmica al ser irradiado por un láser.

El método para la preparación de nuestros modelos de tejido consistió en mezclar 2 gr de agar en 100 ml de agua destilada. Mezcla que posteriormente se ponía a hervir hasta obtener un fluido viscoso, mismo que posteriormente se vaciaba en contenedores hechos

con portaobjetos de vidrio, los cuales tenían las dimensiones necesarias para que al momento de solidificarse el fluido, pudiéramos construir nuestros modelos de tejido.

El tejido es un medio de cierta complejidad óptica en el que se presenta absorción óptica y esparcimiento. El tejido que constituye la piel está formado por varias capas cuya complejidad celular provoca que el tejido adquiera sus propiedades de esparcimiento de la luz. Por su parte, los diferentes componentes bioquímicos del tejido confieren a éste sus propiedades de absorción de la luz muy bien definidas (Figura 4).

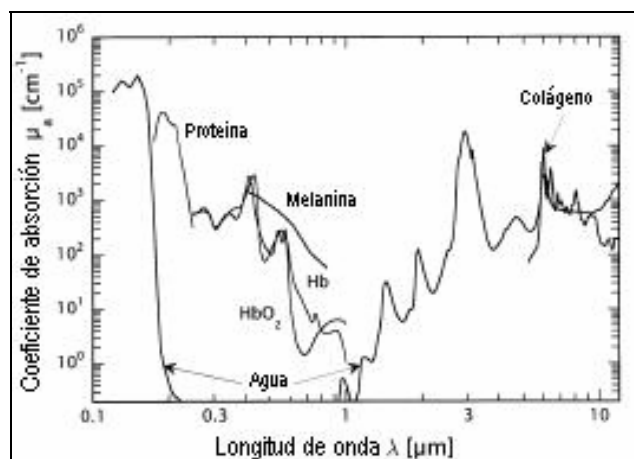


Figura 4. Espectro de absorción óptica para los principales cromóforos del tejido para distintas longitudes de onda [Vogel y Venugopalan, 2003].

Usando un espectrofotómetro, (Perkins-Elmer, modelo 330) se obtuvo el espectro de absorción de una capa de agar de 500 μ m; dicho espesor fue usado en muchas configuraciones de modelos de tejido en nuestros experimentos (Figura 5).

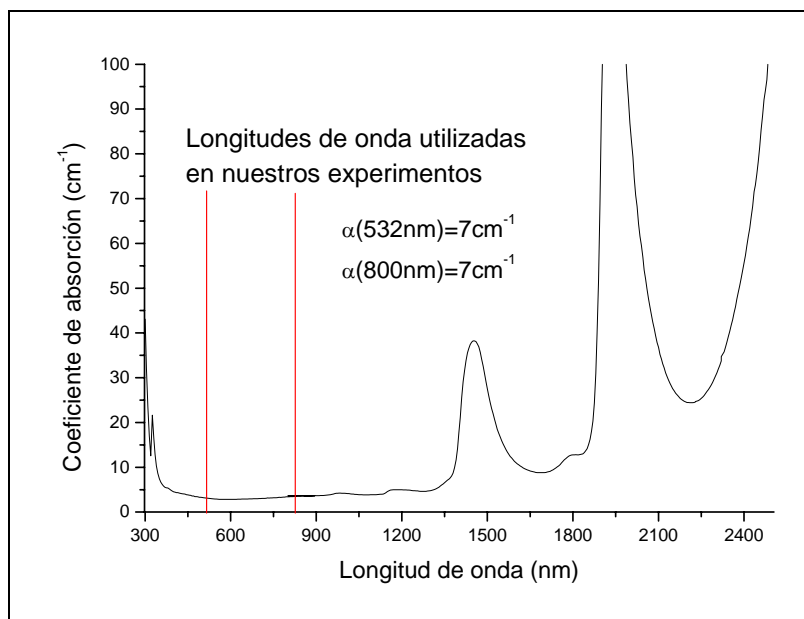


Figura 5. Espectro de absorción del agar utilizado en nuestros experimentos

Dado que uno de los objetivos principales de la investigación en un futuro es el de estudiar la irradiación de vasos sanguíneos, a nuestros modelos de tejido se les agregó un colorante orgánico (Direct Red, Fisher Scientific), con propiedades de absorción que emulan las de la sangre. Previamente sabíamos los coeficientes de absorción de concentraciones obtenidas a partir de una mezcla base formada de 1.4 gr de colorante (Direct Red, Fisher Scientific) disueltos en 100 ml de agua. En donde dichas concentraciones se obtienen al diluir un porcentaje de la mezcla base en 100 ml de agua obteniendo distintos coeficientes de absorción; tal y como se muestra en la figura 6.

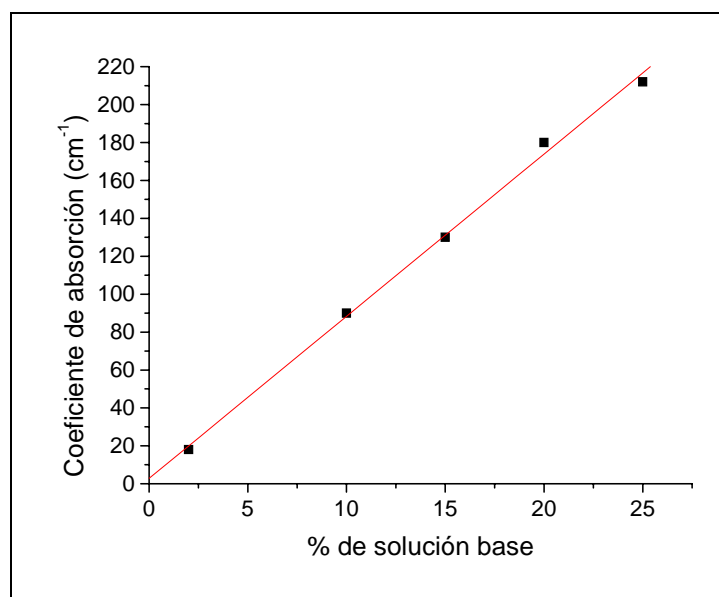


Figura 6. Coeficientes de absorción óptica para distintas concentraciones de colorante Direct Red en agua, para $\lambda = 532\text{nm}$.

Con estas concentraciones del colorante se construyeron modelos de tejido a base de agar, de los cuales se obtuvo su espectro de absorción para corroborar los datos mostrados en la figura 6.

Un ejemplo de estos se puede observar en la figura 7, donde tenemos una muestra de agar con 15% de la concentración base de colorante y el coeficiente de absorción a 532 nm es similar en ambas figuras.

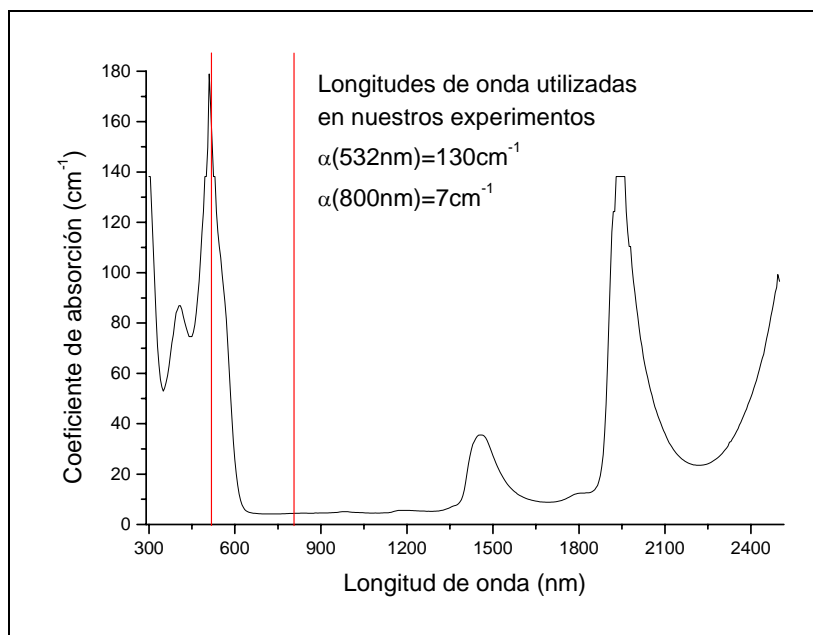


Figura 7. Espectro de absorción de agar con colorante (Direct Red) a una concentración de .001 gr/ml, para distintas longitudes de onda.

II.2 Estación de micromaquinado

En nuestros experimentos usamos dos tipos de láser, un Nd:YAG (Continuum, especificaciones en Apéndice A) pulsado, con una duración del pulso de $\tau=5\text{ns}$, doblado en frecuencia ($\lambda=532\text{nm}$), con una frecuencia de repetición variable de 1 a 15Hz, donde la energía por pulso depositada en el modelo de agar es medida por medio de un fotodiodo (Thorlabs, 201/579-77221), calibrado contra un medidor de energía (OPHIR Mod. PE10-SH), y monitoreada en un osciloscopio (Tektronix, TDS 520A).

De igual forma se utilizó un sistema láser de Ti:Zafiro pulsado que consta de dos componentes principales: un oscilador y un amplificador [Ruiz-de-la-Cruz, 2006]. Dentro de la etapa del *oscilador* se realiza la producción de pulsos ultra cortos mediante el método

de amarre de modos. El medio activo es un cristal de Ti: Zafiro bombeado con la línea verde (514.5 nm) de un láser de iones de Ar⁺ de emisión continua con una potencia de 4.4 W. Las características de los pulsos de femtosegundos generados en el oscilador son: duración de 52 fs (FWHM), medida por autocorrelación [Ruiz-de-la-Cruz, 2006], energía de 6 nJ por pulso, longitud de onda central de 803 nm (25nm de ancho espectral), y una razón de repetición de 70 MHz. Dado que la energía por pulso proporcionada por el oscilador es muy baja (del orden de nJ) es necesario amplificar estos pulsos para usarlos en el procesamiento de materiales. Por lo tanto se debe contar con un sistema de amplificación de pulsos ultracortos. Este consta de varias etapas que se describen en la figura 8.

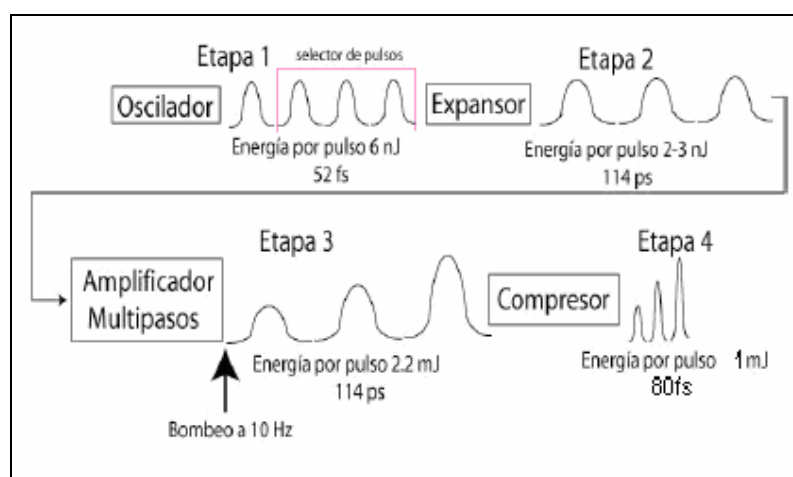


Figura 8. Esquema de sistema de amplificación de pulsos ultracortos [Mina Rosales, 2007].

Una vez realizado el proceso mostrado arriba se obtienen pulsos de ~ 80 fs con una longitud de onda centrada en 803 nm, alcanzando energías entre $600 \mu\text{J}$ y 1 mJ por pulso, con una tasa de repetición de 10 Hz, la cual está determinada por la frecuencia de repetición del bombeo del amplificador (láser Nd:YAG, 532 nm).

A la salida del sistema de femtosegundos se obtiene un tren de pulsos (el cual se deposita en la muestra) cada uno de los pulsos tiene una duración de 80 fs, con una separación entre pulsos consecutivos de aproximadamente 12 ns.

En el caso de los pulsos de nanosegundos, la cantidad de energía por pulso que se deposita en la muestra se controla por medio de un atenuador hecho con una placa de media onda y un polarizador lineal. Para los pulsos de femtosegundos se usan filtros de densidad neutral para controlar la energía del tren de pulsos suministrado a la muestra. Esto debido a la carencia de una placa de media onda para 800 nm.

El modelo de tejido a irradiar se coloca sobre un soporte x , y , z . Donde los movimientos en el plano x , y son controlados por computadora con una resolución de 0.1 μm , mientras z se controla manualmente por medio de un micrómetro, con una resolución de 5 μm . El haz se enfoca sobre el modelo de tejido usando una lente $f/\# = 1.27$. El $f/\#$ (f-número) es un cociente definido por la distancia focal de la lente entre el diámetro del haz incidente a esta. Es un parámetro óptico con el que se puede definir la cintura del haz.

Un esquema de la estación de microprocesado utilizada en nuestros experimentos se aprecia en la figura 9.

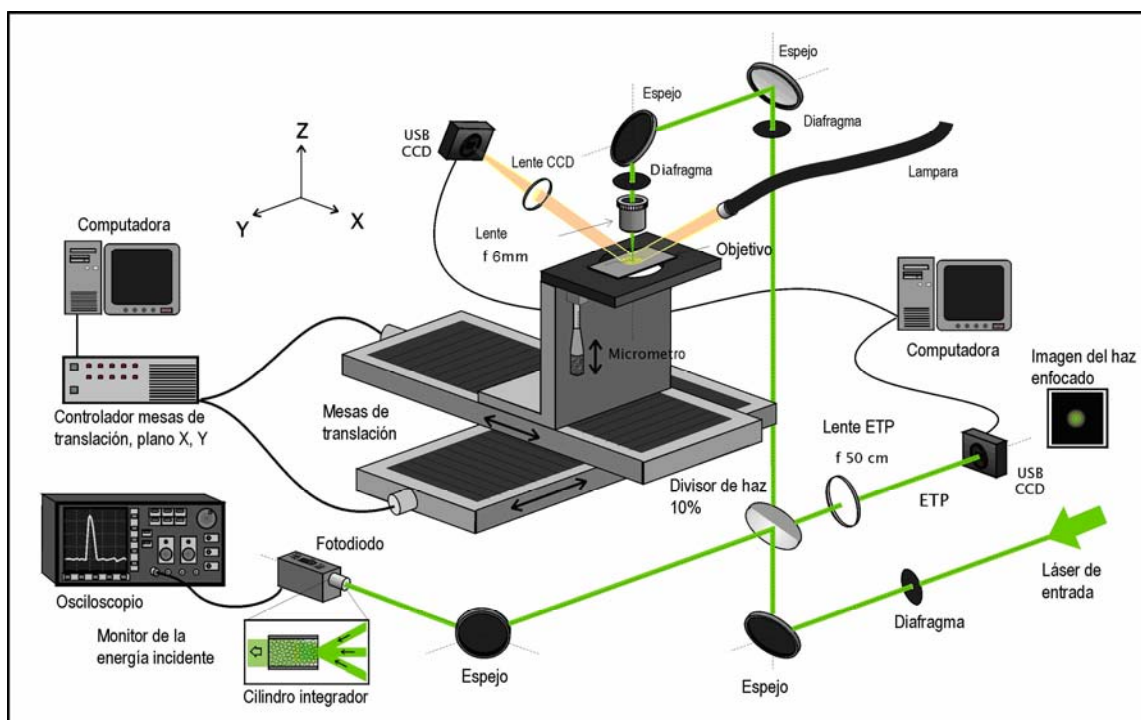


Figura 9. Esquema de estación de micromaquinado.

Un factor importante en el procedimiento experimental es la localización de la cintura del haz sobre la superficie del modelo de tejido y la medición del tamaño real de la cintura del haz; esto se lleva a cabo empleando un sistema óptico denominado *Plano Equivalente del Blanco (PEB)*, que permite obtener la imagen magnificada de la cintura del haz reflejada en la superficie de la muestra. Este arreglo tiene tres funciones fundamentales en nuestro sistema de microprocesado. Localizar la cintura del haz sobre la superficie del material a irradiar; determinar el tamaño y la forma real de la cintura del haz, con la finalidad de calcular posteriormente el área de la sección transversal en la cintura del haz y finalmente el *PEB* también es utilizado para monitorear el instante en donde se presente ablación o alguna otra modificación material tanto en la superficie como en el interior de la muestra.

El *PEB* consiste en un arreglo óptico como el que se muestra en la figura 10, en donde el haz que es enfocado por la lente con distancia focal f_1 incide sobre la superficie de la muestra (ópticamente plana en el caso ideal), si la incidencia es normal a la superficie de la muestra, la luz será reflejada en sentido opuesto a la incidente, siguiendo el mismo camino óptico y con el mismo frente de onda (retrazándose a si mismo) de este haz incidente y al ser reflejado por el divisor de haz, el pulso láser será enfocado en un CCD (Agilent Technologies) por medio de la lente de distancia focal f_2 , obteniendo así una magnificación (Mag) de la cintura del haz dado por la ecuación

$$Mag = \frac{f_2}{f_1}, \quad (1)$$

donde f_1 corresponde a la lente de microprocesado y f_2 corresponde a la lente del PEB. La imagen que se capture permitirá analizar la forma y el tamaño de la cintura del haz en la superficie del modelo de tejido.

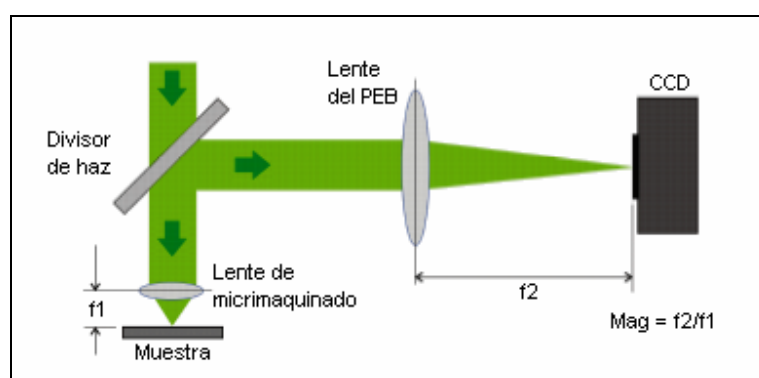


Figura 10. Diagrama de arreglo PEB.

Es importante hacer hincapié en el hecho de que para el funcionamiento del *PEB*, es importante que el haz esté enfocado a incidencia normal sobre la superficie de la muestra,

de tal manera la reflexión del frente de onda que se contra-propaga sea el mismo que el del haz incidente. Además, como se puede observar en la figura 11, no sería posible obtener la captura correcta de haz, si la posición de la muestra está desplazada con respecto a la cintura del haz.

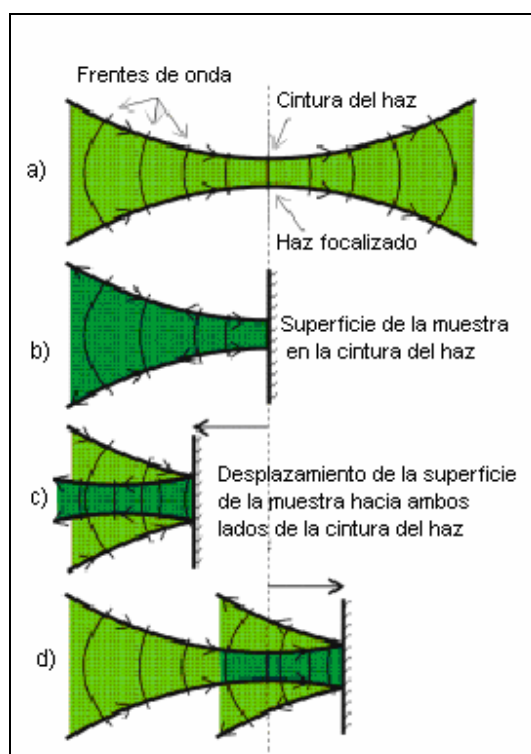


Figura 11. a) Propagación de un haz enfocado, b-d) Reflexión a incidencia normal sobre una superficie plana a distintas posiciones con respecto a la cintura del haz. [Maisterrena- Epstein, 2006].

La imagen adquirida por el PEB proporciona información acerca del perfil de distribución de intensidad del haz enfocado, el ancho de la distribución de intensidad en la imagen está dado en unidades de pixeles, de tal manera que conociendo el tamaño de los pixeles del CCD y el factor de magnificación en la imagen es posible determinar el tamaño

real del haz enfocado sobre la superficie de la muestra (Figura 12). Vale la pena hacer notar que esto se puede hacer para cada uno de los pulsos depositados en la muestra, esto se logra capturando una imagen para cada disparo del láser. Es posible sincronizar una cámara CCD con el láser.

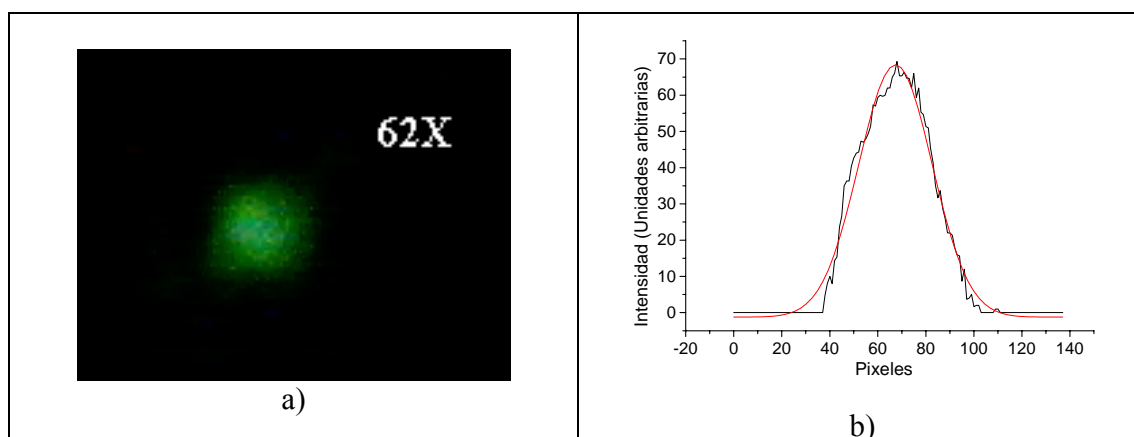


Figura 12. a) Imagen de la cintura del haz obtenida por el *PEB*. b) Perfil de la imagen de la cintura del haz.

Como se mencionó previamente, en nuestros experimentos utilizamos un láser con pulsos de 5ns de duración, con un modo transversal electromagnético TEM_{00} , sin embargo, el haz no era perfectamente gaussiano. Se aproximó a un haz elíptico [Maisterrena Eipstein, 2006] el cual se sabe presenta astigmatismo al momento de enfocarse.

La siguiente tabla muestra un promedio de las dimensiones del haz enfocado obtenidas experimentalmente para ambos láseres cuando son enfocadas por nuestra lente de microprocesado ($f = 6\text{mm}$) medidas a la mitad de la altura (FWHM).

Tabla I. Dimensiones promedio medidas de la cintura del haz

Tipo de láser		Tamaño del eje (μm)
Nd:YAG	Eje mayor	4.6 ± 0.4
	Eje menor	5 ± 0.3
Ti:Zafiro	Eje mayor	3.6 ± 0.2
	Eje menor	4 ± 0.2

Para los resultados mostrados en nuestro trabajo empleamos las dimensiones del haz medidas experimentalmente, y debido a las fluctuaciones que presenta el sistema láser el tamaño de la cintura del haz se midió periódicamente al realizar sesiones experimentales.

II.3 Diseño experimental

Es de importancia crucial saber acerca de los efectos o del daño que se puede foto-inducir en los modelos de tejido, es por ello que los experimentos están diseñados para el estudio de:

a) Formación de burbuja en el modelo de tejido.

Se sabe que al usar un láser pulsado al irradiar tejido, se experimenta un efecto termoelástico que se refleja en la generación de burbujas de cavitación en el volumen irradiado [Kim *et al* 1998]. Este efecto tiene origen en una onda de presión (perturbación

mecánica), que también ha sido observada en cirugías de oftalmología, donde los daños colaterales, como el rasgado de tejido generado por esta onda, son corregidos por medio de agentes químicos que fomentan una cicatrización del mismo [Juhasz *et al*, 1999 y Matthews *et al*, 1998].

Al enfocar el haz dentro del *modelo de tejido*, estamos concentrando una gran cantidad de energía en un volumen muy pequeño. Haciendo que cierta cantidad de agar con colorante inicialmente en estado coloide, se evapore, generando así un cambio de presión que hace que esta burbuja se expanda y al mismo tiempo ceda calor al volumen circunvecino. De manera que cuando se estabiliza el efecto de la presión por expansión de la burbuja y la presión hidrostática del agar, se llega a un radio máximo para esta burbuja [Loesel *et al*, 1998].

Siendo la fluencia promedio suministrada al *modelo de tejido* la energía que acarrea el pulso dividida por el área de la sección transversal en la cintura del haz enfocado en el *modelo de tejido*. Para nuestro estudio definimos la fluencia umbral de daño (F_u) como la fluencia necesaria para generar un daño permanente en el material (burbuja) usando un solo pulso. Esta fluencia umbral será un parámetro de referencia de gran utilidad en el análisis de nuestros resultados.

Para la determinación de la fluencia umbral de generación de burbuja, se trabajó con dos configuraciones de *modelos de tejido* para el caso de los pulsos de nanosegundos (figura 13). Uno de estos consiste de una capa de gel de agar con espesor de 500 μm de espesor con distintos coeficientes de absorción óptica. El otro se compone de una capa de

254 μm de agar teñido entre dos capas de 500 μm de agar transparente, esto con la intención de emular un tejido simplificado de varias capas.

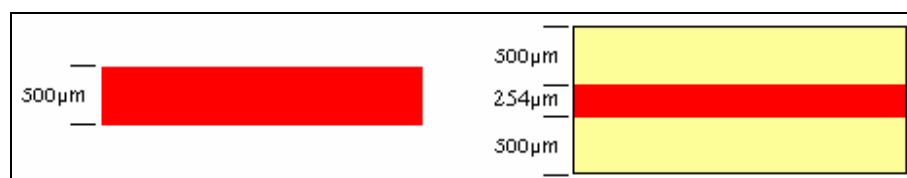


Figura. 13 Configuración de los modelos de tejido utilizados al estudiar la formación de burbuja bajo irradiación de un solo pulso.

Para poder obtener capas de agar con el espesor deseado, usamos espaciadores de plástico (McAllister) con un espesor conocido, con los cuales se construyen cubetas en donde se vacía el agar a fin de generar la muestra con las dimensiones necesarias; como lo vemos en la figura 14.

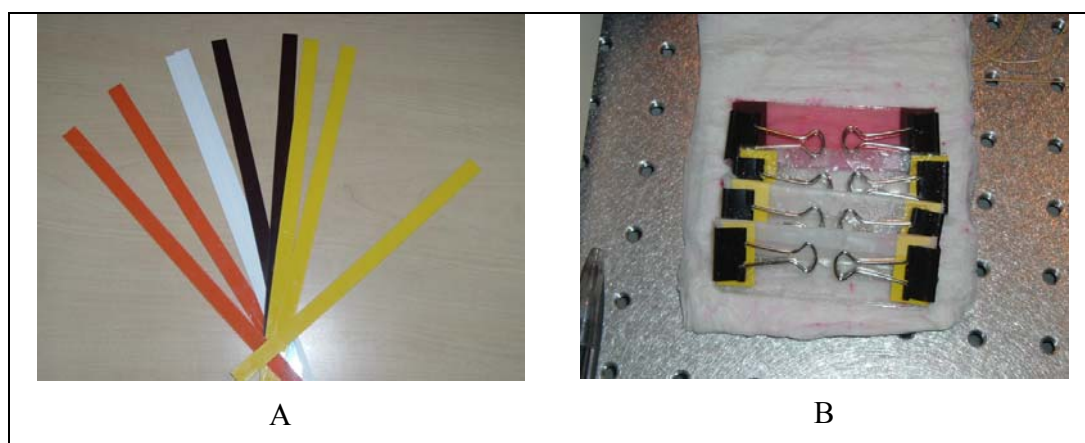


Figura 14. Espaciadores de distintos espesores(a). Recipientes con agar (b)

Los *modelos de tejido* fueron irradiados por un solo pulso a distintas energías, colocando la cintura del haz a $100\mu\text{m}$ de profundidad con respecto a la superficie del *modelo de tejido* (figura 15).

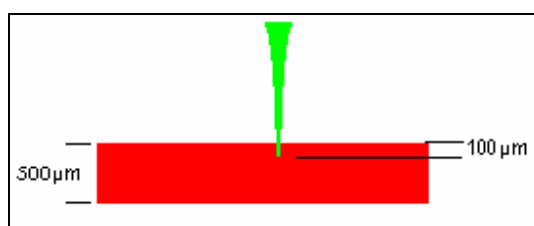


Figura 15. Esquema de irradiación del modelo de tejido para la determinación del umbral de generación de burbuja en muestra de capa sencilla.

Se sabía de nuestros experimentos preliminares que estábamos formando burbujas en los modelos de tejido de gel de agar. Por lo que para encontrar la fluencia mínima necesaria para formar estas burbujas, se hizo un procedimiento en el que a cada muestra (de distinto coeficiente de absorción) se hicieron secuencias de irradiación con pulsos cuya fluencia promedio se hacía cada vez menor hasta que ya no se pudiera observar la burbuja y con esto se obtuvo la *fluencia umbral de formación de burbuja*.

El modelo de *tejido*, compuesto por tres capas, emula un tejido biológico simplificado compuesto de varias capas. Donde se tiene una primer capa de agar sin colorante con un espesor de $500\mu\text{m}$, la siguiente capa de $254\mu\text{m}$ de espesor se le llamó “capa absorbedora” la cual tiene un cierto coeficiente de absorción dado por la concentración de colorante (Direct Red, Fisher Scientific) en el agar y finalmente una tercer capa de agar sin colorante de $500\mu\text{m}$ de espesor (figura 7).

De igual manera, en las muestras de tres capas se hicieron secuencias de irradiación con un pulso a diferentes energías colocando la cintura del haz a 100 μm de profundidad de la superficie de la capa absorbedora, es decir, a 600 μm de profundidad con respecto a la superficie del *modelo de tejido* (figura 16).

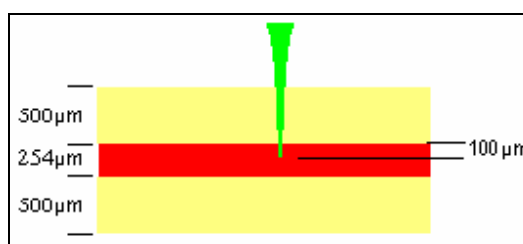


Figura 16. Esquema de irradiación del modelo de tejido para la determinación de umbral de generación de daño en una muestra de 3 capas.

En el caso de los pulsos de femtosegundos, se trabajó con la misma metodología hasta determinar la fluencia umbral de formación de burbuja para trenes de pulsos a una frecuencia de repetición de 10Hz, irradiando a la misma profundidad que en los experimentos con pulsos de nanosegundos.

b) Difusión de temperatura

Es de gran importancia analizar los efectos térmicos cuando el tejido es irradiado por láseres. Hay que empezar considerando que al irradiar una muestra de tejido, se genera calor a partir de la energía absorbida por la muestra. De ahí, según las características térmicas del tejido, se presentará un proceso de difusión de calor. Un exceso de calor según el tipo de tejido, puede llegar a producir daño importante en el mismo. Debe considerarse

también que un rápido depósito de energía genera una perturbación mecánica, la cual también puede afectar el tejido circunvecino.

Cuando un tejido dérmico llega a los 45°C se presenta una hipertermia, a los 60°C se llega a una coagulación, a los 100°C se evapora y a mayores temperaturas se carboniza.

Para analizar el comportamiento térmico del tejido al ser irradiado por pulsos láser, se construyeron *modelos de tejido* de cuatro capas, tal y como se aprecia en la figura 17; en donde se colocaron termopares para obtener mediciones que nos permitieran observar la difusión de calor que se induce en la muestra por la irradiación con pulsos láser.

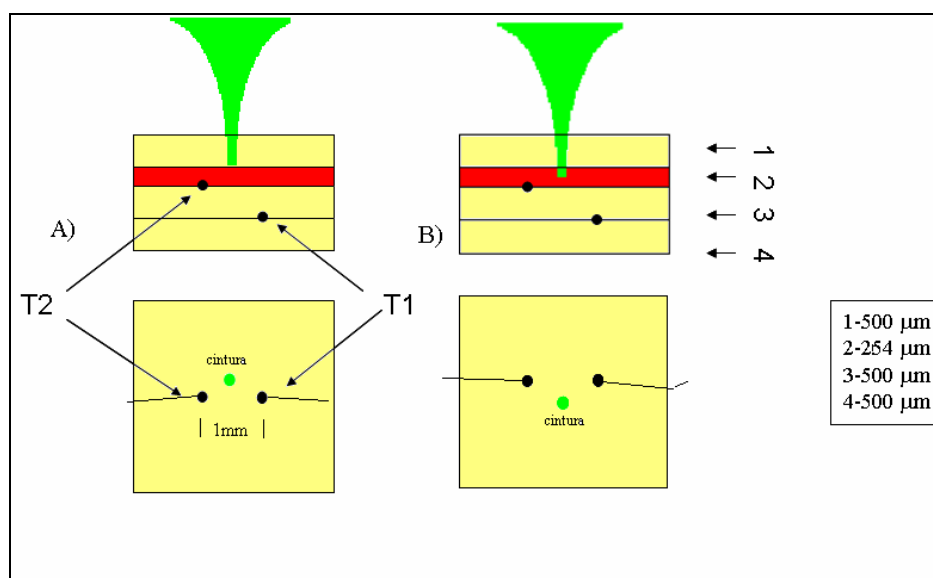


Figura 17. Esquema experimental para determinar el comportamiento térmico de modelo de tejido irradiado por pulsos láser directamente en la capa absorbente. Las figuras inferiores tanto en A) como en B) corresponden a la vista superior del modelo de tejido; en donde se aprecian los puntos que fueron irradiados.

Se irradió a dos profundidades distintas; como se aprecia en la figura 17a, donde el haz se enfocó en la superficie de la capa absorbente y también, como se puede ver en la

figura 17b, el haz se enfocó a 100 μm de profundidad dentro la capa absorbidora. En ambos experimentos ($\lambda=532\text{ nm}$) se irradió durante un minuto con pulsos de 5 ns de duración, a una frecuencia de repetición de 10 Hz.

Para monitorear la temperatura alcanzada en la vecindad del volumen irradiado, se implementaron un par de termopares (tipo K, Omega), uno de ellos T2, colocado entre la capa absorbidora y la capa inferior a esta y el segundo T1, entre las capas tres y cuatro (transparentes) del *modelo de tejido*. Los termopares se conectaron a una tarjeta de adquisición de datos (Marca Instronet, modelos 200 PCI) a su vez conectada a una computadora en donde se almacenaron las mediciones.

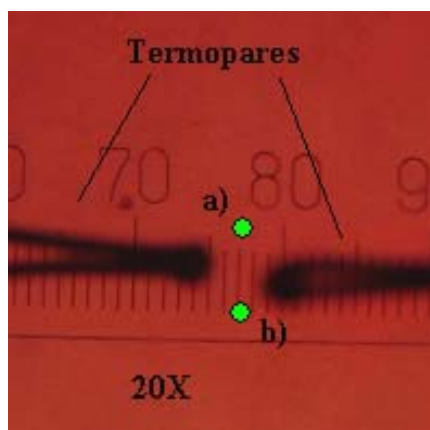


Figura 18. Modelo de tejido de $\alpha=251\text{cm}^{-1}$ antes de ser irradiado. Donde a) y b) representan los puntos en el modelo de tejido donde se llevaría a cabo la irradiación

Se hicieron irradiaciones a diferentes fluencias, teniendo como base la fluencia umbral de formación de burbuja para un solo pulso.

De igual forma, una vez obtenida la fluencia umbral de formación de burbuja con pulsos de femtosegundos, se trabajó en obtener la medición de difusión de calor a través de

un experimento en donde se irradió el modelo de tejido compuesto de 4 capas con trenes de pulsos de femtosegundos en donde se tomaron mediciones con el mismo método que se siguió en el caso de pulsos de nanosegundos.

II.4 Experimentos preliminares de irradiación de células

A modo de experimento preliminar y después de haber adquirido experiencia en la irradiación de modelos de tejido, se propuso analizar la irradiación de modelos de tejido con células vivas.

Para esto se utilizaron modelos conocidos como *RAFTS*, diseñados y construidos por el grupo del doctor Guillermo Aguilar. En donde el modelo se compone de un sustrato cultivado hecho de colágeno, sobre el cual se aplica una capa de *células de hígado de ratón*, con una configuración como la que se muestra en la figura 19.

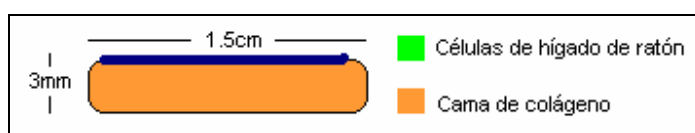


Figura 19. Modelo de tejido de sustrato de colágeno y una capa de células de hígado de ratón.

El procedimiento consistió en irradiar la superficie de estos modelos de tejido con pulsos de 5 ns a una frecuencia de 10 Hz (figura 20a) para observar el efecto de esta irradiación sobre las células vivas. Para la irradiación de estos *RAFTS* se utilizó la fluencia de formación de burbuja correspondiente al modelo de tejido de agar de $\alpha=215 \text{ cm}^{-1}$ (5.8

kJ/cm^2). La irradiación se llevó a cabo en la forma de un patrón de onda cuadrada tal y como se muestra en la figura 20b.

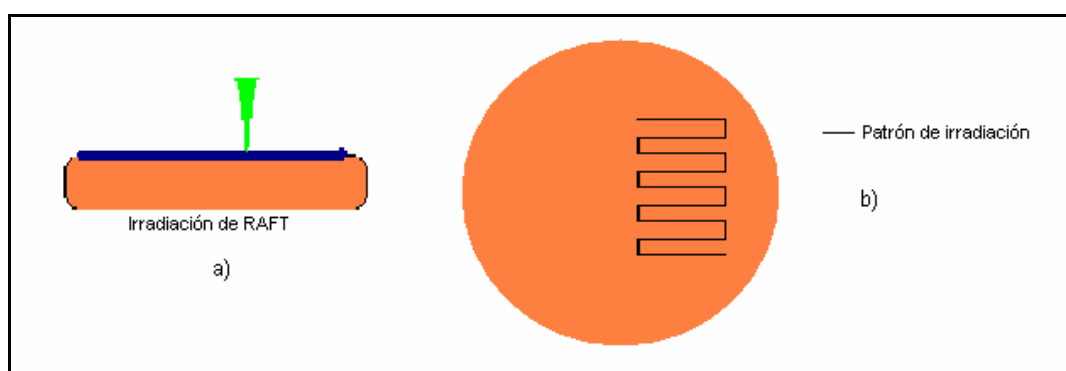


Figura 20. Procedimiento de irradiación de modelos de tejido con células vivas de ratón.

Es importante mencionar que para poder analizar los resultados de esta irradiación se utilizó una técnica de fluorocromos vistos a través del microscopio confocal (Dra. Merixel Riquelme, Depto. de microbiología, CICESE). Un microscopio confocal es un microscopio capaz de obtener imágenes plano por plano de una muestra y es posible hacer una reconstrucción tridimensional de ésta. La imagen confocal observada es el resultado de la radiación fluorescente emitida por las moléculas de fluorocromo que han absorbido la excitación primaria (UV) y reemitido una luz con mayor longitud de onda (visible).

Se utiliza un láser como fuente luminosa y con él se va barriendo la muestra por todo su volumen, plano a plano, creando muchas imágenes bidimensionales y generando finalmente una imagen tridimensional del objeto [Lodish *et al*, 2005].

Los fluorocromos son sustancias químicas que tienen la propiedad de absorber luz en una longitud de onda determinada (excitación) y emitir luz (fluorescencia) en una

longitud de onda distinta y de mayor tamaño. La mayoría de los fluorocromos emiten luz visible o luz infrarroja en algunos pocos casos. Los microscopios de fluorescencia modernos usan solamente la fluorescencia emitida por la muestra para formar la imagen, la luz de excitación es bloqueada por medios de filtros.

Para nuestro experimento se utilizaron dos tipos de fluorocromos: el SYTO-11 y el homodímero de etidio.

El SYTO-11 es un colorante de ácido nucleico que se difunde pasivamente en las membranas de las células vivas, por lo que se usa para identificar este tipo de células. Este colorante se excita al ser irradiado en 500nm y emite fluorescencia en 550nm. [Molecular Probes, Apéndice B].

Por otro lado, también se utilizó el homodímero de etidio que es otro colorante celular que se excita al irradiarse con 550nm y emite fluorescencia en 625nm [Molecular Probes, Apéndice B]. Este colorante se absorbe principalmente en células muertas, por lo que su fluorescencia se usa para identificar este tipo de células.

Con esto se esperaba identificar el daño inducido en las células vivas por medio de la irradiación de los pulsos de 5 nanosegundos

Capítulo III Resultados

III.1 Formación de burbuja

La interacción de ablación láser se puede caracterizar bien, usando el parámetro conocido como la fluencia umbral de ablación. La formación de las burbujas en el material ocurrió tanto para la irradiación láser de pulsos de ns [Rau *et al*, 2006] como para los pulsos de fs; tanto en el agar transparente como en el teñido en donde las burbujas llegaron a formarse de manera permanente y también en forma transitoria, mediante la irradiación de un solo pulso. Cabe mencionar que definimos *burbuja permanente* a la que se forma dentro del modelo de tejido de agar tanto de una como de tres capas y queda grabada en el material hasta que este se seca; aproximadamente 2 horas después de la irradiación. La formación de la burbuja permanente está caracterizada por una bien definida fluencia láser (F_u).

Un resultado interesante es el siguiente; basado en un efecto predominantemente térmico, se esperaba que conforme se aumentara el coeficiente de absorción en los modelos de tejido se necesitaría menos fluencia para formar la burbuja de cavitación, esto considerando que el calentamiento láser es proporcional al producto del coeficiente de

absorción y la fluencia aplicada, siendo el cambio de temperatura descrito por la expresión [Savas y Koubenakis, 2002]:

$$\Delta T(z) = \frac{\alpha F}{\rho_c C} e^{-\alpha z}, \quad (2)$$

donde $\Delta T(z)$ es el cambio de temperatura inducido por el pulso láser en el punto de irradiación, α es el coeficiente de absorción del modelo de tejido para la longitud de onda empleada, ρ_c es la densidad del gel de agar, F es la fluencia aplicada sobre la muestra, C es el calor específico del mismo gel, z es la profundidad a la cual se realiza la irradiación.

Se esperaba que conforme se aumentara el coeficiente de absorción lineal de la muestra, la fluencia umbral para la formación de burbuja sería menor para alcanzar una temperatura de cambio de fase y así formar la burbuja. Cabe recordar que se definió la fluencia umbral de formación de burbuja a aquella fluencia [kJ/cm^2] mínima necesaria para formar una burbuja en la muestra que se mantiene hasta que esta se seca.

Se encontró el comportamiento contrario a lo esperado, es decir, conforme se aumentó el coeficiente de absorción en la capa absorbidora, también se hizo necesario aumentar la fluencia para formar la burbuja con un solo pulso, sucediendo así para todas las concentraciones de colorante utilizados (0cm^{-1} , 45cm^{-1} , 130cm^{-1} y 215cm^{-1}) y también en las dos configuraciones de modelos de tejido usados en nuestros experimentos (figura 21).

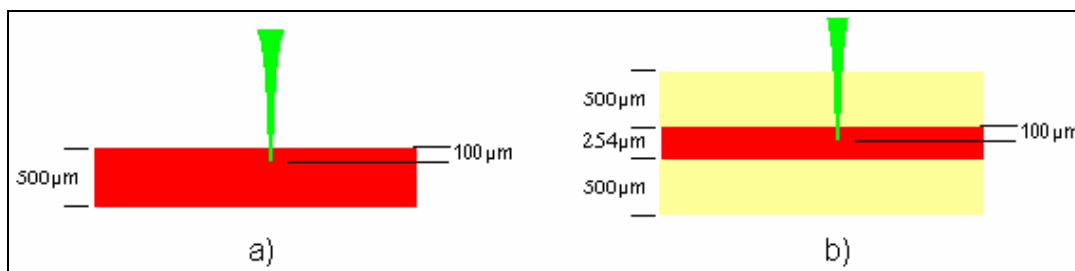


Figura 21. Configuración de los modelos de tejido utilizados al estudiar la formación de burbuja bajo irradiación de un solo pulso.

Los resultados de los experimentos de determinación de la fluencia umbral de formación de burbuja para el modelo de tejido de una sola capa se muestran en la tabla 2.

Tabla II. Fluencias umbrales de formación de burbuja para distintos coeficientes de absorción en modelos de una capa (figura 19a)

Coefficiente de absorción (cm^{-1})	F_u (kJ/cm^2)
7	0.25
45	0.34
130	0.63
215	5.6

Podemos observar un comportamiento exponencial creciente en la relación entre la fluencia umbral de formación de burbuja y el coeficiente de absorción de la capa teñida (figura 22). Este resultado nos permitirá predecir la fluencia umbral de formación de burbuja para materiales biológicos con un coeficiente de absorción conocido.

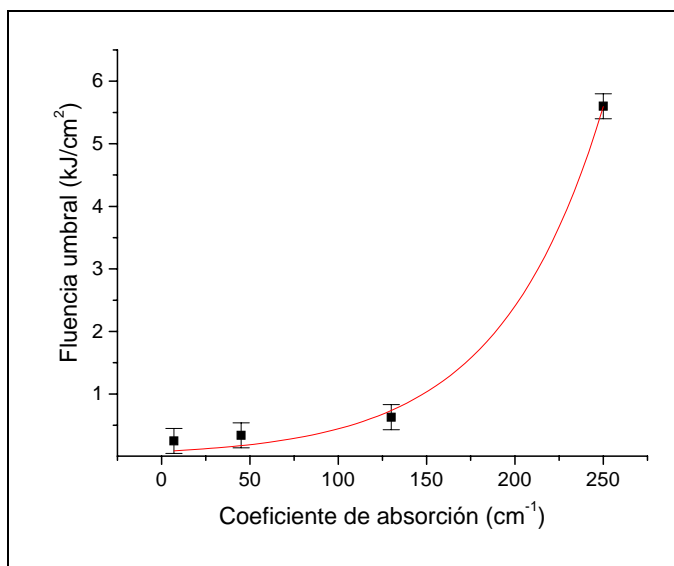


Figura 22. Fluencia umbral de formación de burbuja para modelos de tejido de agar de una capa.

De manera similar para el modelo de tejido formado por tres capas de agar se obtuvieron resultados similares en donde si de igual forma se aumenta el coeficiente de absorción, también aumenta la fluencia umbral de formación de burbuja. Esto lo podemos observar en primera instancia en la tabla 3.

Tabla 3. Fluencias umbrales de formación de burbuja para distintos coeficientes de absorción en modelos de agar de tres capas (figura 19b)

Coefficiente de absorción (cm ⁻¹)	F _u (kJ/cm ²)
7	0.25
45	0.45
130	0.8
215	5.81

En este caso podemos observar también un comportamiento en forma de un crecimiento exponencial como en el caso de los modelos de una capa. (figura 23).

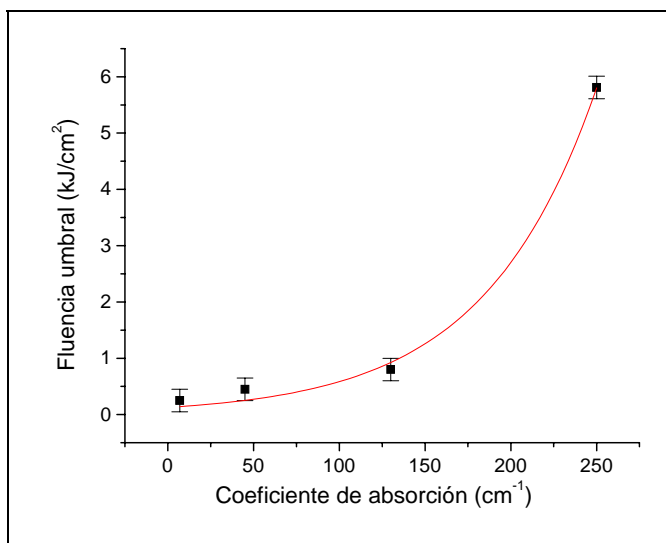


Figura 23. Fluencia umbral de formación de burbuja para modelos de tejido de agar de tres capas

En estos experimentos el objetivo fue obtener en primer lugar el umbral de formación de burbuja para un modelo de solo una capa de colorante (figura 21a) y posteriormente considerar un modelo de tejido más cercano a una capa de tejido dermatológico real en donde emulamos un vaso vascular de $250\mu\text{m}$ de espesor a $500\mu\text{m}$ de profundidad en la epidermis [Tortora y Anagnostakos, 1993]

En el caso de los experimentos con los modelos de tejido formados por tres capas de agar se esperaba obtener un efecto de absorción de energía, de manera que exponencialmente se obtuviera una fluencia menor en el volumen de irradiación debido a la absorción provocada por la capa superior de agar transparente. Considerando que esta capa tiene un coeficiente de absorción de 7cm^{-1} , según la ley de Lambert, la diferencia en la fluencia en la capa absorbedora con respecto a la fluencia en la capa transparente no podría ser mayor al 1%. La absorción de la energía en cada pulso como resultado de la propagación en la muestra se ilustra en la figura 24.

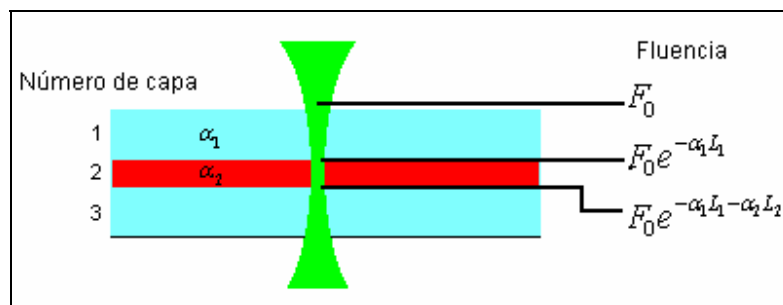


Figura 24. Absorción de la energía en cada capa del modelo de tejido de tres capas.

Observamos que el efecto de la absorción es dominante en el proceso de formación de la burbuja en el centro de la capa absorbidora. Dado que al comparar las fluencias umbrales de formación de burbuja (F_u) para un mismo coeficiente de absorción, en las dos configuraciones, observamos que en el caso del modelo con tres capas, las fluencias umbrales para formación de burbuja son siempre mayores que para el modelo de una sola capa, como podría esperarse, dado que hay un pequeño efecto de absorción por la capa de agar sin colorante (7 cm^{-1}) en el modelo de tres capas, sin embargo la diferencia es cada vez mayor conforme se aumenta el coeficiente de absorción.

Para el caso de $\alpha=7 \text{ cm}^{-1}$ la diferencia en la F_u es prácticamente nula, para el modelo con $\alpha=45 \text{ cm}^{-1}$ la diferencia es de 0.11 kJ/cm^2 , para $\alpha=130 \text{ cm}^{-1}$ la diferencia es de 0.17 kJ/cm^2 y para $\alpha=215 \text{ cm}^{-1}$ la diferencia es de 0.21 kJ/cm^2 . Esto se puede explicar considerando que el haz se propaga por aproximadamente $100 \text{ }\mu\text{m}$ dentro la capa absorbidora (figura 21a) y en ese trayecto la absorción es distinta y consistente para cada uno de los distintos coeficientes de absorción.

III.2 Obtención de perfiles de burbujas generadas con un solo pulso (ns).

Diseñamos una técnica para poder hacer el análisis de los datos que se obtuvieron en los experimentos de determinación del umbral de la generación de burbujas. Dicha técnica nos permitió encontrar la relación del tamaño de las burbujas y la fluencia láser utilizada. La técnica consistió en obtener imágenes de burbujas en la muestra como las mostradas en la figura 25.

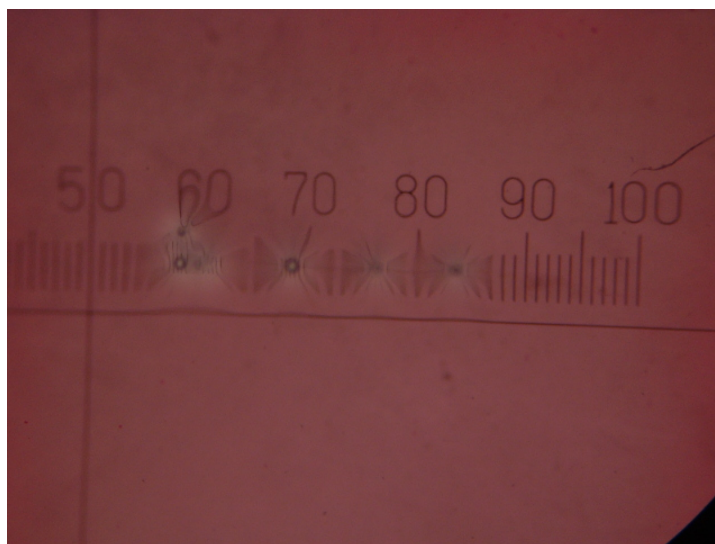


Figura 25. Imagen a analizar tomada en el microscopio óptico (Apéndice A)

En este caso estamos hablando de una muestra de $\alpha=130 \text{ cm}^{-1}$ en donde se hicieron cinco disparos hechos a distintas fluencias. En esta imagen, junto con las burbujas también es apreciable un efecto de fotoblanqueado en la vecindad de cada burbuja y por otra parte se observa una distorsión que se manifiesta en la escala graduada posicionada detrás de la muestra en el microscopio. Dicha distorsión se debe a un cambio en el estado de gel y por

lo tanto en su índice provocado por un efecto térmico foto-inducido en la muestra por el pulso láser.

Para analizar el resultado de la irradiación, se requiere encontrar el diámetro de las burbujas. Para esto se utilizó un programa computacional de procesamiento de imágenes basado en lenguaje java, *ImageJ* (Apéndice A); con este programa obtenemos un perfil transversal de esta imagen para poder medir el tamaño de las burbujas. Primeramente para obtener una mejor resolución en el perfil, se aumentó el contraste en la imagen y posteriormente se trazó una línea donde se encuentran las burbujas; como lo podemos observar en la siguiente figura 26.



Figura 26. Imagen con aumento en contraste.

Con esta imagen se obtuvo un perfil que nos dio la magnitud del diámetro de las burbujas. Las marcas menores de la escala que se usaron como referencia en nuestras mediciones es de 100 μm .

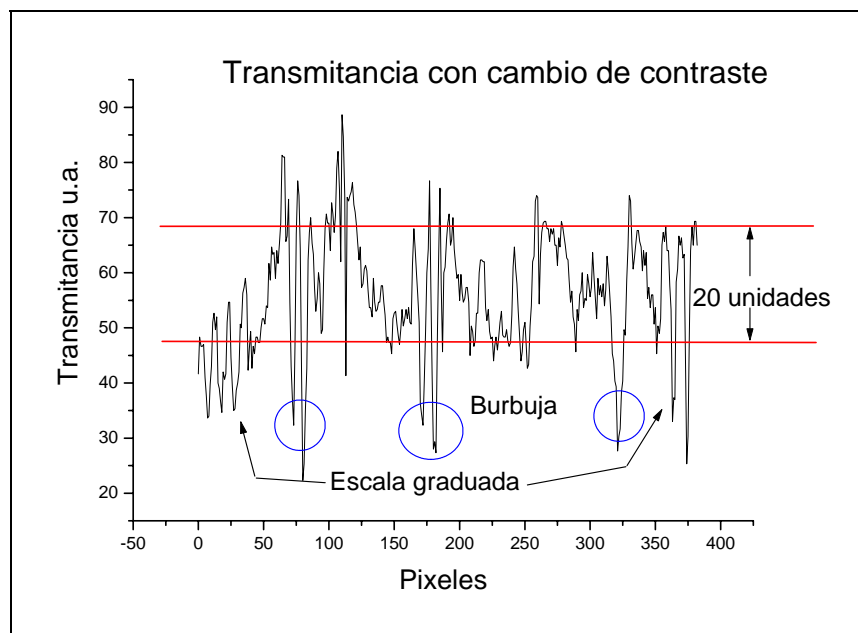


Figura 27. Perfil obtenido haciendo un aumento en el contraste de la imagen.

Los máximos y mínimos que se aprecian en la parte derecha y en la parte izquierda de este perfil (marcados con flechas en la figura 27), corresponden a las líneas de la escala la cuál se utilizó para medir el diámetro de las burbujas. Sin embargo, podemos notar que los valores máximos de las marcas de la escala graduada que están a la izquierda están 20 unidades más abajo que las de la derecha de este figura, generando así una considerable incertidumbre en la medición del tamaño de la burbuja; por lo que se tuvo que obtener un nivel base del tono en un área distinta a la del análisis para poder normalizar las mediciones obtenidas de la imagen y así poder eliminar esta incertidumbre; tal y como se muestra en la siguiente figura.

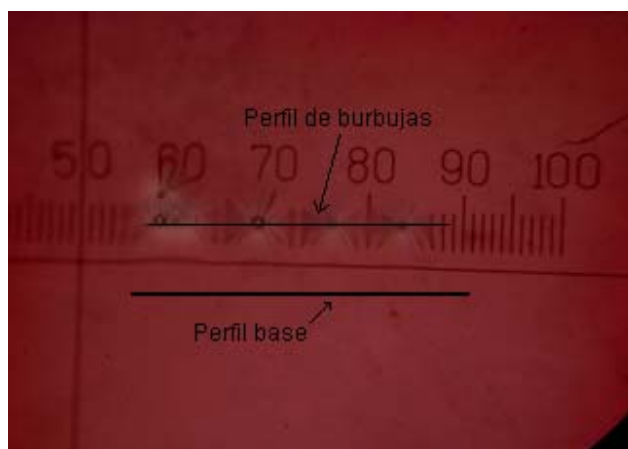


Figura 28. Obtención de perfil base.

En la figura 28 observamos dos líneas, la que se encuentra en la parte superior fue previamente usada en la obtención del perfil de las burbujas a analizar, la línea inferior nos sirvió para obtener un “perfil base del tono” original de la muestra. Posteriormente se restaron los valores del perfil base al perfil que se obtiene de las burbujas.

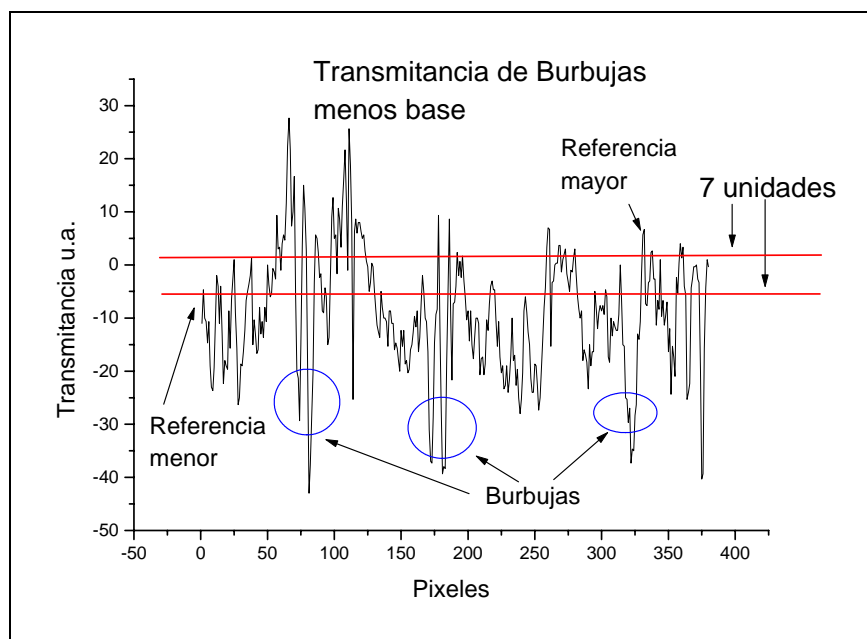


Figura 29. Perfil obtenido restando el perfil base al perfil de las burbujas.

De la figura 29 podemos observar cómo se reduce la diferencia que existía entre las marcas de la escala graduada que están a la derecha e izquierda a 7 unidades. Aunque esta diferencia es considerablemente menor, aún deja un margen de error en la medición del tamaño de las burbujas.

Finalmente y con el objetivo de mejorar este resultado, se hizo una normalización de los perfiles, dividiendo el perfil de las burbujas entre el *perfil base de colorante*, dando el siguiente resultado.

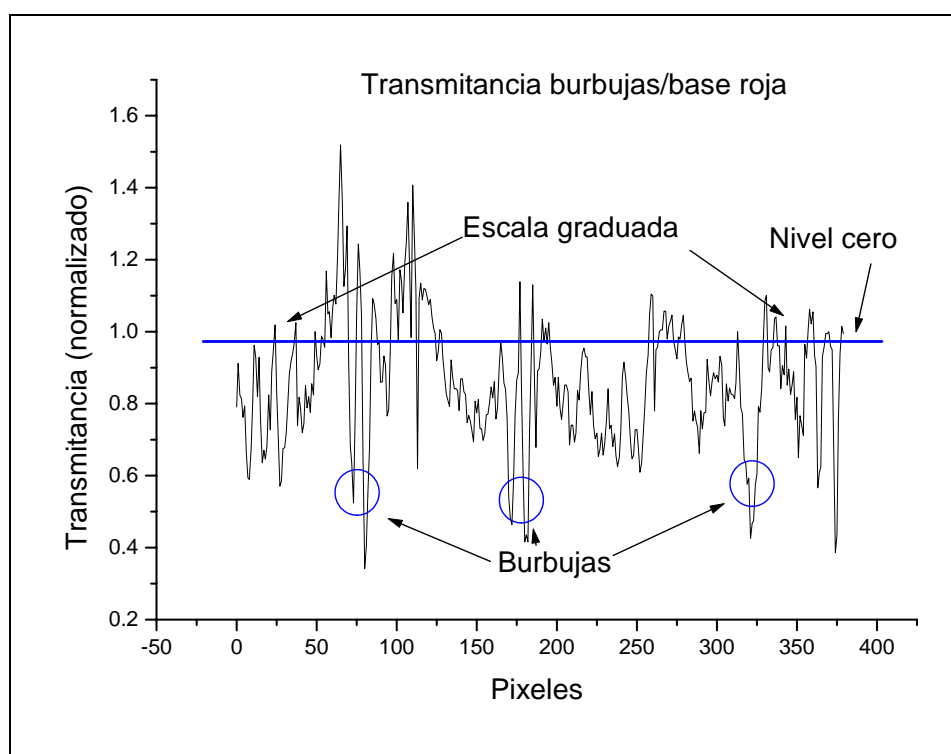


Figura 30. Perfil normalizado

En la figura 30 vemos que aunque la diferencia en las marcas de la escala sigue existiendo, podríamos considerar que dada su magnitud, este perfil sería el más apropiado para hacer el análisis del tamaño de las burbujas, ya que podemos considerar la línea

marcada como el nivel “cero” a partir del cuál analizaremos los resultados de las irradiaciones. Esto quiere decir que para esta imagen en particular, se pueden diferenciar transmitancias altas o bajas con las que podemos medir el tamaño de las burbujas. Esta técnica se aplicó en todas las imágenes que se analizaron en este trabajo.

III.3 Tamaño de la burbuja de cavitación formada por un solo pulso

Una vez definido el método para analizar las burbujas obtenidas, obtuvimos una relación entre el tamaño de la burbujas de cavitación formadas por un solo pulso y la fluencia de irradiación.

Debido a que los vasos sanguíneos que forman las marcas de vino de oporto se encuentran aproximadamente a 500 μm de profundidad, se obtuvieron resultados para distintos coeficientes de absorción en modelos de tres capas irradiado a 100 μm de profundidad de la capa absorbedora, es decir, a 600 μm de profundidad con respecto a la superficie frontal del modelo de tres capas.

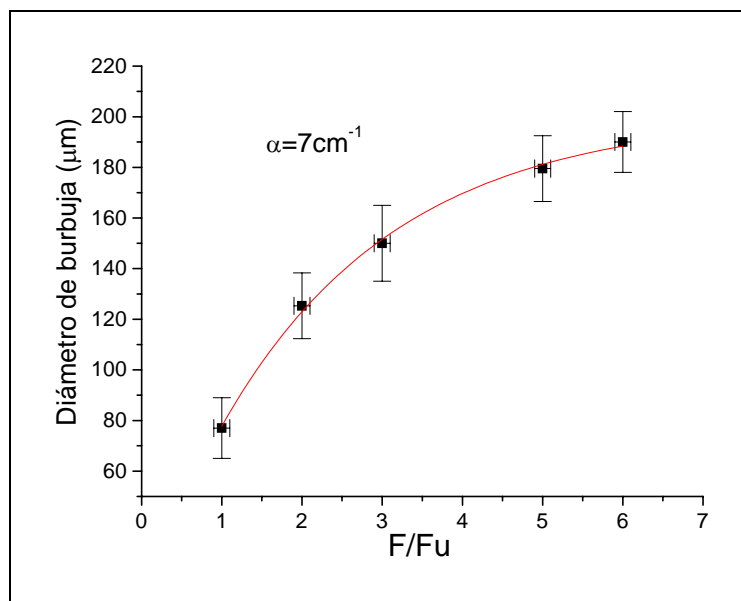


Figura 31. Diámetro de la burbuja en modelos de tres capas a $100\ \mu\text{m}$ de profundidad de la capa absorbidora para un modelo de $\alpha=7\ \text{cm}^{-1}$.

En la figura 31 observamos un comportamiento asintótico en la relación entre el diámetro de la burbuja y la fluencia de irradiación en donde como es de esperarse, el tamaño de la burbuja aumenta conforme se aumenta la fluencia de irradiación.

En las figuras, 32, 33 y 34 encontramos un comportamiento similar donde observamos que el tamaño de la burbuja también aumenta al aumentar la fluencia con que se irradia la muestra.

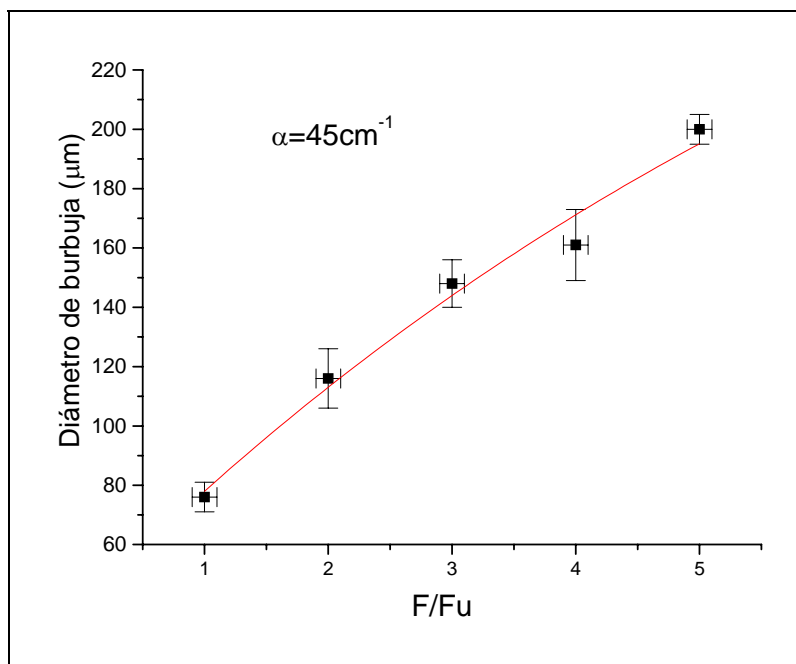


Figura 32. Diámetro de la burbuja en modelos de tres capas a $100\mu\text{m}$ de profundidad de la capa absorbedora para un modelo de $\alpha=45\text{cm}^{-1}$.

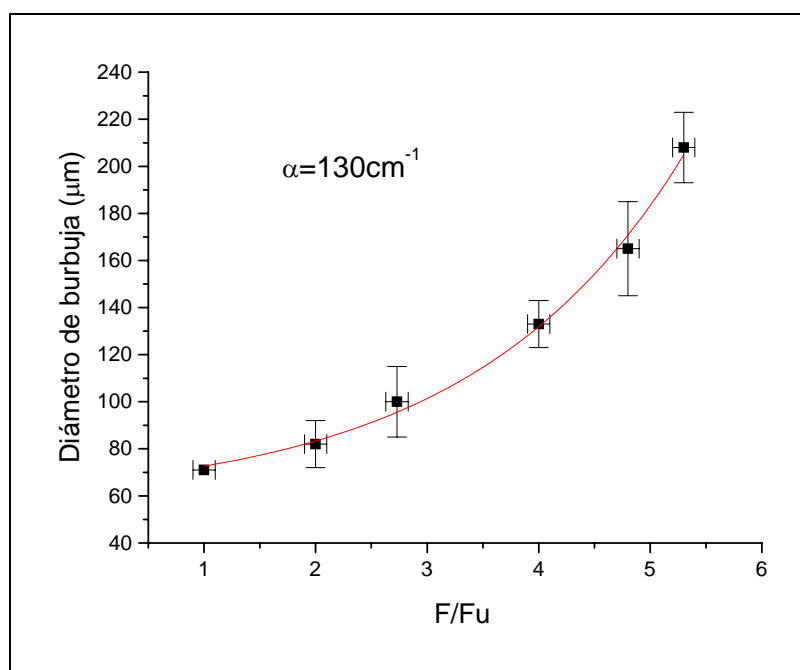


Figura 33. Diámetro de la burbuja en modelos de tres capas a $100\mu\text{m}$ de profundidad de la capa absorbedora para un modelo de $\alpha=130\text{cm}^{-1}$.

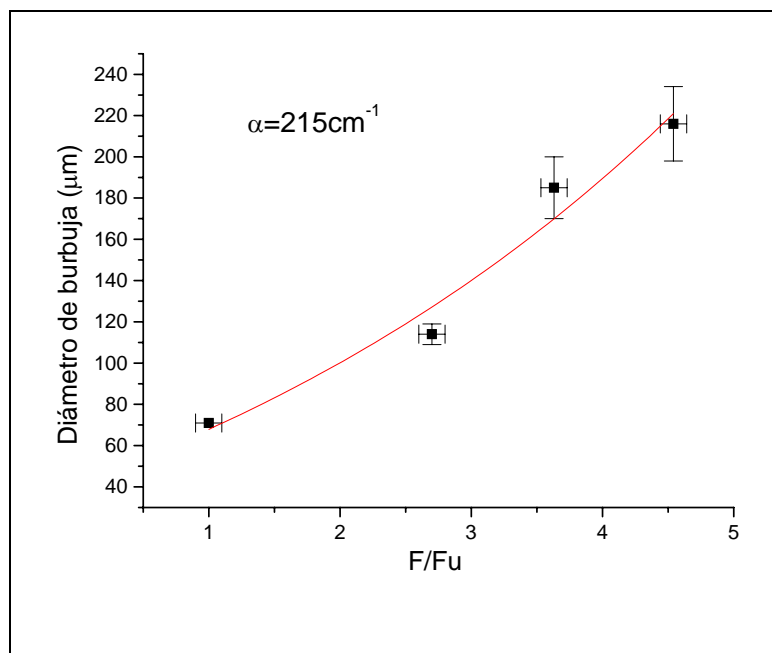


Figura 34. Diámetro de la burbuja en modelos de tres capas a $100\mu\text{m}$ de profundidad de la capa absorbidora para un modelo de $\alpha=215\text{cm}^{-1}$.

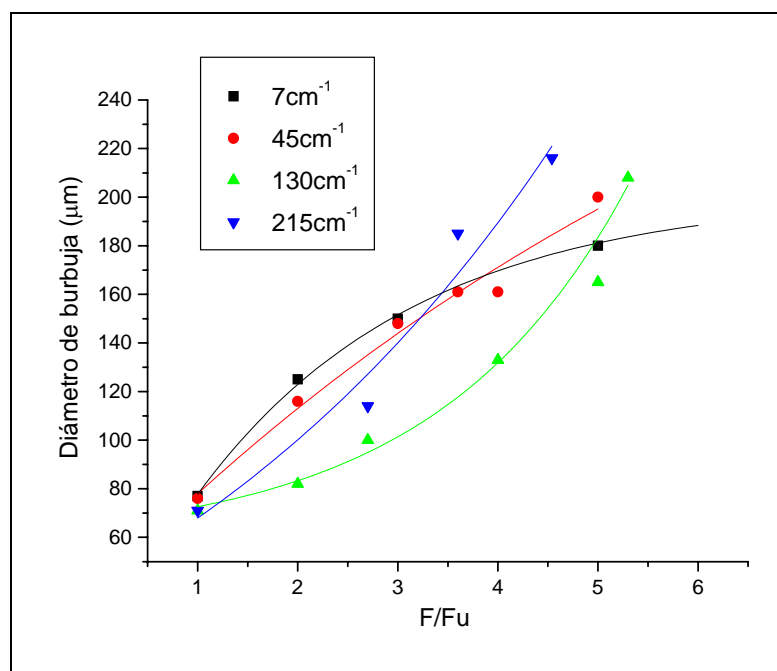


Figura 35. Comparación del diámetro de la burbuja en modelos de tres capas a $100\mu\text{m}$ de la capa absorbidora para distintos coeficientes de absorción.

En la figura 35 vemos una comparación en los resultados obtenidos en los experimentos, de donde podemos mencionar dos resultados que llaman la atención. El primero es un interesante resultado en que se pueden identificar dos posibles mecanismos distintos en la formación de burbuja, donde dichos mecanismos dependen de la magnitud de α . Para los coeficientes de absorción 7 cm^{-1} y 45 cm^{-1} la curva de relación entre diámetro de burbuja vs. fluencia normalizada presentan un comportamiento logarítmico, mientras que para las muestras con coeficiente de absorción 130 cm^{-1} y 215 cm^{-1} las curvas muestran un comportamiento exponencial.

Estos comportamientos se pueden asociar a un efecto determinado por la magnitud del coeficiente de absorción en el mecanismo de formación de burbuja. Es necesario hacer notar el hecho de que para las muestras con mayor coeficiente de absorción las fluencias absolutas con las que se irradiaron son mayores, recordaremos que la fluencia umbral de formación de burbuja es mayor cuanto mayor es α .

El segundo resultado interesante es el hecho de que al irradiar a la fluencia umbral, (no olvidar que F_u es distinta para cada α) el diámetro de la burbuja de cavitación es el mismo para los cuatro coeficientes de absorción, el cuál es de aproximadamente $70 \mu\text{m}$.

Podemos resumir lo anterior de la siguiente manera: a la fluencia umbral el diámetro de la burbuja es independiente de α , mientras que a fluencia mayores que F_u la magnitud de α afecta al mecanismo de formación y diámetro máximo de la burbuja.

III.4 Difusión de temperatura

Como se mencionó en la parte b) de la sección II.3 de este trabajo, los experimentos de difusión de temperatura consistieron en irradiar durante 60 segundos a una frecuencia de 10 Hz un modelo de tejido hecho de cuatro capas, donde la segunda capa desde la superficie superior contenía una concentración de colorante (capa absorbidora) con un espesor de $254\ \mu\text{m}$, mientras las otras tres capas tenían un espesor de $500\ \mu\text{m}$, tal y como se puede apreciar en la figura 36.

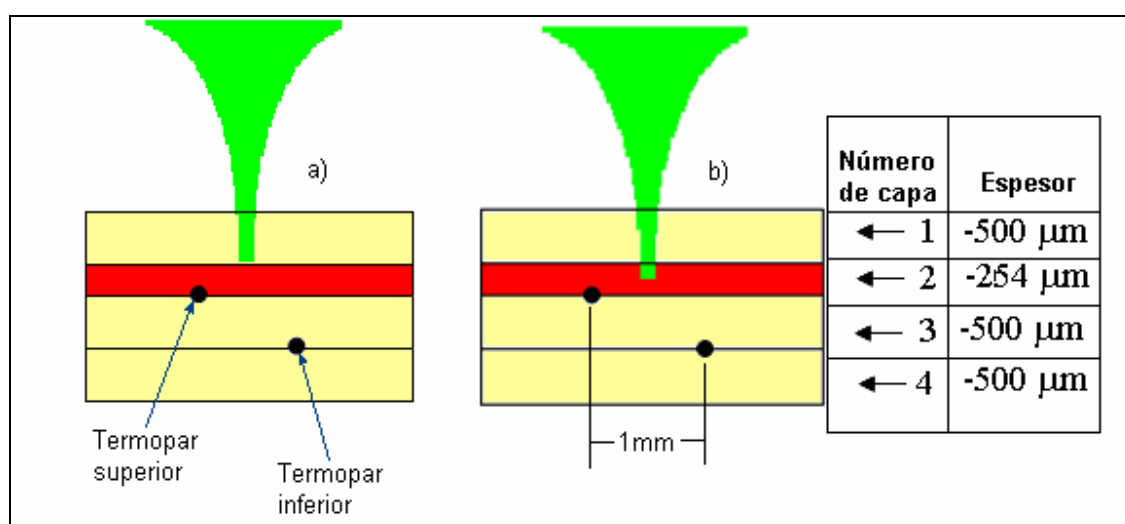


Figura 36. Configuración experimental para medición de difusión de temperatura.

Como se había también mencionado en la sección II.3 se colocaron dos termopares, el denominado “termopar superior” (T2) entre la capa 2 y 3 (figura 36) y el “termopar inferior” (T1) entre las capas 3 y 4 en la misma figura. Las irradiaciones se hicieron colocando la cintura del haz tanto en la superficie de la capa absorbidora (figura 36a) como a $100\ \mu\text{m}$ dentro de esta misma capa (figura 36b).

Esto quiere decir que cuando las irradiaciones se hicieron en la superficie de la capa absorbadora, el termopar superior estaba a 560 μm de distancia y el termopar inferior a 900 μm de distancia del volumen de irradiación. Mientras que si la irradiación se hacía 100 μm dentro de la capa absorbadora, el termopar superior estaba a 520 μm de distancia del volumen de irradiación y el termopar inferior a 820 μm de distancia de este mismo volumen.

En lo que respecta a la irradiación de modelos de tejido de agar con pulsos de ns cabe mencionar dos puntos. Por un lado como podría esperarse, conforme el coeficiente de absorción aumenta el cambio de temperatura aumentará también, como puede ser visto claramente de nuestros resultados de difusión del calor trazados en las siguientes figuras.

Por otro lado también observamos que los cambios de temperatura inducidos en la capa absorbadora cuando la irradiación se lleva a cabo en la superficie de las muestras es notablemente menor al generado por las irradiaciones hechas enfocando el haz en el centro de la capa absorbadora.

De las figuras 37 a 48 se observan los resultados obtenido al irradiar las distintas muestras con distintos coeficientes de absorción. Situando la cintura del haz tanto en la superficie de la capa absorbadora como a 100 μm dentro de esta misma. Y también irradiando a distintas veces la fluencia umbral (nF_u).

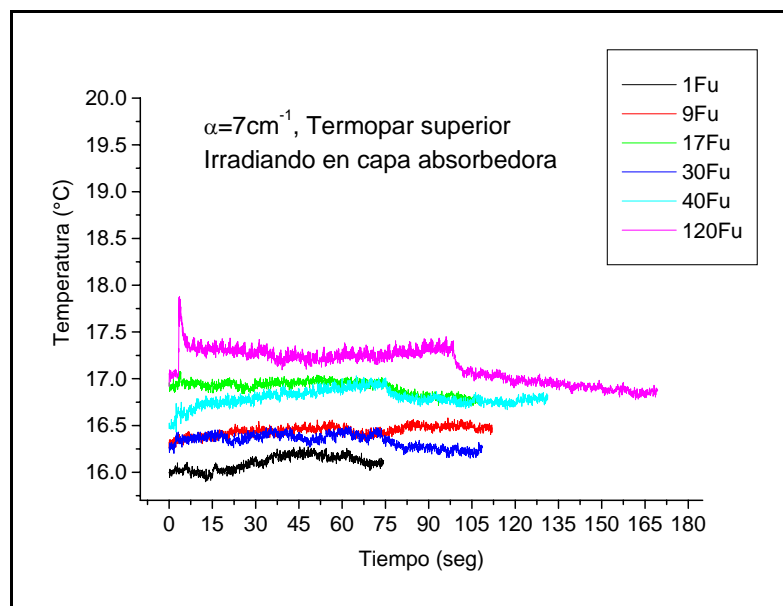


Figura 37. Cambio de temperatura inducido en una muestra con $\alpha=7\text{ cm}^{-1}$ por irradiación de pulsos de 5ns enfocando en el centro de la capa absorbadora, medido a $520\text{ }\mu\text{m}$ de la irradiación.

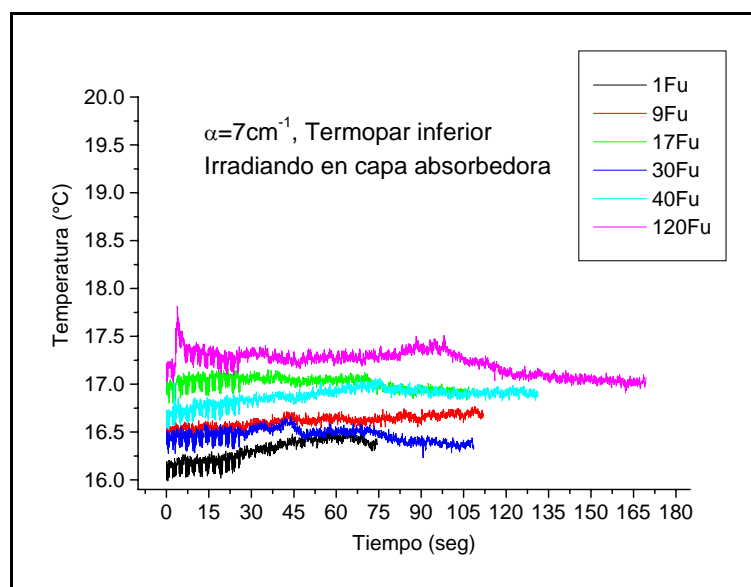


Figura 38. Cambio de temperatura inducido en una muestra con $\alpha=7\text{ cm}^{-1}$ por irradiación de pulsos de 5ns enfocando en el centro de la capa absorbadora, medido a $820\text{ }\mu\text{m}$ de la irradiación.

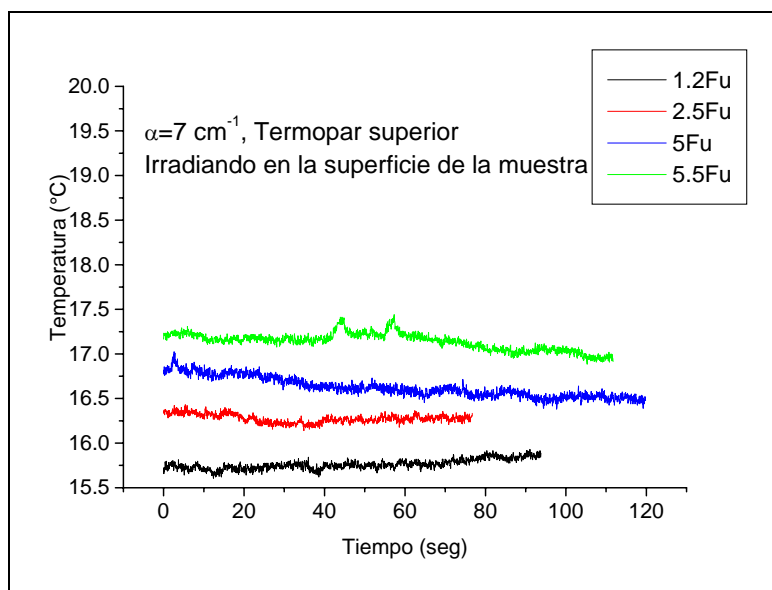


Figura 39. Cambio de temperatura inducido en una muestra con $\alpha=7 \text{ cm}^{-1}$ por irradiación de pulsos de 5ns enfocando en la superficie de la muestra, medido a $560 \mu\text{m}$ de la irradiación.

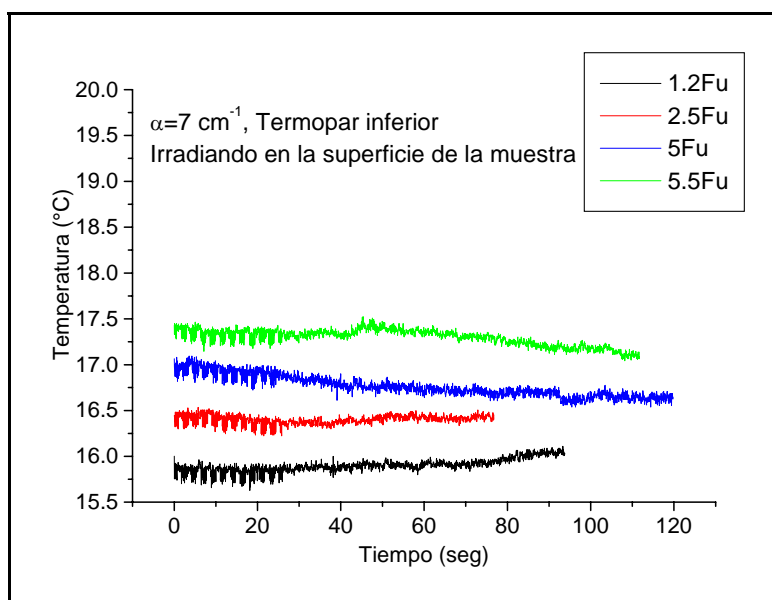


Figura 40. Cambio de temperatura inducido en una muestra con $\alpha=7 \text{ cm}^{-1}$ por irradiación de pulsos de 5ns enfocando en la superficie de la muestra, medido a $900 \mu\text{m}$ de la irradiación.

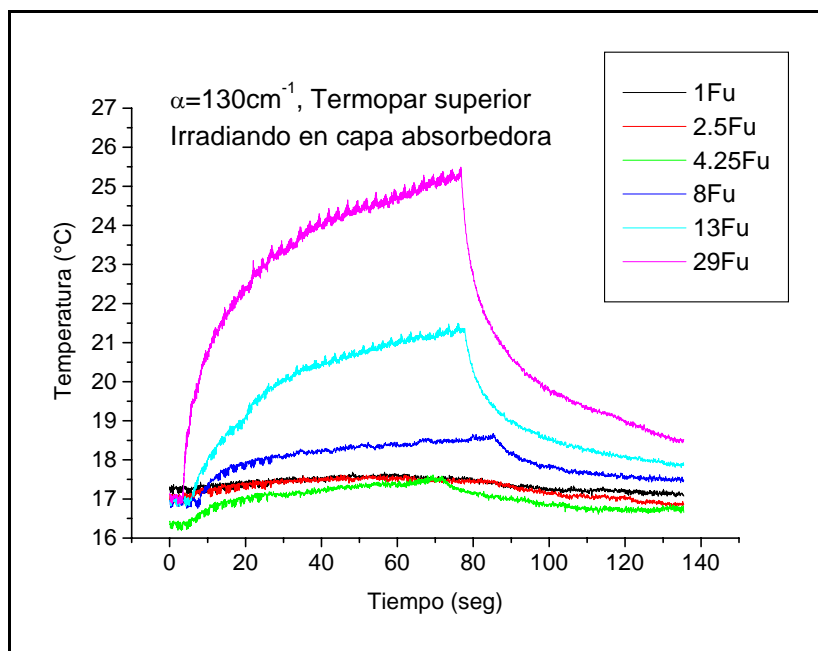


Figura 41. Cambio de temperatura inducido en una muestra con $\alpha=130\text{ cm}^{-1}$ por irradiación de pulsos de 5ns enfocando en la capa absorbedora, medido a $520\text{ }\mu\text{m}$ de la irradiación.

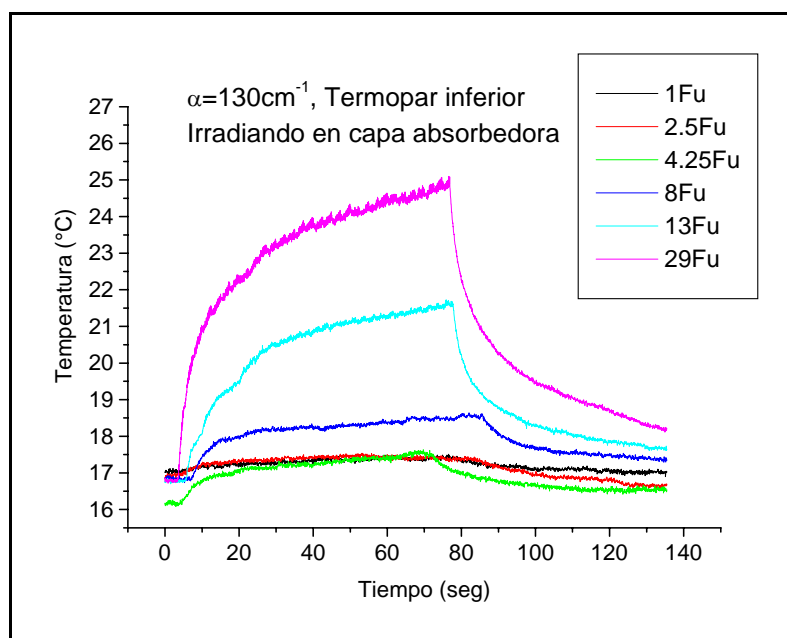


Figura 42. Cambio de temperatura inducido en una muestra con $\alpha=130\text{ cm}^{-1}$ por irradiación de pulsos de 5ns enfocando en la capa absorbedora, medido a $820\text{ }\mu\text{m}$ de la irradiación.

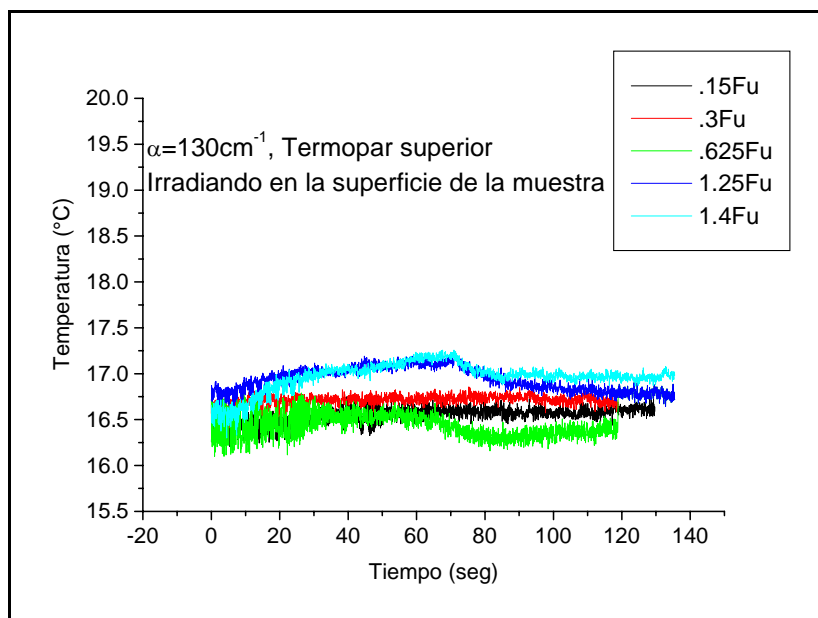


Figura 43. Cambio de temperatura inducido en una muestra con $\alpha=130\text{ cm}^{-1}$ por irradiación de pulsos de 5ns enfocando en la superficie de la muestra, medido a $560\text{ }\mu\text{m}$ de la irradiación.

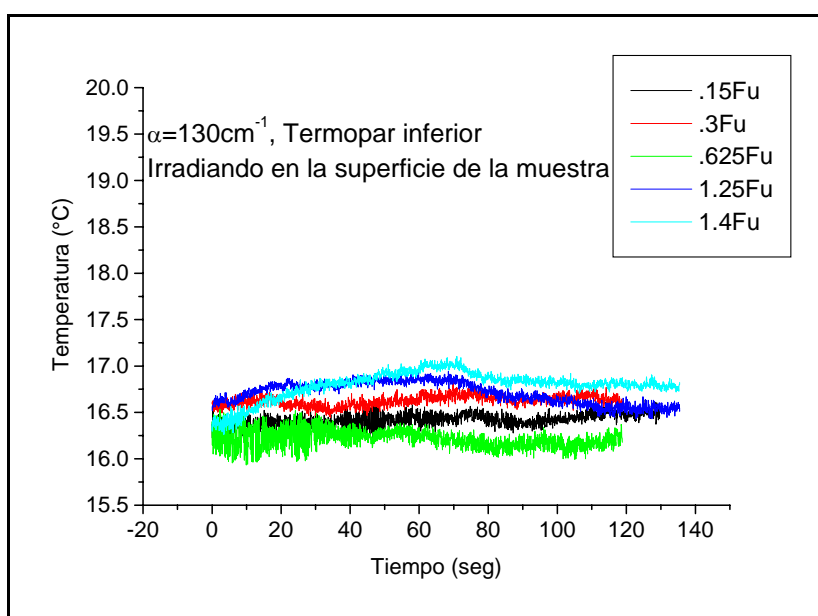


Figura 44. Cambio de temperatura inducido en una muestra con $\alpha=130\text{ cm}^{-1}$ por irradiación de pulsos de 5ns enfocando en la superficie de la muestra, medido a $900\text{ }\mu\text{m}$ de la irradiación.

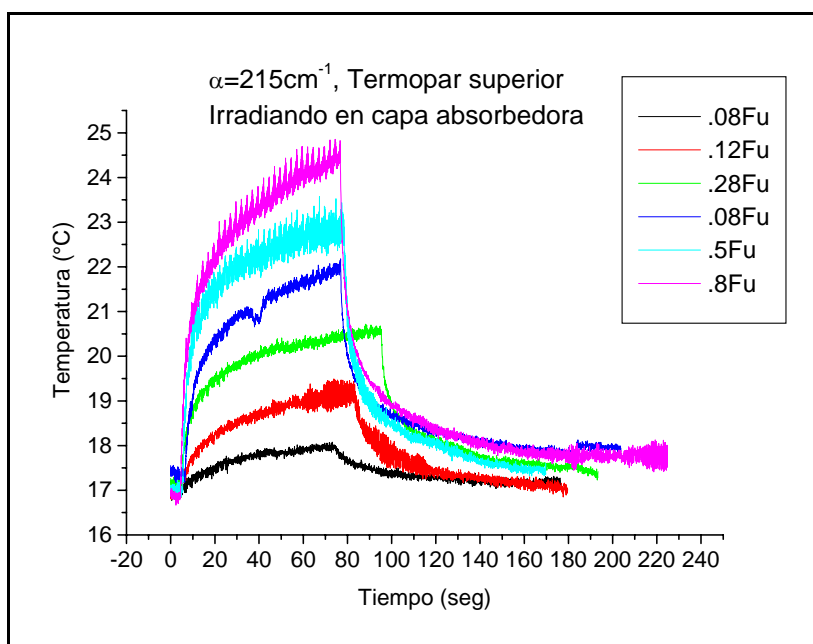


Figura 45. Cambio de temperatura inducido en una muestra con $\alpha=215\text{ cm}^{-1}$ por irradiación de pulsos de 5ns enfocando en la capa absorbedora, medido a $520\text{ }\mu\text{m}$ de la irradiación.

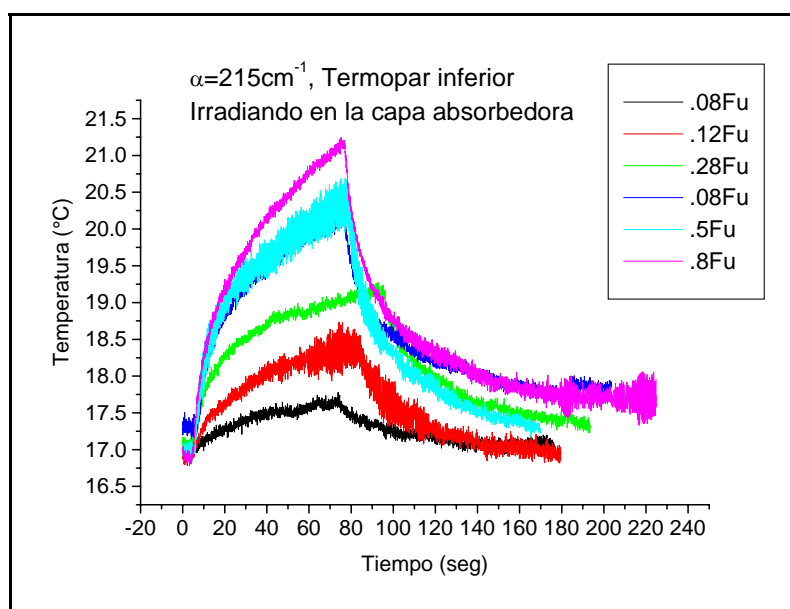


Figura 46. Cambio de temperatura inducido en una muestra con $\alpha=215\text{ cm}^{-1}$ por irradiación de pulsos de 5ns enfocando en la capa absorbedora, medido a $820\text{ }\mu\text{m}$ de la irradiación.

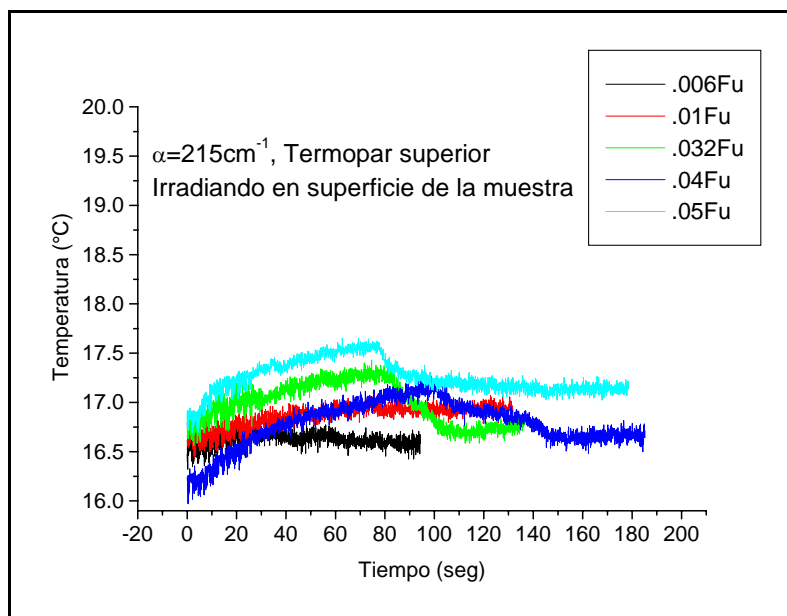


Figura 47. Cambio de temperatura inducido en una muestra con $\alpha=215\text{ cm}^{-1}$ por irradiación de pulsos de 5ns enfocando en la superficie de la muestra, medido a $560\text{ }\mu\text{m}$ de la irradiación.

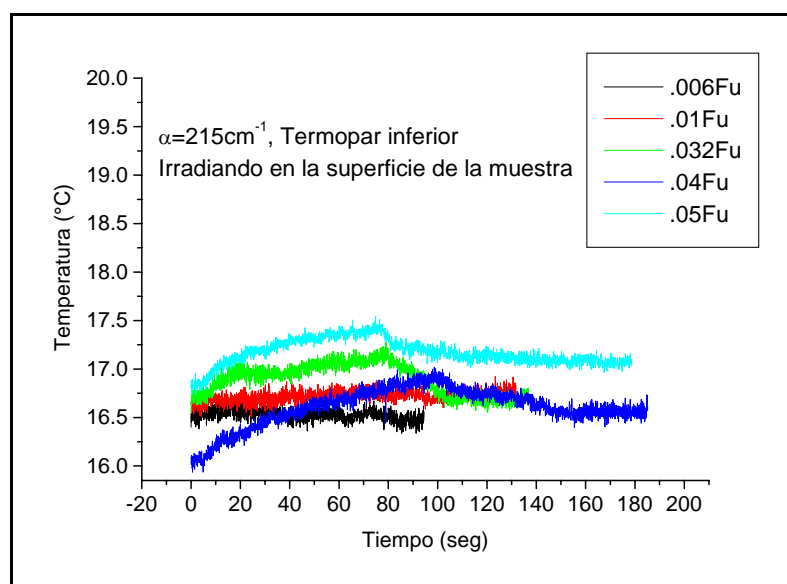


Figura 48. Cambio de temperatura inducido en una muestra con $\alpha=215\text{ cm}^{-1}$ por irradiación de pulsos de 5ns enfocando en la superficie de la muestra, medido a $900\text{ }\mu\text{m}$ de la irradiación.

Cabe mencionar que al comparar las trazas de temperatura mostradas en las gráficas en donde la irradiación fue hecha en la capa absorbadora para cada α y a su respectiva fluencia umbral (F_u), la diferencia en el cambio de temperatura alcanzado por la muestra es considerable ($\Delta T = 2^\circ\text{C}$ para $\alpha=0.7\text{cm}^{-1}$, $\Delta T = 8^\circ\text{C}$ para $\alpha=215\text{cm}^{-1}$); sin embargo el tamaño de la burbuja generada por uno solo de estos pulsos a su respectiva fluencia umbral es el mismo tamaño $\sim 70 \mu\text{m}$. Este hecho, que parece indicar que en el mecanismo de formación de burbuja hay una pequeña contribución térmica, que debe estar acompañada de una contribución dominante de ablación o bien de rompimiento dieléctrico por la intensidad del pulso.

Por otro lado también es de esperarse que manteniendo el coeficiente de absorción constante, conforme se aumenta la fluencia, también aumentará el cambio de temperatura alcanzado por la muestra.

Con el objetivo de estudiar con más detalle la irradiación se desarrolló en un programa en MATLAB (versión 7.0, MathWorks) con la intención de conocer la temperatura que experimenta el gel de agar en el volumen de material irradiado. Dicho programa, construido por Francisco Gutiérrez (Universidad de California, Riverside), está basado en un modelo bidimensional de la muestra de cuatro capas de gel de agar ya mencionada, donde se resuelve la ecuación de difusión de calor

$$\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} = Q + \nabla \cdot (k \nabla T), \quad (3)$$

Donde p es la densidad, C_p el calor específico, Q es el calor agregado y k es la conductividad térmica y T la temperatura.

En el programa, la ecuación se resuelve con un término de generación de calor mediante el método de diferencias finitas. Este término simula el calor generado con pulsos láser de 5 ns enfocado con una lente de 0.5NA (lente de microprocesado de nuestros experimentos), este mismo se calcula con base en el coeficiente de absorción lineal del agar.

En el programa se considera una condición de frontera a temperatura constante en la parte inferior del modelo de agar, aislamiento térmico en el volumen donde se genera el calor (irradiación) y otras dos condiciones de convección en las caras laterales del modelo. Este programa tiene la limitación de no considerar cambios de presión así como cambios de fase. El problema simulado por el programa se describe en la figura 49.

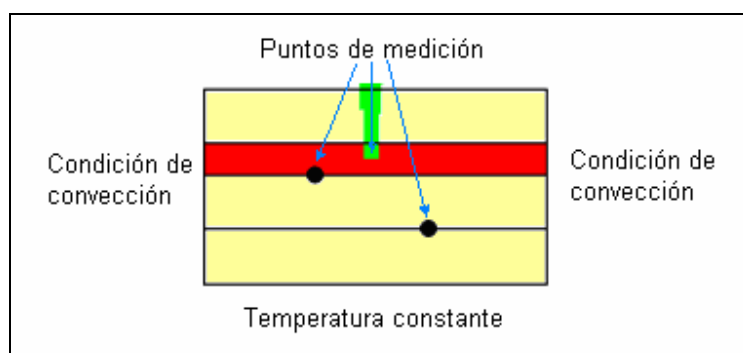


Figura 49. Configuración de modelo computacional de difusión de temperatura.

Se trabajó con la concentración de más alto coeficiente de absorción, 215cm^{-1} , el cual es el coeficiente de absorción de la sangre a $\lambda=532\text{nm}$ y a continuación se observa el resultado de la simulación.

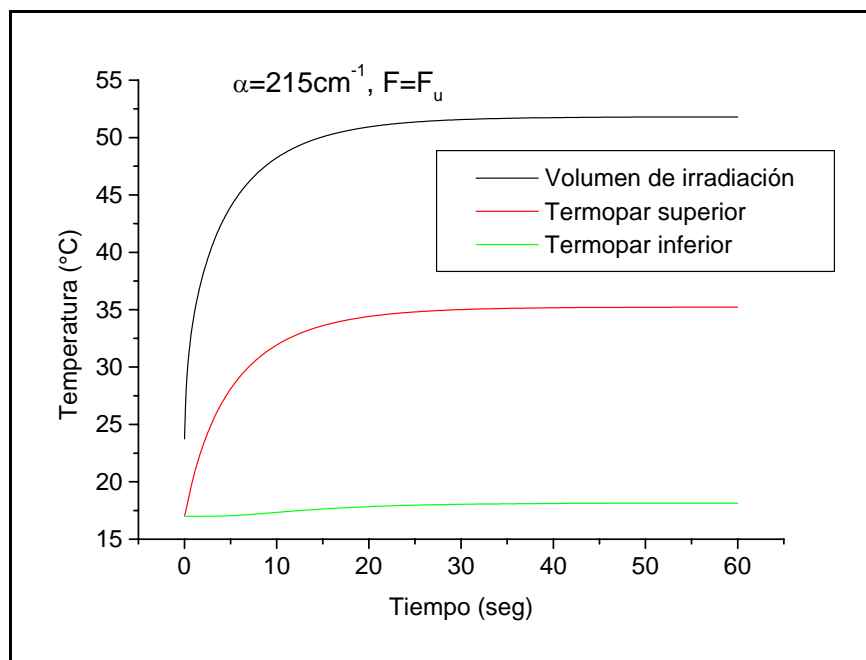


Figura 50. Resultado de simulación numérica para cambio de temperatura inducido por pulsos láser de 5 ns irradiando en la capa absorbadora.

Es interesante observar que en el modelo teórico las temperaturas resultan aun mayores que las obtenidas experimentalmente. Pero resulta más interesante aún que en el volumen de irradiación la temperatura alcanzada sea menor a 55°C, siendo que como se mencionó en el capítulo anterior, para que el agar vuelva a licuarse es necesario que alcance temperaturas mayores a los 60°C a presión atmosférica. Sin embargo, al irradiar la muestra con pulsos de nanosegundos, cabe esperar que la presión en el volumen irradiado sea mayor a una atmósfera y por otro lado la temperatura de fundido tanto del agua como del agar se modifiquen en el volumen irradiado y por ende de formación de burbuja.

Este resultado por otra parte da soporte a nuestra teoría de dependencia con la intensidad de pulso en el mecanismo de interacción, ya que podemos considerar una baja contribución térmica en el proceso de la formación de burbuja.

Como se mencionó en la sección I.3, al usar un láser de pulsos ultracortos, se tiene como ventaja que el umbral de fluencia necesario para la ablación o generación de daño del tejido decrece al disminuir el ancho temporal del pulso, lo cual repercute en menos daños colaterales [Kurtz et al, 1994], de ahí que esperemos un menor efecto térmico al hacer una irradiación con pulsos de 80 femtosegundos.

Un resultado de gran interés se obtuvo al irradiar la muestra con pulsos de fs, en donde para ninguno de los coeficientes de absorción se generó un cambio de temperatura apreciable; tal hecho lo podemos ver en la figura 51.

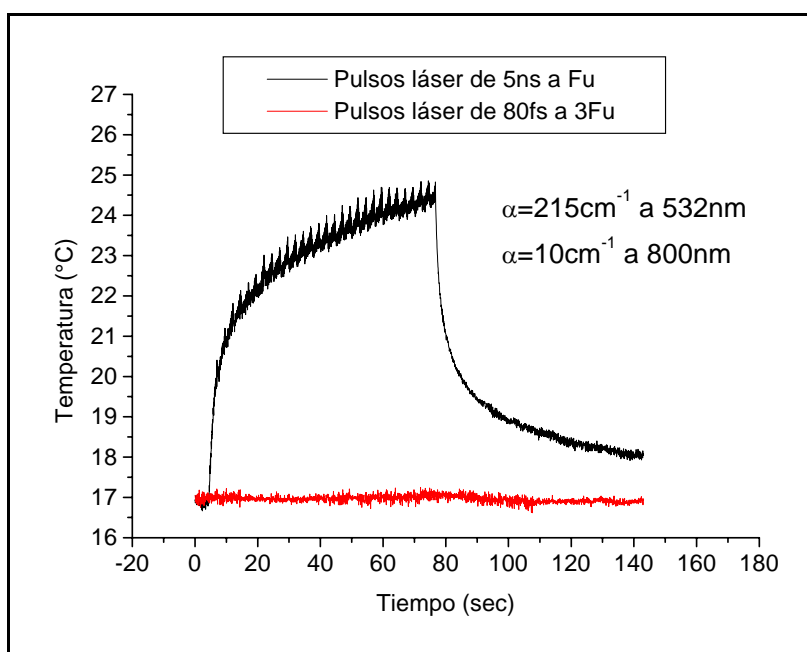


Figura 51. Comparación en las mediciones de cambio de temperatura de una misma muestra irradiada con pulsos de ns y fs.

En la figura 51 lo que podemos observar como en la muestra de mayor coeficiente de absorción ($\alpha=215\text{ cm}^{-1}$ a 532 nm y $\alpha=10\text{ cm}^{-1}$ a 800 nm), no fue posible inducir un cambio de temperatura significativo al irradiarla con pulsos de 80fs; sin embargo a esa

fluencia si fue posible generar una burbuja. Este resultado es otra confirmación preliminar de la dependencia con la intensidad en el mecanismo de la formación de la burbuja, sin la necesidad de una contribución térmica.

III.5 Experimentos preliminares de irradiación de células

Cómo se mencionó en la sección II.4 de este documento, se realizaron irradiaciones de modelos de tejido constituidos de colágeno y células de rata canguro. En donde se irradió a la F_u correspondiente al modelo de tres capas con $a=215\text{cm}^{-1}$. Donde para observar los resultados, las muestras irradiadas fueron llevadas al microscopio confocal donde por medio de marcadores celulares (SYTO-11 y homodímero de etidio), se identificaron las células que murieron por la irradiación y también aquellas que siguieron vivas.

Después de un extenso entrenamiento y experimentación con los mencionados marcadores celulares, se observó un resultado como el que se muestra en la figura 52.

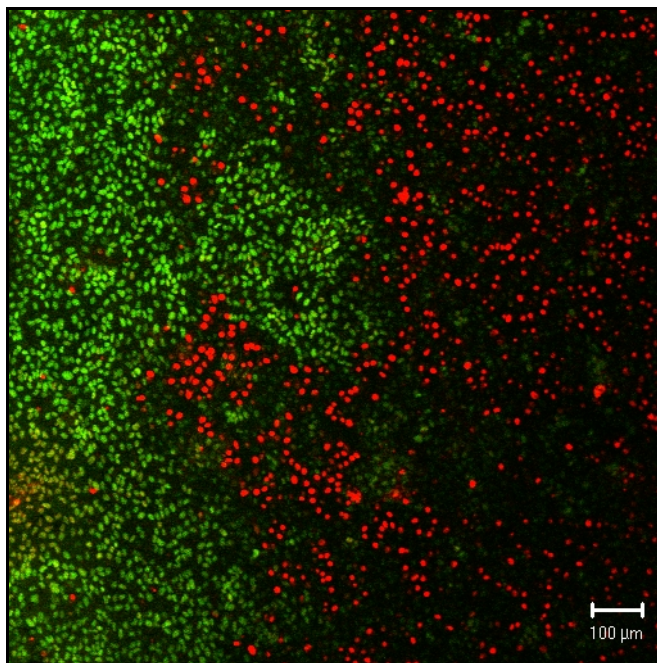


Figura 52. Imagen obtenida del microscopio confocal (20X) donde se observa el efecto de la irradiación de células vivas de ratón a una fluencia de $11\text{kJ}/\text{cm}^2$.

Un resultado típico de esta serie de experimentos lo podemos ver en la figura 52, que corresponde a una imagen obtenida en un microscopio confocal (20X) (Dra. Meritxell Riquelme, Departamento de Microbiología, CICESE), en donde se observa que las células que están a la derecha fluorescen en rojo, correspondientes al homodímero de etidio ($\sim 625\text{nm}$) lo cual nos dice que estas células están muertas.

De la misma manera podemos ver que las células que están a la izquierda fluorescen en verde, en correspondencia con el SYTO-11 ($\sim 550\text{nm}$), confirmando que estas células están vivas.

De esta manera, siéndonos posible diferenciar las células vivas de las muertas y teniendo en consideración la ubicación física en la muestra donde se llevó a cabo la

irradiación; podemos encontrar una correspondencia entre el patrón de irradiación mostrado en la figura 20, con el resultado observado en la figura 52. Tal y como lo podemos corroborar en la figura 61.

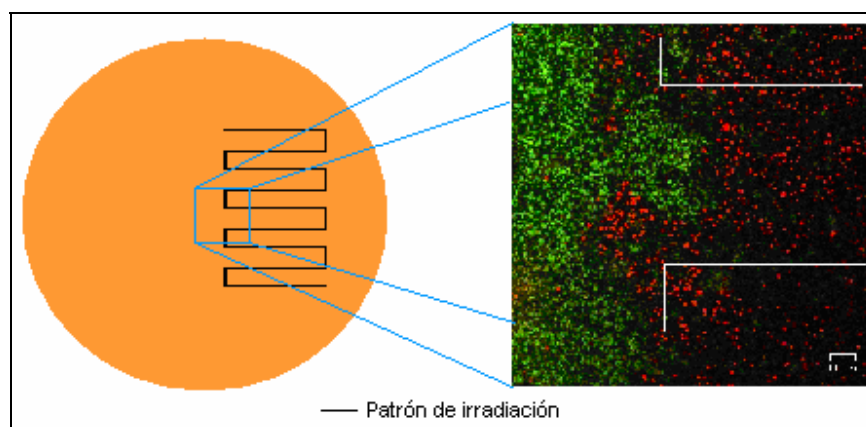


Figura 53. Correspondencia entre irradiación e imagen obtenida en microscopio confocal.

Capítulo IV Discusión y Conclusiones

IV.1 Formación de burbujas

Como se observó en la sección III.2 existe una relación exponencial para la formación de la burbuja dentro del volumen de agar, tanto en el modelo de una capa como en el multicapas. Es importante mencionar que la intención de irradiar un modelo multicapas es obtener una aproximación cercana a una muestra de tejido real, en donde los vasos sanguíneos que conforman los hemangiomas (manchas de vino de oporto) están a una profundidad aproximada de $500\mu\text{m}$.

La capa de agar transparente que se encuentra en la parte superior de este modelo de tres capas tiene un efecto casi insignificante en la definición de la formación de burbujas permanentes en la capa absorbidora. Esto es válido para cada uno de los modelos utilizados en este trabajo.

Este es un resultado que puede esperarse si consideramos que el coeficiente de absorción del agar sin colorante es de solo $\sim 7\text{ cm}^{-1}$, tal y como lo pudimos observar en la figura 54.

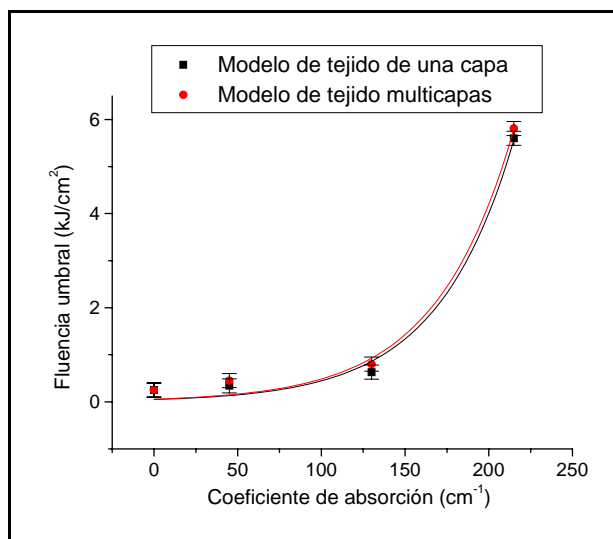


Figura 54. Comparación de resultados para la fluencia umbral de formación de burbuja permanente en modelos de una y tres capas de agar.

Por otro lado, el comportamiento creciente que observamos en esta misma gráfica para la fluencia umbral es un resultado que en primera instancia no se esperaba. Dado que si se considerara como principal contribución la absorción lineal de la energía del pulso, se esperaría que conforme mayor fuera el coeficiente de absorción, menor sería la fluencia necesaria para generar un incremento de temperatura que diera como resultado la formación de la burbuja dentro del material a través del calor generado, dado que es proporcional al producto de α por la fluencia del pulso láser (ecuación 2). Sin embargo ocurrió el efecto contrario a lo esperado en este escenario predominantemente térmico, en donde fue necesario aplicar una fluencia cada vez mayor, conforme se incrementa el coeficiente de absorción, para poder formar una burbuja en el agar.

Esto último lo podemos relacionar al comportamiento exponencial definido también en la ley de Lambert [Neims H. M., 1996] para la absorción lineal de la intensidad de luz.

$$I(z) = \exp(-\alpha z). \quad (4)$$

En donde la intensidad del pulso láser va disminuyendo de manera igualmente exponencial a lo largo del camino óptico conforme se va propagando a través de la muestra, hasta llegar al volumen de irradiación definido por la cintura del haz y la distancia de Rayleigh. Generando así ciertas “*pérdidas*” haciendo necesario el aplicar cada vez fluencias más grandes para conseguir formar la burbuja.

El comportamiento exponencial creciente de la fluencia umbral de formación de burbuja (F_u) como función del coeficiente de absorción lineal (α) sugiere un mecanismo de formación de burbuja en donde la generación de calor no es dominante y por lo tanto da lugar a la hipótesis de un mecanismo de rompimiento dieléctrico como responsable de la formación de burbuja.

IV.2 Dimensión de la burbuja en función de la fluencia de irradiación

En la sección anterior se terminó haciendo una observación con respecto al volumen formado con la cintura del haz y la distancia de Rayleigh. Es interesante mencionar que al considerar la distribución espacial y temporal de la energía del pulso durante la irradiación, así como también los datos mostrados en la sección anterior dan lugar a la hipótesis de un mecanismo de formación de burbuja con una mayor dependencia con la intensidad del pulso, donde el calentamiento inducido por los pulsos láser no tienen una contribución importante en la formación de la misma.

Un primer argumento a esta hipótesis, está en el hecho de que a pesar de que la fluencia umbral de formación de burbuja F_u aumenta conforme se aumenta también el

coeficiente de absorción (figura 54); el tamaño de la burbuja para la fluencia umbral es el mismo para todas las concentraciones $\sim 70 \mu\text{m}$. Esto lo podemos comprobar al observar la figura 35, en donde el diámetro de las burbujas se superpone para la fluencia $F/F_u = 1$. Más adelante retomaremos la hipótesis de la dependencia de la intensidad del pulso en el mecanismo de formación de burbuja, con los resultados correspondientes a la medición de temperatura en la muestra durante la irradiación.

Por otra parte, este mismo hecho de que el tamaño de la burbuja para la fluencia umbral es el mismo para todas las concentraciones, resulta interesante si lo comparamos con resultados obtenidos previamente en cornea, que es material ópticamente similar, se encontró que con pulsos de 60 ps el tamaño de la burbuja fue de $240 \mu\text{m}$, mientras que con pulsos del 100 fs, el diámetro de esta fue de $46 \mu\text{m}$ [Juhász et al, 1999].

En el resto de los datos mostrados en esta misma figura nos muestran un comportamiento que era de esperarse, en donde el diámetro de la burbuja aumenta conforme se irradia con fluencias cada vez mayores.

Al comparar todos los datos obtenidos, podemos observar dos comportamientos en el tamaño de la burbuja como función de la fluencia. El primero en donde para coeficientes de absorción lineal bajos (7 cm^{-1} y 45 cm^{-1}), la figura 35 muestra un comportamiento logarítmico. El segundo comportamiento en la formación de la burbuja se presenta para coeficientes de absorción grandes (130 cm^{-1} y 215 cm^{-1}) la relación del tamaño de la burbuja como función de la fluencia de irradiación relativa muestra un comportamiento exponencial.

Esto sugiere un posible efecto secundario de las propiedades térmicas del material en el volumen circundante al de irradiación. De manera que al tener éste una mayor temperatura, generada por una mayor absorción de la energía óptica, su estado de gel disminuye, haciendo que la expansión de la burbuja sea mayor a la misma fluencia normalizada (n veces F_0). Este escenario también podría esperarse en tejido con estructuras coloidales similares.

De manera preliminar se hicieron experimentos con la intención de estudiar los efectos foto-inducidos en la muestra, generados por irradiaciones con fluencias menores a las definidas como la fluencia umbral para la formación de burbuja permanente F_u en modelos de tejido sin colorante.

Para esto se agregó un haz de luz blanca en contrapropagación con el haz láser incidente en la muestra durante la irradiación y esto nos permitió obtener una imagen de ésta a tiempo real, la cual se adquiría en la cámara del plano equivalente de blanco (*PEB*) (Figura 55).

También por medio de la lectura de un fotodiodo (Thorlabs, Apéndice A) se midió la intensidad transmitida a través de la muestra de un láser He-Ne de irradiación continua que se propaga colinealmente con el láser pulsado que produce la burbuja.

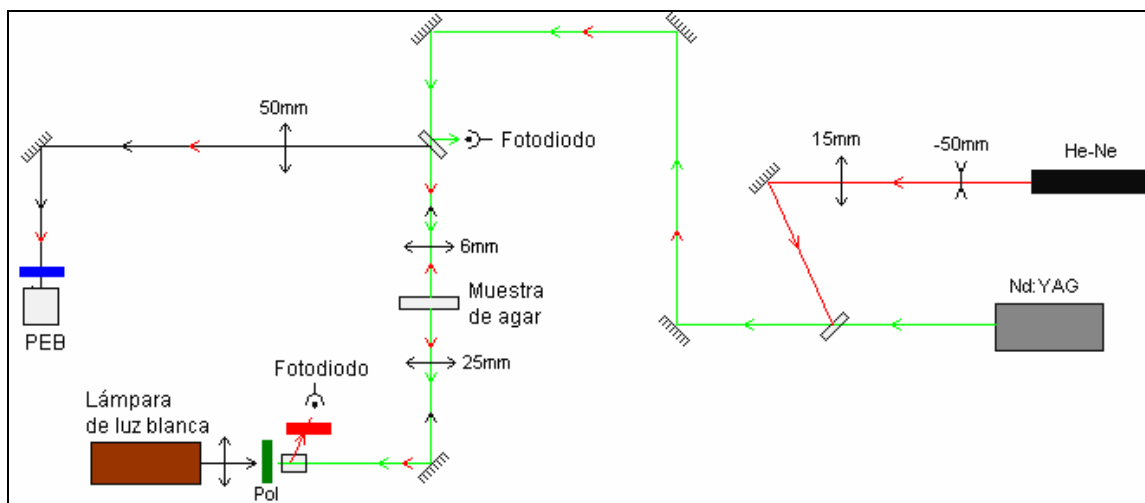


Figura 55. Esquema de experimentos para detección de burbujas transitorias.

De estos experimentos preliminares se encontró que para fluencias menores a las de la fluencia umbral de formación de burbuja permanente F_u , se forman burbujas transitorias en la muestra, como lo podemos observar en la figura 56.

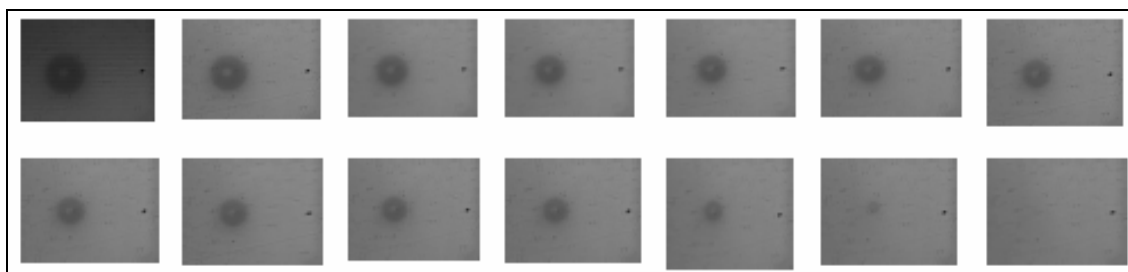


Figura 56. Secuencia de fotos que describen el cambio en el diámetro de burbuja transitoria en el tiempo.

En la figura 56 podemos observar la evolución temporal del diámetro de una burbuja transitoria formada en un modelo de tejido de una capa. Se aplicó un solo pulso láser de 5 ns (532 nm) con una fluencia de 204.7 J/cm^2 . Las imágenes de la fila superior, corresponden a los tiempos de captura: 0 s, 0.4 s, 1.06 s, 1.73 s, 2.4 s, 3.06 s y 3.77 s, respectivamente; mientras que las fotografías de la fila inferior corresponden a los tiempos

de captura: 4.4 s, 5.06 s, 5.73 s, 6.4 s, 9.7 s, 13.06 s, 15.5 s respectivamente. La captura de imágenes (video) se inicializa con el disparo del láser.

Debido a que en estos experimentos se trabajaron modelos de una capa y sin colorante, sugerimos hacer un estudio más profundo, en el que se agreguen más variables en el procedimiento experimental, para poder entender a detalle el mecanismo de formación de estas burbujas, de manera que su análisis también permita comprender de una mejor manera la formación de las burbujas permanentes.

Cabe mencionar que la existencia de estas burbujas transitorias en el agar da cabida a posibles aplicaciones en el campo de la oftalmología [Mina Rosales, 2007], en donde para la inserción de “anillos intra-estromales” de PMMA en la cornea, se requiere de la formación de canales intra-estromales con dimensiones del orden de $150\mu\text{m}$ a $300\mu\text{m}$ de ancho.

Estos canales pueden ser generados con burbujas transitorias en la cornea para se puedan insertar estos anillos y posteriormente las burbujas se colapsen sobre estos dejándolos firmes dentro de la cornea [Mina Rosales, 2007].

IV.3 Difusión de calor

En lo que corresponde a los resultados obtenidos de la difusión térmica, nos podemos dar cuenta que se obtuvieron mediciones que correspondían a lo esperado. Es decir, conforme se va aumentando la fluencia de irradiación también aumenta la temperatura alrededor del volumen irradiado.

Y por otro lado, conforme se va aumentando el coeficiente de absorción, también aumenta la temperatura para irradiaciones a fluencias F/F_u similares.

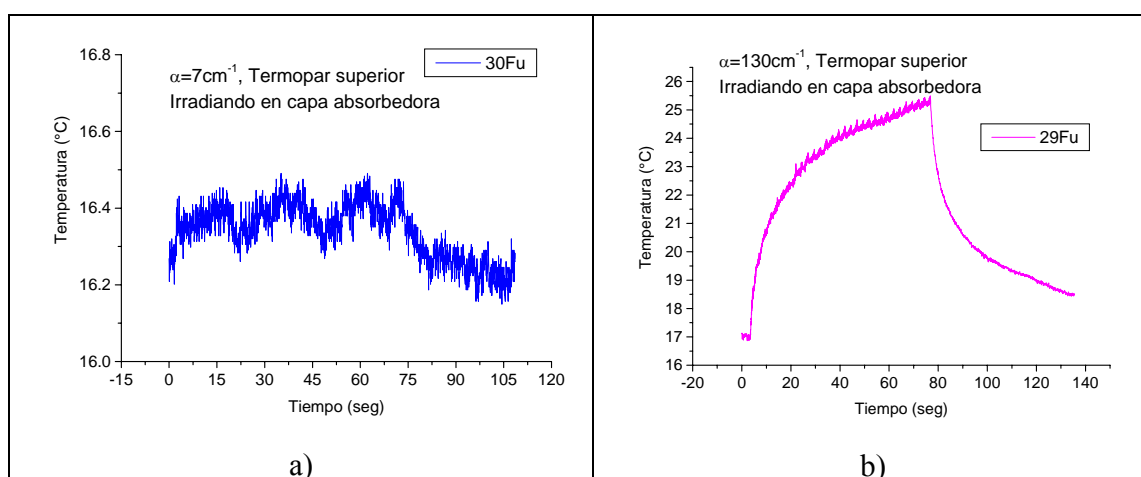


Figura 57. Comparación de mediciones de difusión de calor para muestras con distinto coeficiente de absorción.

Podemos observar la figura 57, la confirmación de cómo al irradiar dos muestras de distinto coeficiente de absorción (con pulsos de 5ns) a fluencias de aproximadamente 30 veces F_u , se alcanza una mayor temperatura en el modelo con mayor coeficiente de absorción lineal. Ambas irradiaciones fueron hechas a la misma profundidad, $250\mu\text{m}$ dentro de la *capa absorbedora*, a una frecuencia de repetición de 10Hz durante 60 segundos. Cabe recordar que las mediciones de temperatura se hicieron a una distancia de $150\mu\text{m}$ de distancia del punto de irradiación.

En la figura 57a, podemos observar un cambio de temperatura foto-inducido para el caso de la muestra con agar transparente ($\alpha=7\text{cm}^{-1}$) que es de alrededor de 0.5°C . En comparación, para el caso de la muestra con $\alpha=130\text{cm}^{-1}$ (figura 57b), el cambio de

temperatura foto-inducido, a la misma fluencia (29 veces F_u); es de aproximadamente 8.5°C.

Esto es un resultado bastante predecible, que obviamente depende del coeficiente de absorción lineal del material en la muestra. Es decir, conforme mayor sea éste, mayor será el cambio de temperatura que se inducirá en la muestra a pesar de ser irradiada a una fluencia relativa similar, que consistentemente sucede en el caso de la muestra con coeficiente de absorción más pequeño.

Para poder entender con más detalle el efecto térmico inducido en las muestras, se trabajó con un modelo computacional de diferencias finitas en MATLAB. En donde la intención fue modelar nuestros experimentos de difusión de calor y así poder predecir la temperatura directamente en el volumen irradiado.

En particular se analizó la muestra de 215cm⁻¹, dado que es en la que hubo un mayor efecto térmico, además de ser éste el valor del coeficiente de absorción lineal de la sangre a 532nm. Este resultado es interesante, como se mencionó en el capítulo II, el agar en su estado de gel y a presión de una atmósfera, es un material que para licuarse necesita alcanzar temperaturas entre los 60°C y 80°C. Obviamente podemos esperar que se requieran temperaturas aún mayores (~ 100°C) para alcanzar un estado de vapor.

Por otra parte, como lo podemos ver en el resultado del modelo numérico, la temperatura alcanzada en el volumen de irradiación a la fluencia umbral es menor de 55°C. (línea negra, figura 34a). Se reitera que esto sucede para el modelo de tejido con el mayor coeficiente de absorción lineal de la sangre.

Para validar el resultado del modelo computacional, podemos comparar la temperatura que se obtiene de dicho modelo y que corresponde al termopar superior (línea

roja, figura 34a). En donde podemos observar que la medición está alrededor de los 35°C. Mientras que para el caso experimental (línea morada, figura 34b) se obtuvo una medición de aproximadamente 25°C. Esto quiere decir que a pesar de las limitantes físicas mencionadas antes para nuestro modelo, la diferencia entre la medición experimental y la medición numérica es pequeña; cabe recordar que el modelo computacional considera presión constante durante la irradiación y no considera cambios de estado. Entonces si es posible darnos una idea de lo que pudiera estar ocurriendo en realidad en nuestro modelo de tejido, hablando de la difusión de temperatura; como lo podemos observar en la figura 58.

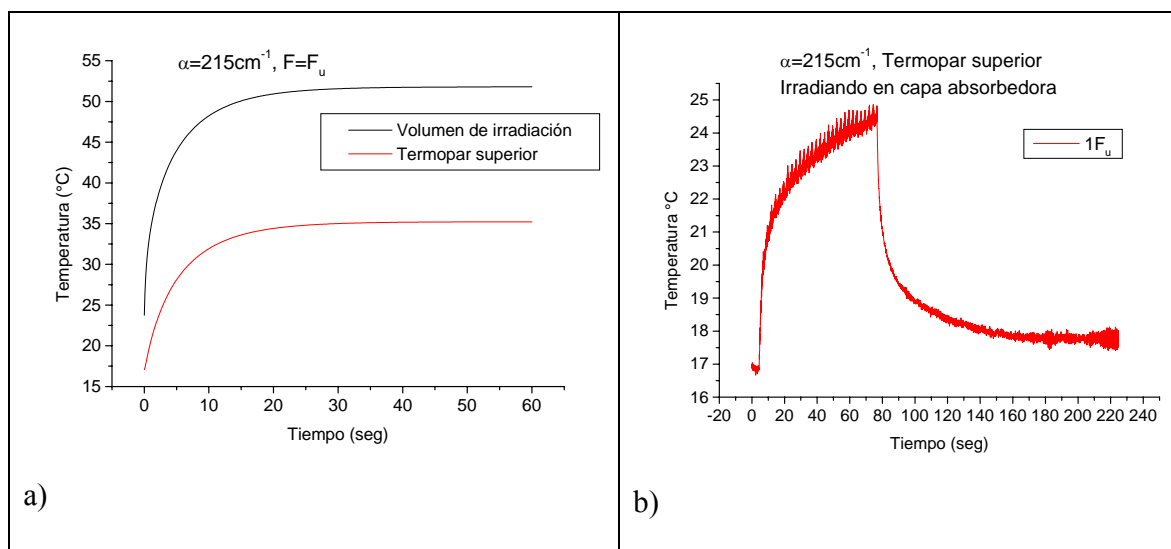


Figura 58. Comparación de resultados experimentales y numéricos para la irradiación de una muestra de agar con $\alpha=215\text{cm}^{-1}$.

Un factor a considerar es el hecho de el tiempo de calentamiento (tiempo a la mitad de la temperatura máxima) en el caso del modelo computacional resultó ser de 5.2 s, mientras que en el caso experimental, el tiempo de calentamiento resultó ser de 4.8 s, esta diferencia de 0.4 s nos muestra la buena cercanía de ésta aproximación teórica al escenario experimental.

Por otra parte, es importante recalcar que nuestro modelo nos dice que para este caso acumulativo y con $\alpha=215\text{cm}^{-1}$, no se alcanza la temperatura necesaria para licuar el agar. Por lo tanto, es obvio esperar que esto tampoco suceda para las muestras de menor coeficiente de absorción.

Todo esto también nos dice que la componente termodinámica del proceso de irradiación no tiene una gran influencia en el mecanismo de formación de burbuja. De igual manera podemos recalcar que la burbuja que se forma a la fluencia umbral para todos los modelos de tejido es aproximadamente del mismo diámetro $\sim 70\ \mu\text{m}$; a pesar que las fluencias F/F_u para cada modelo de tejido tengan un efecto térmico distinto es sus respectivas muestras. Tal y como lo podemos apreciar en la figura 59.

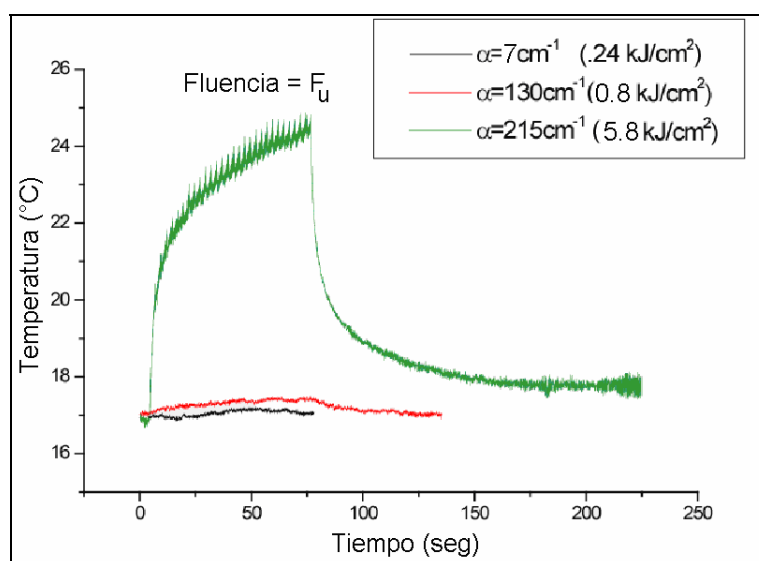


Figura 59. Comparación de mediciones de difusión de temperatura para modelos de tejido con distinto coeficiente de absorción irradiados a la fluencia umbral F_u .

Es importante insistir en el hecho de que los cambios de temperatura que se alcanzan en la vecindad del punto de irradiación están muy por debajo de los ΔT que ocasionarían algún tipo de daño irreversible en el tejido (fundido, carbonización), de hecho, estos cambios de temperatura no producirían hipertermia en el tejido (60°C).

Por otro lado, como ya se mencionó previamente, los cambios de temperatura alcanzados en nuestros experimentos, apoyan la hipótesis de que el mecanismo de formación de la burbuja no es dominado por la generación de calor y el ΔT correspondiente, sino por un efecto de rompimiento dieléctrico o ablación en donde la potencia o bien, la intensidad de cada pulso suministrado a la muestra, juegan un papel importante en la formación de dicha burbuja.

IV.4 Irradiación con pulsos de 90 fs

De igual forma consideramos que uno de los resultados más importantes es el que obtuvimos sobre la difusión térmica foto-inducida en el modelo de tejido cuando irradiamos con pulsos de 80 fs a 800 nm.

En el capítulo anterior se mencionó que estos experimentos se llevaron a cabo irradiando la muestra con trenes de pulsos (MHz) de 80 fs a una frecuencia de repetición de 10 trenes de pulsos por segundo (sección II.2 de este documento) durante un lapso de aproximadamente 60 segundos. Es decir, de una manera muy similar a lo que se realizó con los pulsos de 5 ns.

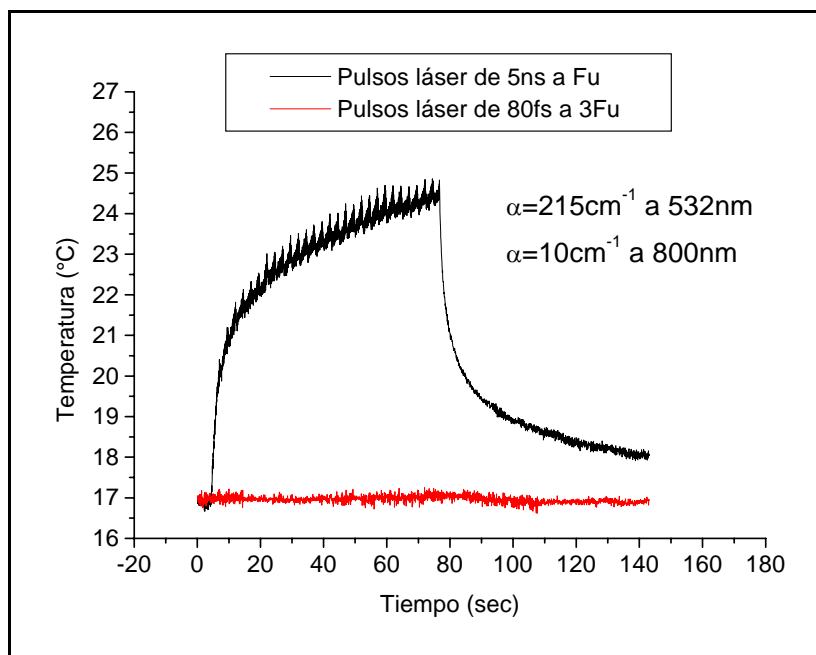


Figura 60. Comparación en las mediciones de cambio de temperatura de una misma muestra irradiada con pulsos de 5ns y 90fs.

Tal y como lo podemos ver en la figura 60, se analizó la difusión térmica en el modelo de $\alpha=215\text{ cm}^{-1}$, dado que es el que mayor efecto térmico había presentado para pulsos de 5 ns. Y encontramos que a pesar de que la muestra se irradió a 3 veces la fluencia umbral de formación de burbuja en el régimen de fs, el calentamiento láser que se observa es prácticamente despreciable.

Debemos hacer notar que irradiando la muestra a la fluencia umbral, con pulsos de 80 fs, se obtienen burbujas con un diámetro de aproximadamente $10\ \mu\text{m}$.

Estos resultados nos muestran que en el caso de los pulsos de 90 fs, prácticamente no existe una componente térmica en el mecanismo de formación de burbuja. Lo cual nos permite confirmar que en este caso el mecanismo de interacción es principalmente

dependiente de la intensidad del pulso y no de la transferencia de la energía óptica al medio en forma de calor a través de α .

IV.5 Conclusiones y propuesta para futuros estudios.

Durante esta investigación fue posible demostrar que existe una bien determinada fluencia umbral para la formación de burbuja en el gel del agar. Lo cual es muy útil para estudiar y entender la interacción de pulsos cortos con tejido biológico. En particular pudimos demostrar la formación de burbujas sin la necesidad de generar cantidades grandes y mucho menos excesivas de calor. En el caso de pulsos de fs, la formación de burbujas en el agar ocurre en ausencia “total” de calor, o en todo caso, la cantidad de calor generado es despreciable.

Se encontró que, aunque en el caso de la irradiación con pulsos láser de ns el mecanismo de la formación de la burbuja tiene una contribución térmica importante, la irradiación de gel de agar con pulsos láser de fs muestra buena evidencia de que el mecanismo de formación de burbuja tiene una dependencia importante con la intensidad de los pulsos láser y por lo tanto con la duración del pulso; es decir, la formación de la burbuja tiene un origen en donde domina el rompimiento dieléctrico del gel.

También resulta interesante el hecho de que la formación de la burbuja usando pulsos láser de fs ocurre sin efectos térmicos significativos, sugiriendo una interacción del láser-tejido con daño térmico colateral insignificante. Por otro lado se demostró también el hecho de que es posible inducir la formación de burbujas tanto permanentes como

transitorias y esto está determinado principalmente por los parámetros láser como τ_p , F/F_u , frecuencia de repetición y número de pulsos aplicados.

Nuestros resultados prueban el control y la precisión que se puede llegar a tener sobre el daño inducido, es decir, podemos suprimir los efectos colaterales que normalmente acompaña la irradiación láser de tejido biológico. Los láseres de pulsos cortos son muy adecuados para aplicaciones médicas en donde es necesario irradiar tejido con una alta precisión que permita tratamientos altamente localizados.

Desde el punto de vista óptico-físico es necesario hacer más estudios para comprender el mecanismo de formación de burbuja en el tejido. En particular, sería deseable analizar las ondas de sonido y presión mecánica foto-inducidas en los modelos de tejido al ser irradiados por pulsos cortos. Dichas ondas mecánicas pueden inducir daño a las paredes celulares si estas ondas alcanzan una magnitud y distancia de propagación considerables.

Se propone diseñar un sensor piezoeléctrico con el cuál se puedan llevar a cabo estas mediciones de ondas de presión.

En el mismo sentido, también se propone hacer un estudio más detallado en la formación de burbujas transitorias, para que en conjunto con el análisis previamente establecido, se pueda obtener una caracterización de la evolución y dinámica de estas burbujas. También podría ser interesante hacer un estudio detallado de la composición química del agar, para poder ya sea descartar o considerar las posibilidades de interacción de los componentes del agar o de la forma de su estructura con los pulsos cortos y ultracortos [Mayorga Cruz *et al*, 2006].

Una buena caracterización de la interacción de los pulsos cortos y ultracortos con los modelos de tejido de gel de agar, podrán sentar las bases para el estudio de la interacción de estos pulsos con tejido real. Continuando con los esfuerzos en la irradiación de células de manera que también se pueda definir el umbral de daño para distintos tipos de tejido y así se puedan generar avances considerables en la tecnología láser para aplicaciones médicas.

Literatura Citada

- Banks P.S., Feit M.D., Rubenchik A.M., Stuart B.C. y M.D. Perry. 1999. Material effects in ultra-short pulse laser drilling of metals. *Applied Physics*. 69: 377-380 p.
- Davis KM. 1996. Writing waveguides in glass with a femtosecond laser, *Optics Letters*, 21(21): 1729-1731 p.
- Glower. 2000. Industrial applications of láser micromachining *Optics Express*, 7 (2): 56-67 p.
- Isakov V., Afanasiev Y., Chichkov B. y A. Kanavin. 2000. Thermal regime of laser ablation of metals by ultrashort pulses of low fluence. *High Power Laser Ablation II*. 3885: 481-490 p.
- Jones R., K. Dowling, M. Cole y P. French. 1999. Fluorescence lifetime imaging for biomedicine using all-solid state ultrafast laser technology, *Conference of Comercial and Biomedical Applications of Ultrafast Lasers*: 86-91 p.
- Juhasz T., Loesel F., Kurtz R. y C. Horvath. 1999. Corneal Refractive Surgery with Femtosecond Lasers. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*. 5 (4): 902-909 p.
- Kanavin A., Afanasiev Y. y B. Chichkov. 1998. Heat transport in metals irradiated by ultrashort laser pulses. *High Power Laser Ablation*. 57 (23): 698-703 p.
- Kim B., Feit M. Rubenchik A. y B. Mammini. 1998. Optical feedback signal for ultrashort laser pulse ablation of tissue. *Applied Surface Science*. 127: 857-862 p.
- Kurtz R., Liu X., Juhasz T. y V. Elnor, 1994. Tissue ablation as a function of laser pulsewidth: 56-57p.
- Loesel F., Fischer J., Gothz M., Horvath C. y T. Juhasz. 1998. Non-thermal ablation of neural tissue with femtosecond láser pulses. *Applied Physics*. 66: 121-128p.
- Lu, XiaoWu y An Zhi. 1993. Action and reaction of plasma shock wave in the operation of ophthalmology. *Ophthalmology Technologies III*, SPIE 1877: 328-331p.

- Lodish F., Matsudaira P., Kaiser C. y M. Krieger 2005 *Molecular Cell Biology*, Quinta edición, 961 p.
- Maisterrena Epstein Rodrigo J. 2006. “Características de ablación láser de metales y PMMA usando pulsos de 5ns y 80fs”. Tesis de Maestría. CICESE, Ensenada Baja California, México.
- Matthews, Da Silva L. Kim B. 1999. Surgical applications of ultrashort pulse laser technology. *Advance Solid State Lasers*: 342-344p.
- Mayorga C., Marquez A. y S. Martínez, 2006, Estudio experimental de colorantes utilizando bombeo óptico en UV, mediante la técnica Z-Scan. Congreso Nacional de Física, San Luis Potosí, 2006.
- Mina Rosales Alejandra, 2007. Ablación de tejido corneal utilizando pulsos de nanosegundos y femtosegundos. Tesis de Maestría, CICESE, Ensenada Baja California México.
- Molecular probes, “Spectra for green-fluorescent SYTO dyes”
- Paltauf G. 1995. Model study to investigate the contribution of spallation to pulsed laser ablation of tissue. *Laser in Surgery and Medicine*. 16: 277-287 p.
- Rau K, Quinto-Su P. y A. Hellman. 2006. Pulsed laser microbeam cell lysis: Time resolved imaging and analysis of hydrodynamic effects. *Biophysical Journal*, 91: 317-329 p.
- Savas G. y A. Koubenakis. 2002. Laser- Induced material ejection from model molecular solid and liquids: mechanisms, implications, and applications. *Chemical Review*. 103: 349-393 p.
- Tortora J. G., y P. N. Anagnostakos, 1993. *Principios de anatomía y fisiología*. Harla. Sexta edición. México: 1206 p.
- Vogel, A. y V. Venugopalan. 2003. Mechanisms of Pulsed Laser Ablation of Biological Tissues. *Chemical Review*, 103: 577-644p.
- Zhang F., Chen B., Zhao S., Yang S. y R. Chen. 2004. Noninvasive determination of tissue optical properties based on radiative transfer theory, *Optics and Laser Technology*, 36: 353-359p.

Apéndice A

Especificaciones del equipo empleado en procedimiento experimental

FOTODIODO

Fabricante: ThorLabs

Material: Silicio

Tiempo de respuesta: 1ns

Área activa: 13mm²

I dark 20nA

Rango espectral: 350-1100nm

MEDIDOR DE ENERGÍA

Fabricante: Ophir Optronics

Respuesta espectral metálico: 0.15-12μm

Reflectividad: 50% aprox.

Máx. ancho de pulso: 20μs

Máx. frecuencia de pulso: 4 kHz

Escala energía: 10 mJ-20 μJ

Min. Energía detectada: 2 μJ

Umbral de daño < 100ns 0.1 J/cm² ; 1μs 0.2 J/cm²

Apertura: 12 mm

Máx. potencia promedio: 2 W

Máx. densidad potencia promedio: 50 W/cm²

CÁMARA CCD HDCS- 1020 (PEB)

Fabricante: Agilent Technologies

Número de píxeles: 352 X 288

Tamaño por píxel: 7.4 X 7.4 mm

Área de captura: 2.6 X 2.13 mm

Sensitividad: 1.1 V/Lux/seg

Resolución ADC: 8 bit

Rango Dinámico: 61 dB

consumo de energía: 90 mW/150 mW (stanby)

Voltaje de operación: 3.3 V

Gama variable

LENTE DE TRABAJO

Fabricante: Thorlabs
Modelo: C240TM-B
Tipo de lente: Asférica
Abertura Numérica: 0.5
Abertura libre: 8mm
Distancia focal efectiva: 8mm
Abertura libre con montura: 6mm

LÁSER DE NANOSEGUNDOS: MINILITE II, Q SWITCHED, ND: YAG LÁSER

longitud de onda: 532nm
Energía: 25 mJ
Potencia pico: 6.3 MW
Potencia promedio: 375 mW
Ancho de pulso: 3-5 ns
Estabilidad: 3%
Polarización: Vertical
Tamaño del haz <3 mm
Divergente <3 mrad
Frecuencia de repetición: 1-15 Hz

CAMARA DIGITAL

Fabricante: Fuji
Modelo: A400
Lente 3x
f 8-24 mm
Definición 4 Mega Pixeles

TARJETA DE ADQUISICIÓN DE DATOS

Fabricante: INSTRUNET
Modelo: 200 PCI
Número de entradas análogas: 16 terminales/ 8 diferenciales
Resolución: 14 bits
Tiempo de conversión: 4 μ s min
Rango de señal ruido: 8 dB
linealidad diferencial : \pm 1.5 LSB
integral: \pm 2 LSB
Protección de salida de sobre-voltaje: \pm 15 V
Impedancia de salida > 22 M Ω , 3pf
Voltaje común \pm 5 V min (CMR \pm 80 dB)

TERMOPARES

Fabricante: Omega
tipo K, 127 μ m de diámetro
Resolución: ~0.5 0 C

PROGRAMA IMAGE J

Leguaje: Java

Aplicaciones:

Medición de área, promedio, desviación estandar, medida de la longitu y ángulos en imágenes, densidad estándar, generación de histogramas y muestreo de perfiles.

Procesamiento de colores 32 bits en RGB o HSV

Tipo de datos: 8 bit en escala de grises 16 bits

MICROSCOPIO DE DISECCIÓN:

1)

Fabricante: Edmund Industrial Optics

Aumento de ocular 10 X, aumento en objetivo 1X, 4X

2)

Fabricante: Olympus SZH

Aumento de ocular 10 X, aumento en objetivo hasta 60 X

MICROSCOPIO CONFOCAL

Fabricante: Zeiss

Modelo: Axiovert 200M

Objetivos: 4X, 10X, 20X, 100X

Láseres de excitación:

Argón 200mW, 200nm

HeNe 15mW, 633nm

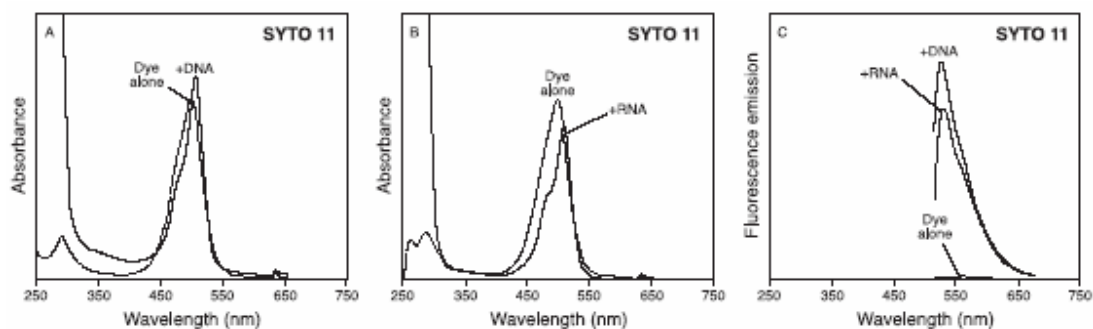
HeNe 5mW, 543nm

Apéndice B

Especificaciones de fluorocromos utilizados en el los procedimientos experimentales.

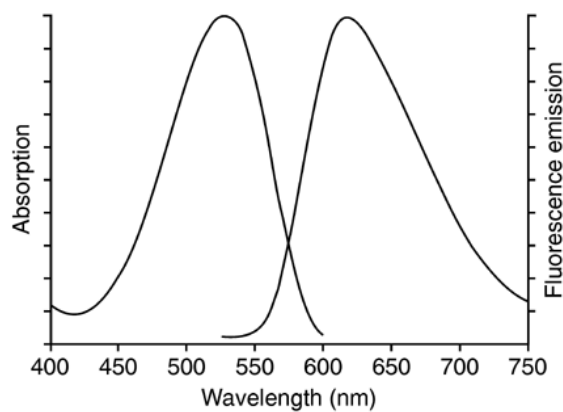
SYTO-11

Espectro de excitación y fluorescencia del SYTO-11*.



Homodímero de etidio

Espectro de excitación y fluorescencia del homodímero de etidio*.



*Fuente: Molecular probes; <http://www.invitrogen.com>

Apéndice C

Programa de simulación numérica de análisis térmico

Diseño y comentarios por: Francisco Pérez Gutiérrez, Univ. de California Riverside.

```
%principal program
% function A=Amatrix(Dx,Dt,m,n,rho,Cp,kond,conv)
% function TI=TIvector(Ts,q,Tinf,Dt,Dx,m,n,n1,n2,n3,Pw,Ep,Mua2,Mua1,conv,
Tg,rho,Cp,kond)
clear all
% Load parameters
P=load('diffusion.in');
flag_single_lin=P(1);flag_single_log=P(2);flag_multiple=P(3);
Ep=P(4);Pw=P(5);Fr=P(6);
sin_pulse=P(7);sin_no_pulse=P(8);numpulses=P(9);
mult_pulse=P(10);mult_no_pulse=P(11);
Mua1=P(12);Mua2=P(13);rho=P(14);Cp=P(15);kond=P(16);
Ts=P(17);TsL=P(18);Tinf=P(19);Tg=P(20);conv=P(21);

%MESH DEFINITION
L=5000.0E-6;
He=1750.0E-6;
n1=6;
n2=n1+3;
n3=n2+13;
n=n3;
m=61;
Dx=He/(n-1);

%Principal program_single_pulse LINEAR GRAPH
if flag_single_lin,
    time=0.0;
    ttot=0.0;
    Dt1=Pw/sin_pulse;
    Dt2=((1/Fr)-Pw)/sin_no_pulse;
    for j= 1:1;          %Number of pulses to simulate
        if time < Pw;
            for i=1:sin_pulse;
                Dt=Dt1;
                ttot=ttot+Dt;
                time=time+Dt;
                q =1.0;
                A=Amatrix(Dx,Dt,m,n,rho,Cp,kond,conv);
```



```

TI=Tlvector(Ts,q,Tinf,Dt,Dx,m,n,n1,n2,n3,Pw,Ep,Mua2,Mua1,conv,Tg,rho,Cp,kond);
    Ts=A\TI;
    Tpul1(i)=Ts(428);
    gtime1(i)=ttot;
end
end

if (time >= Pw); %& (time <= 0.1);
    for i=1:sin_no_pulse;
        Dt=Dt2;
        ttot=ttot+Dt;
        time=time+Dt;
        q =0.0;
        A=Amatrix(Dx,Dt,m,n,rho,Cp,kond,conv);

TI=Tlvector(Ts,q,Tinf,Dt,Dx,m,n,n1,n2,n3,Pw,Ep,Mua2,Mua1,conv,Tg,rho,Cp,kond);
    Ts=A\TI;
    Tpul2(i)=Ts(428);
    gtime2(i)=ttot;
end
end
end
Tpulse=[Tpul1 Tpul2];
Gtime=[0 gtime1 gtime2];
else
end

%Principal program_single_pulse LOG GRAPH
if flag_single_log,
    time=0.0;
    ttot=0.0;
    Dt1=Pw/sin_pulse;
    DDD=logspace(log10(Pw),log10(1/Fr),(sin_no_pulse+1));
    for l=1:(sin_no_pulse);
        Dt2L(l)=DDD(l+1)-DDD(l);
    end

for j= 1:1;          %Number of pulses to simulate
                    if time < Pw;
                        for i=1:sin_pulse;
                            Dt=Dt1;
                            ttot=ttot+Dt;
                            time=time+Dt;

```

```

    q = 1.0;
    A=Amatrix(Dx,Dt,m,n,rho,Cp,kond,conv);

    TI=TIvectorLOG(TsL,q,Tinf,Dt,Dx,m,n,n1,n2,n3,Pw,Ep,Mua2,Mua1,conv,Tg,rho,Cp,kond
);
    TsL=A\TI';
    TpUL1(i)=TsL(428);
    gtimeL1(i)=ttot;
    end
end

if (time >= Pw); %& (time <= 0.1);
    for i=1:sin_no_pulse;
        Dt=Dt2L(i);
        ttot=ttot+Dt;
        time=time+Dt;
        q = 0.0;
        A=Amatrix(Dx,Dt,m,n,rho,Cp,kond,conv);

        TI=TIvectorLOG(TsL,q,Tinf,Dt,Dx,m,n,n1,n2,n3,Pw,Ep,Mua2,Mua1,conv,Tg,rho,Cp,kond
);
        TsL=A\TI';
        TpUL2(i)=TsL(428);
        gtimeL2(i)=ttot;
        end
    end
    end
    TpUL=[TpUL1 TpUL2];
    GtimeL=[0 gtimeL1 gtimeL2];
else
end

%Principal program_multiple_pulses
if flag_multiple,
    time=0.0;
    ttot=0.0;
    Dt1=Pw/mult_pulse;
    Dt2=((1/Fr)-Pw)/mult_no_pulse;
    for j= 1:num_pulses; %Number of pulses to simulate
        %for i=1:(mult_pulse+mult_no_pulse-1); %Number of time steps
        (pulse + no_pulse)
        if time < Pw;
            for i=1:mult_pulse;
                Dt=Dt1;
                ttot=ttot+Dt;
            end
        end
    end
end

```

```

        time=time+Dt;
        q =1.0;
        A=Amatrix(Dx,Dt,m,n,rho,Cp,kond,conv);

TI=TIVector(Ts,q,Tinf,Dt,Dx,m,n,n1,n2,n3,Pw,Ep,Mua2,Mua1,conv,Tg,rho,Cp,kond);
    Ts=A\TI';
    end
end

if (time >= Pw); %& (time <= 0.1);
    for i=1:mult_no_pulse;
        Dt=Dt2;
        ttot=ttot+Dt;
        time=time+Dt;
        q =0.0;
        A=Amatrix(Dx,Dt,m,n,rho,Cp,kond,conv);

TI=TIVector(Ts,q,Tinf,Dt,Dx,m,n,n1,n2,n3,Pw,Ep,Mua2,Mua1,conv,Tg,rho,Cp,kond);
    Ts=A\TI';
    end
end

    %end
    ttot
    Ts;
    time=0.0;
    Thermo1(j)=Ts(495);
    Thermo2(j)=Ts(891);
    Irrpoint3(j)=Ts(428);
    end
else
end

%Plot results

if flag_single_lin,
    %xx1=linspace(0,Pw,(sin_pulse+1));
    %xx2=linspace((Pw+Dt2),(1/Fr),(sin_no_pulse));
    %xxx=[ xx1 xx2 ];
    TTpulse=[Tinf Tpulse];

    figure(1)
    %plot(xxx,TTpulse,'ro-');
    plot(Gtime,TTpulse,'ro-');

```

```

    legend('Temperature at the Beam focus')
    title('First-pulse Temperature Dynamics')
    xlabel('Time [s]')
    ylabel('Temperature [°C]')
end

if flag_single_log,
    %xx1L=linspace(0,Pw,(sin_pulse+1));
    %xx2L=logspace(log10(Pw+Dt2L(1)),log10(1/Fr),(sin_no_pulse));
    %xxxL=[ xx1L xx2L ];
    TTpulseL=[Tinf TpulseL];

    figure(2)
    %semilogx(xxxL,TTpulseL,'ro-');
    semilogx(GtimeL,TTpulseL,'ro-');
    legend('Temperature at the Beam focus')
    title('First-pulse Temperature Dynamics')
    xlabel('Time [s]')
    ylabel('Temperature [°C]')
end

if flag_multiple,
    ttt=linspace(0,(numpulses/Fr),numpulses);
    figure(3)
    plot(ttt,Irrpoint3,'r',ttt,Thermo1,'b',ttt,Thermo2,'g');
    legend('Irrpoint','Thermo 1','Thermo 2')
    title('Temperature Dynamics')
    xlabel('Time [s]')
    ylabel('Temperature [ ^oC]')
end

%Saving Data
if flag_single_lin,
    TIRR=[transpose(TTpulse)];
    GTIME=[transpose(Gtime)];

    fid=fopen('TsingleLIN.dat','w');
    for j=1:(1+sin_pulse+sin_no_pulse);
        fprintf(fid,'%d %d\n', GTIME(j), TIRR(j) );
    end
    fclose(fid);
end

if flag_single_log,

```

```
TIRRL=[transpose(TTpulseL)];
GTIMEL=[transpose(GtimeL)];

fid=fopen("TsingleLOG.dat",'w');
    for j=1:(1+sin_pulse+sin_no_pulse);
        fprintf(fid,'%d %d\n', GTIMEL(j), TIRRL(j) );
    end
fclose(fid);
end

if flag_multiple,
    T1=[transpose(Thermo1)];
    T2=[transpose(Thermo2)];
    I3=[transpose(Irrpoint3)];
    tcolumn=[transpose(tt)];

    fid=fopen("Tmultiple.dat",'w');
        for j=1:numpulses;
            fprintf(fid,'%d %d %d %d\n', tcolumn(j), I3(j), T1(j), T2(j) );
        end
    fclose(fid);
end

save result.mat
```

