



EDUCACIÓN

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Tecnológico Nacional de México

Centro Nacional de Investigación
y Desarrollo Tecnológico

Tesis de Doctorado

Interacción asistida por ultrasonido célula a
célula para la inactivación de células de
cáncer

presentada por
M.C. Julio Gómez Girón

como requisito para la obtención del
grado de

**Doctor en Ciencias en Ingeniería
Mecánica**

Director de tesis
Dr. José María Rodríguez Lelis

Cuernavaca, Morelos, México. Marzo de 2025.



Educación
Secretaría de Educación Pública



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO



Centro Nacional de Investigación y Desarrollo tecnológico
Subdirección Académica

Cuernavaca Mor, 13/marzo/2025

Oficio No. SAC/085/2025

Asunto: Autorización de impresión de tesis

JULIO GÓMEZ GIRÓN
CANDIDATO AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
EN INGENIERÍA MECÁNICA
P R E S E N T E

Por este conducto, tengo el agrado de comunicarle que el Comité Tutorial asignado a su trabajo de tesis titulado "Interacción asistida por ultrasonido célula a célula para la inactivación de células de cáncer", ha informado a esta Subdirección Académica, que están de acuerdo con el trabajo presentado. Por lo anterior, se le autoriza a que proceda con la impresión definitiva de su trabajo de tesis.

Esperando que el logro del mismo sea acorde con sus aspiraciones profesionales, reciba un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Excelencia en Educación Tecnológica®

"Conocimiento y Tecnología al Servicio de México"



CARLOS MANUEL ASTORGA ZARAGOZA
SUBDIRECTOR ACADÉMICO

c.c.p. Departamento de Ingeniería Mecánica
Departamento de Servicios Escolares

CMAZ/lmz



2025
Año de
La Mujer
Indígena

Interior Internado Palmira S/N, Col. Palmira,
C. P. 62490, Cuernavaca, Morelos Tel. 01 (777) 3627770, ext. 4104,
e-mail: acad_cenidet@tecnm.mx tecnm.mx | cenidet.tecnm.mx

cenidet
Centro Nacional de Investigación
y Desarrollo Tecnológico





Educación
Secretaría de Educación Pública



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO



Centro Nacional de Investigación y Desarrollo tecnológico
Departamento de Ingeniería Mecánica

Cuernavaca, Mor., a 12 de marzo de 2025

DR. CARLOS MANUEL ASTORGA ZARAGOZA
SUBDIRECTOR ACADÉMICO
PRESENTE

AT'n: DR. MIGUEL ANGEL CHAGOLLA ARANDA
PRESIDENTE DEL CLAUSTRO DOCTORAL
DEL DEPARTAMENTO DE ING. MECÁNICA

Los abajo firmantes, miembros del Comité Tutorial del estudiante **Julio Gómez Girón** manifiestan que después de haber revisado el documento de tesis titulado **"Interacción asistida por ultrasonido célula a célula para la inactivación de células de cáncer"** realizado bajo la dirección de **Dr. José María Rodríguez Lelis**, el trabajo se **ACEPTA** para proceder a su impresión.

ATENTAMENTE

DR. ANDRÉS BLANCO ORTEGA
CENIDET

DR. ELADIO MARTÍNEZ RAYÓN
CENIDET

DR. JOSÉ ANTONIO ARELLANO CABRERA

DR. JOAQUÍN PÉREZ ORTEGA

DR. JOSÉ MARÍA RODRÍGUEZ LELIS
CENIDET

c.c.p: Mtra. Verónica Sotelo Boyas Jefa del Departamento de Servicios Escolares
c.c.p: Dr. Carlos Manuel Astorga Zaragoza Subdirector Académico
c.c.p: Expediente

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico y seguro médico otorgado durante mis estudios de posgrado. Al Centro Nacional de Investigación y Desarrollo Tecnológico (cenidet) por la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado dentro de sus instalaciones.

Al Dr. José María Rodríguez Lelis por brindarme la oportunidad de trabajar bajo su dirección y por su guía durante todo este tiempo, así como la confianza y el apoyo brindado para el desarrollo de este trabajo. Por todos los consejos que me brindó y en especial por ser un excelente mentor y amigo.

Al comité revisor: Dr. Andrés Blanco Ortega, Dr. José Antonio Arellano Cabrera, Dr. Eladio Martínez Rayón y Dr. Joaquín Pérez Ortega por sus comentarios, consejos y observaciones acertadas en la revisión de este trabajo.

A mi madre, Carmen, por ser la mejor madre del mundo, por enseñarme a ser un hombre de bien y por siempre ser mi apoyo incondicional. A todos mis hermanos, por sus constantes consejos y por motivarme a ser mejor cada día.

A mi esposa y compañera de vida, Carolina, por su amor y apoyo incondicional en esta etapa de mi vida. Por demostrarme que nunca estoy solo, por acompañarme en cada proyecto, por luchar a mi lado y por hacer que vea el mundo con más belleza. Por su valentía y generosidad, que la hacen única, y por estar siempre a mi lado, incluso cuando ello implicó grandes sacrificios.

Al Rabino Mijael Ávila, por sus valiosos consejos sobre rectitud y generosidad, por su constante disposición para escucharme y por enseñarme que la vida va más allá de uno mismo, invitándome a formar equipo y estar al servicio de los demás.

A todos mis maestros por compartir sus conocimientos, experiencias y consejos que han contribuido en gran medida a mi formación académica.

Índice	Páginas
Lista de figuras	v
Lista de tablas	ix
Nomenclatura	xi
Resumen	xiii
Abstract	xv
Capítulo 1 Introducción.....	1
1.1 Planteamiento del problema.....	2
1.2 Justificación.....	3
1.3 Hipótesis	4
1.4 Objetivos	4
1.4.1 Objetivo general.....	4
1.4.2 Objetivos específicos	4
1.5 Alcances.....	5
1.6 Limitaciones	5
1.7 Organización de la tesis	5
Capítulo 2 Estado del arte	6
2.1 La célula y los elementos celulares que confieren rigidez estructural	6
2.2 Modelados de células mediante MEF para determinar frecuencias naturales	11
2.3. Modelos de MEF con tenseguridad, tenseguridad híbrida y bendo-tenseguridad	13
2.4 Trabajos con ultrasonido de alta intensidad en pacientes con cáncer	22
2.5 Fenómenos provocados por ultrasonidos en tejidos biológicos	26
Capítulo 3 Metodologías para la solución numérica y experimental.....	28
3.1 El método de elementos finitos	29
3.1.1 Pre-procesamiento.....	29
3.1.2 Tipos de contactos.....	32
3.2 Procesamiento	32
3.2.1 Análisis modal.....	32
3.2.2 Análisis armónico.....	33
3.2.3 Suposiciones y restricciones del análisis modal y armónico	36
3.3 Post-procesamiento	36

3.4 Metodología experimental in-vitro	36
3.4.1 Sistema de ultrasonido	36
3.4.2. Cultivo celular	37
3.4.3 Análisis de viabilidad celular	38
Capítulo 4 Análisis de elementos finitos	41
4.1 Modelo de elemento finito	41
4.2 Discretización de la geometría	44
4.2.1 Tipos de elementos de malla seleccionados	44
4.2.2 Métricas de malla.....	46
4.3 Contactos entre componentes celulares	47
4.4 Convergencia de malla	48
4.5 Condiciones de frontera	49
4.6 Propiedades de los materiales	49
4.7 Análisis de los resultados.....	50
4.7.1 Resultados del análisis modal.....	50
4.8 Análisis armónico de células	55
4.8.1 Resultados del análisis armónico amortiguado de las células	55
4.9 Análisis armónico de la variación de la intensidad de US en el núcleo de célula MCF7	57
4.10 Análisis del citoesqueleto de la célula MCF-7 mediante el MEF	59
4.11 Discusión de los resultados.....	63
Capítulo 5 Estudio experimental.....	64
5.1 Desarrollo del sistema de ultrasonido	64
5.2 Cultivo celular.....	65
5.3 Procesos de radiación con ultrasonido	67
5.3.1 Configuración de los componentes experimentales.....	67
5.3.2 Parámetros de ultrasonido y cultivos celulares.....	68
5.4 Análisis de viabilidad celular	69
5.5 Análisis de los resultados del experimento	72
5.5.1 Experimentos de ultrasonido con 31.2 kHz, 1.65 W/cm ² y 18 minutos ..	72
5.5.2 Experimentos de ultrasonido con 31.2 kHz, 4.6 W/cm ² y 18 minutos	73
5.5.3 Experimentos de ultrasonido con 31.2 kHz, 4.6 W/cm ² y 35 minutos	75
5.5.4 Experimentos de ultrasonido con 11.2 kHz, 4.6 W/cm ² y 18 minutos	77

5.6 Discusión de los resultados.....	78
Capítulo 6 Conclusiones y recomendaciones futuras.....	79
6.1 Conclusiones.....	79
6.2 Recomendaciones para trabajos futuros.....	81
7 Referencias	84
Anexo A.....	90
Anexo b	91
Anexo c	92
Anexo d	93

Lista de figuras

Páginas

Capítulo 2

Figura 2.1. Estructura de células de: a) cáncer de mama MCF-7 [1] y b) cáncer cuello uterino [26].	7
Figura 2.2. Representación física y real de los componentes del citoesqueleto: a), c) y e) muestran las representaciones físicas de los MTs, FAs y Fls, respectivamente; mientras que b), d) y f) ilustran estos componentes en su distribución real dentro de una célula. Obtenidos de [24 y 28].	9
Figura 2.3. Estructura celular que ilustra la vinculación física entre el citoesqueleto, el núcleo, el citoplasma y la membrana celular. Modificada de [29].	10
Figura 2.4. Disminución de la supervivencia de las células MCF7 después de la radiación a 24.5 [17].	11
Figura 2.5. Respuesta transitoria de una célula cancerosa (arriba) y una célula sana (abajo) en resonancia [15].	12
Figura 2.6. Modelos de células: a) modelo homogéneo y b) modelo no homogéneo. De [16].	13
Figura 2.7. Representación esquemática de la tensegridad celular: a) red con seis vigas en compresión conectadas por cables tensados, b) equilibrio estructural entre FAs tensados, MTs en compresión, y puntos de adhesión focal y c) célula adherida a la matriz extracelular en gris, con núcleo central y MTs radiales en rojo contrarrestando fuerzas hacia adentro [38].	14
Figura 2.8. Aplicación de tensegridad en células: a) Principio de tensegridad basado en un modelo computacional del citoesqueleto de una célula de músculo liso y b) Núcleo (azul con rojo) y centrosoma (verde) [39].	15
Figura 2.9. Modelo de células adherentes: Representación de MTs (rojo) y FAs (azul), con elementos en 3D que incluyen el núcleo (verde), citoplasma y membrana celular (azul claro) [40].	15
Figura 2.10. Modelos de tensegridad celular: a) representación de elementos en 3D que corresponden al núcleo (violeta) y citoplasma (azul), y b) representación en 1D del citoesqueleto, donde los FAs (morado), MTs (azul claro) y Fls (verde) se conectan al núcleo (rojo) y a la membrana celular (azul oscuro) [41, 42].	16
Figura 2.11. Modelo de células adherentes, que incluye FAs en amarillo, MTs en rosa, componentes tridimensionales del núcleo en azul, citoplasma (no visible) y membrana celular en verde [43].	17
Figura 2.12. Representación detallada del modelo celular: a) condiciones de frontera y simulación del movimiento por compresión, b) sección transversal de la célula donde muestra los componentes tridimensionales, c) distribución de MTs, d) distribución de FAs y e) Interacción entre FAs y MTs, y su relación con el núcleo [43].	17
Figura 2.13. Geometría del modelo celular: a) citoplasma, membrana y el núcleo como componentes 3D, b) tensegridad del citoesqueleto y esqueleto nuclear, c) mallado del modelo celular y d) vista de corte del modelo [19].	18

Figura 2.14. Modelos celulares y la disposición estructural de componentes del citoesqueleto: a) y b) modelo de células suspendidas. En c) y d) modelo de células adherentes. De [18].	19
Figura 2.15. Modelos de células: a) representación 3D de una célula endotelial plana, b) modelo de célula esférica para simulación de prueba de compresión, c) componentes del citoesqueleto en una célula adherente. Resultados de la simulación con vistas isométricas: d) FAs, e) red de FIs y f) distribución de MTs [20].	20
Figura 2.16. Modelo tridimensional de célula cancerosa de 5 micrómetros de diámetro: a) visualización en 3D del modelo de elemento finito con recorte que ilustra los diferentes componentes celulares y b) gráfico de la relación fuerza-deformación [44].	21
Figura 2.17. Esquema del principio de funcionamiento del HIFU, que ilustra la formación de un punto focal acústico de alta intensidad en un medio [45].	22
Figura 2.18. Elementos del experimento: a) transductor de diseño anular adaptado para la aplicación en tratamientos de HIFU y b) tejido porcino con lesiones localizadas [12].	24
Figura 2.19. Detalles del experimento: a) representación del sistema de HIFU utilizado en la radiación del ratón y b) esquema de células cancerosas escapando del tumor a través de los vasos sanguíneos [13].	25
Figura 2.20. Relación entre la temperatura, el tiempo de exposición al ultrasonido y los efectos biológicos en los tejidos [52].	27

Capítulo 3

Figura 3.1. Elementos triángulos que representan la malla [67].	31
Figura 3.2. Sistema masa-resorte de un grado de libertad [68].	33
Figura 3.3. Sistema masa-resorte de un grado de libertad sometido a carga externa [68].	34
Figura 3.4. Sistema masa-resorte-amortiguador de un grado de libertad sometido a carga externa [68].	35
Figura 3.5. Diagrama de flujo del procedimiento para evaluar la viabilidad celular.	40

Capítulo 4

Figura 4.1. Componentes en 3D de los modelos de células: a) MCF-7 y b) MCF10A.	41
Figura 4.2. Componentes del citoesqueleto en los modelos de células: a) MCF-7, b) MCF10A, c) modelo de citoesqueleto sin núcleo y d) unión de MTs, FAs y FIs en la adhesión focal (nodo amarillo).	43
Figura 4.3. Elementos en 3D de los modelos de células: a) MCF-7, b) MCF10A, c) ocho elementos en el espesor del citoplasma y dos elementos en la membrana de	

célula MCF-7 y d) ocho elementos en el espesor del citoplasma y dos elementos en el espesor de la membrana de célula MCF10A.....	45
Figura 4.4. Mallado del citoesqueleto: a) unión de cuatro FAs, b) punto de origen de todos los MTs y c) sección de un FI.	46
Figura 4.5. Calidad de malla de las células: a) MCF-7 y b) MCF10A.	46
Figura 4.6. Relación de aspecto de mallado de célula: a) MCF-7 y b) MCF10A. .	47
Figura 4.7. Contactos en los modelos celulares: a) Contacto sin separación en la interfaz núcleo-citoplasma y citoplasma-membrana y b) Contacto unido en la intersección de los MTs, FAs y FIs.....	48
Figura 4.8. Condición de frontera en la adhesión focal (nodo negro) de las células.	49
Figura 4.9. Patrones de movimiento de la célula MCF-7.	53
Figura 4.10. Comparación de las frecuencias naturales de células MCF-7 y MCF10A.	55
Figura 4.11. Amplitudes del núcleo de células MCF-7 y MCF10A con relación de amortiguamiento 10, 20 y 30%.	56
Figura 4.12. Amplitudes de la membrana de las células MCF-7 y MCF10A con relación de amortiguamiento 10, 20 y 30%.	57
Figura 4.13. Sección transversal de la célula utilizada en el análisis armónico con una frecuencia de 31.2 kHz en donde se muestra la distribución de presión sobre la membrana celular: a) vista frontal y b) vista lateral.	58
Figura 4.14. Amplitudes del núcleo celular con frecuencia forzada de 31.2 kHz con diferentes intensidades de US obtenidos del análisis armónico.	59
Figura 4.15. Condiciones de frontera del modelo NCM. Las áreas en rojo representan los puntos de sujeción debidos al contacto entre células.	60
Figura 4.16. Modelos celulares: a) NCM, b) NCM + FIs, c) NCM + Fas y d) NCM + MTs.	60
Figura 4.17. Comparación de las frecuencias naturales de los modelos celulares M1, M2, M3, y M4 con el modelo completo.	62

Capítulo 5

Figura 5.1 Componentes utilizados en el desarrollo del sistema ultrasónico: a) generador de señales, b) fuente de voltaje, c) transductor ultrasónico, d) osciloscopio, e) multímetro y f) placas de circuito impreso.....	65
Figura 5.2. Cultivo celular: a) medio y placas de cultivo y b) incubadora de células.	66
Figura 5.3. Campana de flujo laminar: a) estructura externa y b) espacio de trabajo.	66
Figura 5.4. Evolución del cultivo celular en 24, 48 y 72 horas.	67
Figura 5.5. Componentes del equipo experimental: a) transductor, estructura para el cultivo celular y base de madera para estabilización, b) gel ultrasónico, c) microscopio con cámara conectado a una computadora y d) conexión integral del	

generador de señales, fuente de voltaje, circuito de control y transductor con el cultivo.....	68
Figura 5.6. Extracción y eliminación del medio de cultivo: a) aguja utilizada para extraer el medio de cultivo celular y b) bomba de succión empleada para desechar el cultivo celular.....	69
Figura 5.7. Compuesto MTT y contenedor con agua destilada.	69
Figura 5.8. Preparación del compuesto: a) dimetilsulfóxido y b) mezcla de dimetilsulfóxido y compuesto MTT en una campana de flujo laminar en oscuridad para evitar posibles alteraciones en la mezcla.	70
Figura 5.9. Proceso de aplicación del ensayo MTT: a) adición del compuesto MTT a las células en cultivo, y b) protección de los cultivos con papel aluminio post-aplicación para evitar la fotosensibilidad.	70
Figura 5.10. Cambio de color de las células vivas debido al formazán formada en su interior.....	71
Figura 5.11. Traslado de células de la placa de cultivo a una placa con pocillos: a) se agregó dimetilsulfóxido al cultivo de células, b) se colocaron las células en una placa con pocillos y c) placa de 96 pocillos con papel aluminio.	71
Figura 5.12. El espectrofotómetro con la placa que contiene células y formazán.	72
Figura 5.13. Análisis de viabilidad celular a 31.2 kHz, 4.6 W/cm ² y 18 minutos de exposición a US en intervalos de 24, 48 y 72 horas para las células cancerosas (MCF-7) y las células sanas (MCF10A).....	74
Figura 5.14. Morfología de células radiadas con ultrasonido a las 24, 48 y 72 horas.	75
Figura 5.15. Análisis de viabilidad celular a 31.2 kHz, 4.6 W/cm ² y 35 minutos de exposición a US en intervalos de 24 y 48 horas para las células cancerosas (MCF-7) y las células sanas (MCF10A).....	76
Figura 5.16. Análisis de viabilidad celular a 11.2 kHz, 4.6 W/cm ² y 18 minutos de exposición a US en 24 horas para las células cancerosas (MCF-7) y las células sanas (MCF10A).	78

Capítulo 6

Figura 6.1. Anatomía de la mama femenina.....	81
Figura 6.2. Exposición de US en el tumor de una rata [13].	82

Anexos

Figura D.1. Plano del circuito de control de potencia.	94
Figura D.2. Simulación del circuito de control para verificar su correcto funcionamiento.	95

Lista de tablas

Páginas

Capítulo 2

Tabla 2.1. Principales componentes celulares y sus funciones [24, 25].	7
Tabla 2.2. Propiedades mecánicas de los componentes del citoesqueleto.	10
Tabla 2.3. Propiedades mecánicas del núcleo, citoplasma y membrana celular.	10
Tabla 2.4. Frecuencias naturales de célula MCF-7 y MCF0A [16].	13
Tabla 2.5. Rango de parámetros del ultrasonido en el uso clínico para inducir ablación térmica, estrés térmico, hipertermia y perturbación mecánica.	28

Capítulo 3

Tabla 3.1. Tipos de elementos de malla para geometrías 1D, 2D y 3D.	30
Tabla 3.2. Representación de los cultivos celulares de control y con radicación de US.	38

Capítulo 4

Tabla 4.1. Parámetros geométricos [16, 17].	42
Tabla 4.2. Convergencia de malla de célula MCF-7.	48
Tabla 4.3. Convergencia de malla de célula MCF10A.	48
Tabla 4.4. Propiedades mecánicas de las células [16, 17].	50
Tabla 4.5. Propiedades mecánicas de los elementos del citoesqueleto [17, 20, 30, 73].	50
Tabla 4.6. Frecuencias naturales (ω_n) de células MCF-7 y MCF10A.	51
Tabla 4.7. Masa efectiva y porcentaje de la masa desplazada en función de las frecuencias naturales de célula MCF-7.	51
Tabla 4.8. Porcentaje de masa en rotación en los diferentes modos de la célula MCF-7.	52
Tabla 4.9. Masa efectiva y porcentaje de la masa desplazada en función de las frecuencias naturales de célula MCF10A.	54
Tabla 4.10. Porcentaje de masa en rotación en los diferentes modos de la célula MCF10A.	54
Tabla 4.11. Intensidades de ultrasonido empleadas en las simulaciones y su conversión a decibeles y Pascales.	58
Tabla 4.12. Frecuencias naturales de los modelos celulares M1, M2, M3 y M4.	61
Tabla 4.13. Valores de las primeras cuatro frecuencias naturales entre el trabajo de Mubeen <i>et al.</i> [16] y el presente trabajo.	62

Capítulo 5

Tabla 5.1. Absorbancia de las muestras de control con 31.2 kHz de US durante 18 minutos.	73
Tabla 5.2. Absorbancia de las muestras de control y con 31.2 kHz de US con 35 minutos de exposición.	76

Tabla 5.3. Absorbancia de las muestras de control y con 11.2 kHz de US.....	77
--	----

Anexos

Tabla A.1. Modos de vibración, frecuencias naturales y diferencias porcentuales en la célula MCF-7.	90
Tabla A.2. Masa efectiva y porcentaje de masa desplazada en los ejes x, y, z en función de las frecuencias naturales.	91
Tabla B.1. Modos de vibración, frecuencias naturales y diferencias porcentuales en la célula MCF10A.	91
Tabla B.2. Masa efectiva y porcentaje de masa desplazada en los ejes x, y, z en función de las frecuencias naturales.	91
Tabla C.1. Comparación de las frecuencias naturales y la diferencia porcentual entre las células MCF7 y MCF10A.....	92

Nomenclatura

Símbolo	Descripción	Unidades
MEF	Método de elementos finitos.	-----
FA	Filamentos de actina.	-----
FI	Filamento intermedio.	-----
MT	Microtúbulo.	-----
FAs	Filamentos de actinas.	-----
FIIs	Filamentos intermedios.	-----
CA	Corteza de actina	-----
MTs	Microtúbulos.	-----
Adfs	Adhesiones focales	-----
N	Núcleo.	-----
C	Citoplasma.	-----
M	Membrana.	-----
NCM	Núcleo, citoplasma y membrana	-----
F-D	Fuerza deformación	nm
m	Masa	Kg
K	Constante de rigidez del resorte.	n/m
u	Posición	m
$\ddot{u}$	Aceleración	m/s ²
θ_i	Ángulo de fase	Grados
F_0	Fuerza forzada	N
t	Tiempo	s
δ_{est}	Deflexión estática	m
X	Amplitud	m
C	Coefficiente de amortiguamiento	N.s/m
ξ	Relación de amortiguamiento	-----
P_e	Potencia eléctrica	W
A	Área	Cm ²
ρ	Densidad.	kg/m ³
w_n	Frecuencia natural.	Hz
w	Frecuencia forzada.	Hz
E	Módulo de elasticidad	Pa
P	Presión	Pa
P₀	Presión referencial de audición humana	Pa
US	Ultrasonido	-----
HIFU	Ultrasonido focalizado de alta intensidad	-----
I	Intensidad de ultrasonido	W/cm ²
I₀	Intensidad mínima auditiva para el humano	W/cm ²
RM	Resonancia magnética	-----
CTC	Células tumorales circundantes	-----
QA	Queratosis actina	-----
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio	-----

DMSO	Dimetilsulfóxido	-----
Abs	Absorbancia	-----
T	Transmitancia	-----
M	Modelo	-----
D	Diodo	-----
C	Capacitores	-----
R	Resistores	-----
L	Bobina	-----
RPBI	Residuos Peligrosos Biológicos Infecciosos	-----
Ctrl	Cultivos de control	-----
RUS	Cultivos radiados con ultrasonido	-----

Resumen

Según el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), aproximadamente 28 000 nuevos casos de cáncer de mama se reportan anualmente a partir de 2023. Desafortunadamente, las estadísticas revelan que el 60% de estos casos se diagnostican en etapas avanzadas. En 2022, 7 840 mujeres perdieron la vida debido al cáncer de mama. El IMSS también informó que el costo del tratamiento del cáncer de mama varía según la etapa de la enfermedad, oscilando entre \$5,855 y \$11,770 USD por año en promedio. Este costo puede aumentar hasta \$20,600 USD anualmente en sistemas de salud privados. Reconociendo esta carga, numerosas iniciativas de investigación han buscado reducir o erradicar el cáncer de mama en las últimas décadas. Entre estas iniciativas, el ultrasonido ha sido ampliamente estudiado por su potencial para inducir la muerte de células cancerosas. Con el objetivo de avanzar en esta línea de investigación, el presente estudio se centra en identificar las frecuencias naturales que maximicen los desplazamientos en los componentes celulares cancerosos, con el fin de matarlas sin provocar daños significativos en las células sanas, y se complementa mediante una validación experimental *in-vitro* para confirmar estos hallazgos.

En este contexto, se desarrollaron modelos de células de cáncer de mama, MCF-7, y su contraparte homóloga sana, MCF10A. Los modelos se utilizaron para realizar análisis modal y armónico amortiguado mediante el método del elemento finito. El análisis modal demostró diferencias porcentuales significativas en las frecuencias naturales de ambas líneas celulares, con una diferencia del 121% en el modo 1. Esta diferencia se incrementó en promedio un 5% con el incremento del número de modos analizados, lo que indicó una respuesta dinámica distinta entre ambas estructuras.

El análisis armónico permitió identificar las frecuencias que generaron las máximas amplitudes en los componentes de la célula cancerosa. Los parámetros identificados fueron: en primer lugar, 31.27 kHz, que produjo amplitudes de 8.1, 3.9 y 1.87 μm en el núcleo, y de 28, 13.6 y 6.4 μm en la membrana; en segundo lugar, 31.9 kHz, con amplitudes de 6.4, 3.6 y 1.7 μm en el núcleo, y de 22.6, 12.7 y 6.2 μm en la membrana; y en tercer lugar, 30.6 kHz, que generó amplitudes de 6.2, 3.7 y 1.86 μm en el núcleo, y de 21, 12.5 y 6.2 μm en la membrana para relaciones de amortiguamientos del 10, 20 y 30%, respectivamente. Además, el análisis armónico demostró que con una intensidad de ultrasonido de 4.6 W/cm² se pueden generar amplitudes de 14.1 μm en la célula cancerosa.

Para validar los resultados numéricos se desarrolló un circuito electrónico de control de potencia que mantuvo los parámetros de frecuencia e intensidad de una fuente de ultrasonido, igualándolos a los obtenidos en el análisis numérico. Las células estudiadas se cultivaron en un ambiente controlado a 37°C, con 5% de dióxido de carbono y 95% de oxígeno. Posteriormente, las células cancerosas y sanas se radiaron a una frecuencia forzada de 31.27 kHz con una intensidad de 4.6 W/cm² durante 18 minutos, lo que provocó la muerte del 22% de las células

cancerosas y solo del 7% de las células sanas. A las 48 horas, el 20.5% de las células cancerosas continuaron muertas, mientras que solo el 3.7% de las células sanas mostraron el mismo estado; a las 72 horas, el 18.1% de las células cancerosas y el 0.3% de las células sanas continuaban en estado de muerte celular. Una exposición de 35 minutos provocó la muerte del 24% de las células cancerosas y del 9% de las células sanas. Sin embargo, después de 48 horas, solo el 1% de las células sanas y cancerosas mostraron viabilidad, lo que indicó que no se recuperaron tras la exposición al ultrasonido. Por lo tanto, una exposición de 18 minutos resultó adecuada para la radiación de ultrasonido a las células estudiadas, ya que evita daños significativos en las células sanas. Con base en los resultados, se concluye que la interacción asistida por ultrasonido a la frecuencia natural de las células cancerosas las inactiva sin afectar de manera irreparable a la población de células sanas.

Abstract

According to the Mexican Social Security Institute (IMSS), approximately 28,000 new cases of breast cancer are reported annually as of 2023. Unfortunately, statistics reveal that 60% of these cases are diagnosed at advanced stages. In 2022, 7,840 women lost their lives to breast cancer. The IMSS also reported that the cost of breast cancer treatment varies depending on the stage of the disease, ranging from \$5,855 to \$11,770 USD per year on average. This cost can escalate to \$20,600 USD annually in private healthcare systems. Recognizing this burden, numerous research initiatives have aimed to reduce or eradicate breast cancer over the past decades. Among these initiatives, ultrasound has been extensively studied for its potential to induce cancer cell death. With the aim of advancing this line of research, the present study focuses on identifying the natural frequencies that maximize displacements in cancerous cellular components, with the goal of killing them without causing significant damage to healthy cells, and is complemented by an in-vitro experimental validation to confirm these findings.

In this context, models of breast cancer cells, MCF-7, and their healthy homologous counterpart, MCF10A, were developed. The models were used to perform modal and harmonic damped analysis using the finite element method. Modal analysis demonstrated significant percentage differences in the natural frequencies of both cell lines, with a difference of 121% in mode 1. This difference increased by an average of 5% with the increase in the number of modes analyzed, which indicated a different dynamic response between the two structures.

The harmonic analysis made it possible to identify the frequencies that generated the maximum amplitudes in the components of the cancer cell. The parameters identified were: In first place, 31.27 kHz, which produced amplitudes of 8.1, 3.9 and 1.87 μm in the nucleus, and 28, 13.6 and 6.4 μm in the membrane; In second place, 31.9 kHz, with amplitudes of 6.4, 3.6 and 1.7 μm in the nucleus, and 22.6, 12.7 and 6.2 μm in the membrane; and in third place, 30.6 kHz, which generated amplitudes of 6.2, 3.7 and 1.86 μm in the nucleus, and 21, 12.5 and 6.2 μm in the membrane for damping ratios of 10, 20 and 30%, respectively. In addition, the harmonic analysis showed that with an ultrasound intensity of 4.6 W/cm², amplitudes of 14.1 μm can be generated in the cancer cell.

To validate the numerical results, an electronic power control circuit was developed that maintained the frequency and intensity parameters of an ultrasound source, matching them to those obtained in the numerical analysis. The cells studied were cultured in a controlled environment at 37°C, with 5% carbon dioxide and 95% oxygen. Subsequently, the healthy cancer cells were radiated at a forced frequency of 31.27 kHz with an intensity of 4.6 W/cm² for 18 minutes, resulting in the death of 22% of the cancer cells and only 7% of the healthy cells. At 48 hours, 20.5% of the cancer cells remained dead, while only 3.7% of the healthy cells showed the same state; At 72 hours, 18.1% of cancer cells and 0.3% of healthy cells were still in a state of cell death. A 35-minute exposure caused the death of 24% of cancer cells

and 9% of healthy cells. However, after 48 hours, only 1% of the healthy and cancerous cells showed viability, indicating that they did not recover after ultrasound exposure. Therefore, an 18-minute exposure proved adequate for ultrasound radiation to the cells studied, as it prevents significant damage to healthy cells. Based on the results, it is concluded that the ultrasound-assisted interaction at the natural frequency of cancer cells inactivates them without irreparably affecting the population of healthy cells.

Capítulo 1 Introducción

Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2020, el cáncer se consolidó como la principal causa de mortalidad humana. Dicha afirmación generó mayor desafío para la ciencia en vías de incrementar la esperanza vida de las personas a nivel mundial [1-2].

El cáncer es una enfermedad que surge durante la reproducción celular y se debe a que, cuando una célula sana copia incorrectamente un gen se origina una célula anormal, la cual, se reproduce de manera descontrolada [3-6].

Las células anormales pueden afectar cualquier región del cuerpo, siendo el cáncer de mama especialmente prevalente entre las mujeres. En 2020, se registraron 2.26 millones de nuevos casos de cáncer de mama, con 685 000 muertes relacionadas [1]. En respuesta, se han desarrollado tratamientos destinados a dañar selectivamente las células cancerosas sin afectar las células sanas, conocidos como “terapias dirigidas”. En este contexto, el ultrasonido ha emergido como una herramienta prometedora para combatir el cáncer debido a su capacidad para focalizar la energía en áreas específicas, y minimiza el daño a los tejidos circundantes. Esta tecnología utiliza ondas sonoras de alta frecuencia para destruir tumores y reduce su tamaño. Sin embargo, uno de los principales desafíos es determinar las frecuencias óptimas del ultrasonido que maximicen la destrucción de las células cancerosas mientras preservan las células sanas y los tejidos circundantes.

El método del elemento finito se presenta como una herramienta potente para modelar y analizar el comportamiento de las células bajo la influencia de la frecuencia, presión y fuerzas externas generadas por el ultrasonido. Este método permite simular las propiedades mecánicas de las células y predecir sus respuestas a diferentes parámetros de ultrasonido. A través de la implementación de modelos físicos detallados, se puede obtener una comprensión más profunda de los mecanismos de interacción entre el ultrasonido y las células.

La presente investigación se centra en el estudio de las células de cáncer de mama MCF-7 y su contraparte sana MCF10A, mediante un análisis modal y armónico amortiguado, con el empleo del método del elemento finito para identificar las frecuencias naturales que inducen máximos desplazamientos en las células cancerosas y mínimos desplazamientos en las células sanas. Posteriormente, se

llevaron a cabo experimentos *in vitro* para validar los resultados obtenidos con el método del elemento finito.

Esta tesis tiene como objetivo contribuir al desarrollo de tratamientos más efectivos y menos invasivos para el cáncer de mama, al proporcionar una base científica sólida para el uso del ultrasonido como herramienta terapéutica dirigida. A través del análisis mecánico y la validación experimental, se busca avanzar en la comprensión de los mecanismos mediante los cuales el ultrasonido puede emplearse para erradicar selectivamente las células cancerosas.

1.1 Planteamiento del problema

El cáncer es una enfermedad grave y compleja que afecta a millones de personas en todo el mundo. Además, afecta a personas de todas las edades y grupos demográficos [7]. Aunque se han realizado avances significativos en la investigación y el tratamiento del cáncer, sigue siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel global.

Al analizar los diversos tratamientos contra el cáncer, como la cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia y terapia dirigida, se observa una tendencia creciente hacia la implementación de terapias dirigidas. En este contexto, destaca el ultrasonido como una tecnología económica y de amplio uso [8-14].

El uso del ultrasonido en el tratamiento del cáncer tiene como objetivo destruir las células cancerosas sin causar daño significativo a las células sanas. Para alcanzar este objetivo es fundamental determinar el parámetro de frecuencia del ultrasonido que genere grandes amplitudes en las estructuras celulares cancerosas. Identificar esta frecuencia representa un desafío debido a las variaciones en los resultados derivados de las diferentes propuestas de modelos físicos de las células basados en el método del elemento finito.

Hasta el momento, investigadores han desarrollado dos modelos principales con el método del elemento finito para determinar las frecuencias naturales de las células cancerosas y emplearlas como frecuencias de la fuente de ultrasonido. Un modelo considera el núcleo, el citoplasma y la membrana [15-16], mientras que el otro incluye el núcleo, el citoplasma y la pared de actina [17]. Además, existen modelos más completos que incorporan los elementos del citoesqueleto junto con el núcleo, el citoplasma y la membrana. Sin embargo, este último modelo aún no se ha implementado para encontrar las frecuencias naturales de las células. Cabe destacar que estos modelos más recientes se aplican específicamente a células adhesivas y planas [18-20].

Con base en los últimos modelos mencionados y en la geometría celular del cáncer, surgen varias preguntas de investigación:

1. ¿Es posible incorporar los elementos del citoesqueleto en los modelos de células cancerosas?

2. ¿Los elementos del citoesqueleto aumentan significativamente las frecuencias naturales de las células?
3. ¿Se producirán desplazamientos significativos en los elementos celulares con la inclusión de relación de amortiguamiento en las células?
4. ¿Qué efectos se pueden observar en los resultados del método del elemento finito al considerar la presión externa generada por el ultrasonido?
5. ¿Es posible validar los resultados del método del elemento finito a través de experimentos *in vitro*?

Estas preguntas se abordan al modelar las células de cáncer de mama MCF-7 y su contraparte sana MCF10A. La elección del cáncer de mama se basa en la idea de que, si los resultados son favorables, será más factible replicarlos en futuros estudios *in-vivo*. Esto se debe a la delgada capa de tejido que separa la epidermis del tumor mamario, lo cual facilita el acceso de ultrasonido a las células cancerosas.

1.2 Justificación

El cáncer es la segunda causa de muerte humana a nivel mundial. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, en 2015, el cáncer provocó 8.8 millones de defunciones. Se identifican cinco tipos de cáncer con el mayor índice de fallecimientos: cáncer pulmonar, cáncer hepático, cáncer colorrectal, cáncer gástrico y de mama [21, 22].

El cáncer más común en la población mundial de mujeres es el cáncer de mama: representa el 16 % de los tumores malignos diagnosticados y se observa una tendencia al alza en la incidencia y tasa de mortalidad. En México, en el año 2016, se presentaron 16 defunciones por cada 100 000 mujeres de 20 años, o más. Dicho lo anterior, el cáncer de mama se ubica como la segunda causa de muerte en mujeres mayores de 35 años [22]. Por cierto, existen evidencias de que algunos hombres también son afectados mortalmente por este mal. Este tipo de cáncer es provocado por tres tipos de células cancerosas: las MCF-7, MDA-MB-231 y BT-549. De los tres tipos de células cancerosas mencionadas, la más común en mujeres mexicanas es la MCF-7; cabe mencionar que es maligna. Y precisamente este tipo de células se estudiaron en la presente investigación junto con su homóloga célula sana, a la cual se le asigna el siguiente acrónimo: MCF10A.

Desde una perspectiva social, el cáncer de mama no sólo es una enfermedad que contribuye a la mortalidad y la discapacidad, sino que integra una importante carga económica tanto pública como privada. De acuerdo con el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), el costo anual de tratamiento en una institución pública varía entre 100 000 y 200 000 pesos, en promedio. Tan sólo para llegar a un diagnóstico, un ultrasonido mamario cuesta 3 500 pesos aproximadamente, una biopsia desde los 3 500 hasta los 15 000 pesos, y una mastografía alrededor de los 2 000 pesos [23].

Derivado de la importancia del cáncer mencionado existe gran cantidad de estudios relacionados con esta enfermedad: se han encontrado múltiples formas de tratarlo y en algunos casos, erradicarlo. Algunas de las metodologías destacadas para enfrentar este mal consisten en: la quimioterapia, la extirpación y el uso de fármacos. Sin embargo, estos tratamientos no se focalizan en las células cancerosas, lo que deriva en diferentes efectos secundarios que dañan a las células sanas del cuerpo y lo debilitan. Se disminuye así las probabilidades de éxito en los tratamientos.

Los tratamientos actuales para el cáncer buscan la focalización hacia las células malignas, algunos de estos tratamientos son los sistemas de administración de fármaco, inmunoterapias, tratamientos asistidos por campos magnéticos y tratamientos asistidos por ultrasonido. Los tratamientos antes mencionados se conocen como: “dirigidos”. Estos tratamientos “dirigidos” han presentado mejores resultados respecto a los que dañan tanto células de cáncer como sanas. El desarrollo de un tratamiento “dirigido” es el objeto de la presente investigación: se busca inactivar las células cancerosas de manera focalizada sin dañar los tejidos sanos circundantes.

1.3 Hipótesis

La interacción asistida por ultrasonido a la frecuencia natural de las células cancerosas las inactiva, sin afectar en forma irreparable a la población de las células sanas.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Inactivar las células de cáncer (MCF-7) mediante la aplicación de vibraciones mecánicas generadas por ultrasonido de alta intensidad, sin afectar significativamente a las células sanas (MCF10A).

1.4.2 Objetivos específicos

- Desarrollar los fundamentos teóricos para describir las interacciones entre núcleo, citoplasma, membrana, citoesqueleto y las propiedades mecánicas de las células MCF10A y MCF-7.
- Desarrollar un modelo físico de las principales estructuras subcelulares que contribuyen al funcionamiento y confieren la rigidez a las células de estudio.
- Realizar simulaciones de análisis modal con el método de elementos finitos para encontrar los primeros modos de vibración de las células MCF10A y MCF-7.
- Realizar simulaciones de análisis armónico con el método de elemento finito e incorporando la presión generada por el ultrasonido en las células MCF10A

- y MCF-7 para encontrar la frecuencia natural que genera máximas amplitudes en las células.
- Diseñar el modelo experimental *in vitro* para radiar a las células MCF10A y MCF-7 con ultrasonido de alta intensidad.
- Realizar pruebas de resonancia con ultrasonido en cultivo celular de cáncer.

1.5 Alcances

- Desarrollo de análisis dinámico, modal y armónico, de las células MCF-7 y MCF10A con el método de elemento finito en el software LS DYNA ANSYS para identificar las frecuencias naturales que generan las máximas amplitudes en ambas células estudiadas.
- Desarrollo de experimentos *in vitro* en cultivos celulares de las células MCF-7 y MCF10A, donde sean sometidos a vibraciones mecánicas asistidas por ultrasonido. Con el objetivo de examinar y confirmar el efecto de aplicar a las células estudiadas frecuencias forzadas iguales a las frecuencias naturales de las células cancerosas que generan los máximos desplazamientos determinadas mediante el método del elemento finito.

1.6 Limitaciones

- La etapa de experimentación de esta investigación se realizó *in vitro*, lo cual podría implicar un comportamiento distinto al tejido *in vivo*.
- Se estudió una sola línea celular de cáncer, lo cual implicaría desconocimiento en la naturaleza y reacción de las otras líneas celulares.

1.7 Organización de la tesis

El Capítulo 2 analiza el estado del arte, con énfasis en los elementos subcelulares que incrementan la rigidez celular. Además, se discuten diversos modelos celulares mediante el método de elementos finitos y se presentan estudios experimentales con tumores cancerígenos donde se emplea ultrasonido. El Capítulo 3 describe la metodología utilizada en el análisis numérico y experimental *in vitro*. En el Capítulo 4, se muestra la implementación de la metodología del análisis numérico y se discuten los resultados obtenidos. El Capítulo 5 explica la implementación de la metodología experimental, que abarca el desarrollo de un circuito de control de potencia del ultrasonido, el cultivo celular y los resultados en términos de muerte celular. Finalmente, el Capítulo 6 presenta las conclusiones generales y propone trabajos futuros para dar continuidad a la investigación.

Capítulo 2 Estado del arte

En esta sección, se presenta un análisis detallado sobre la célula y sus unidades estructurales. Se destacan aquellas unidades esenciales para la rigidez y estabilidad celular.

A continuación, se exploran los modelos de células desarrollados mediante el método de elementos finitos (MEF), enfocados en la determinación de las frecuencias naturales de estas estructuras. También se discuten los modelos de tensegredad, tensegredad híbrida y bendo-tensegredad aplicados al estudio celular. Finalmente, se revisan estudios recientes que han utilizado ultrasonido de alta intensidad en pacientes con cáncer y se analizan los fenómenos inducidos por ultrasonidos en tejidos biológicos para destacar sus implicaciones en la investigación médica y biotecnológica.

2.1 La célula y los elementos celulares que confieren rigidez estructural

La célula, definida como una unidad microscópica compuesta de citoplasma, núcleos, y una membrana que la rodea, es capaz de realizar todas las funciones vitales y constituye la menor porción de materia viva [24, 25]. En las últimas décadas, se ha avanzado significativamente en el desarrollo de técnicas experimentales y enfoques computacionales para estudiar las respuestas celulares a diversos estímulos mecánicos. Sin embargo, comparar las mediciones experimentales de células vivas presenta desafíos importantes debido a la variabilidad estructural entre los diferentes tipos celulares y las geometrías celulares irregulares, como se aprecia en la Figura 2.1a, que muestra una célula con morfología esférica, y en la Figura 2.1b, donde se observa una célula de cáncer de cuello uterino con una geometría semielipsoidal.

Estas diferencias morfológicas, junto con las complejas propiedades mecánicas de las células, complican la interpretación y comparación de los resultados experimentales. A pesar de estas dificultades, los modelos computacionales que simulan las respuestas celulares a diferentes estímulos mecánicos han demostrado ser herramientas valiosas para investigar la mecánica celular, lo que ha permitido una mejor comprensión de cómo estas estructuras responden a las fuerzas aplicadas en su entorno.

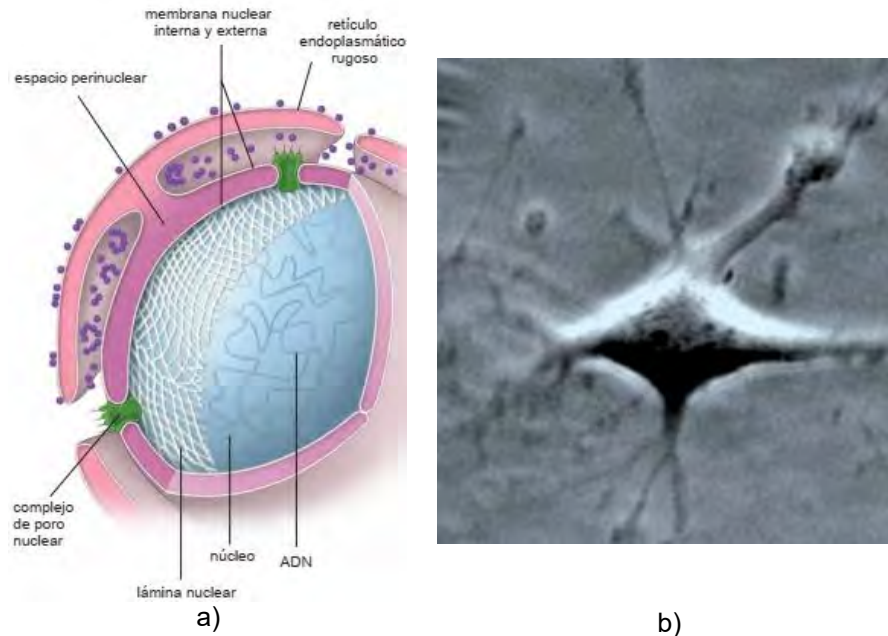


Figura 2.1. Estructura de células de: a) cáncer de mama MCF-7 [1] y b) cáncer cuello uterino [26].

Entre todos los componentes celulares, algunos destacan en el estudio de la mecánica celular debido a su influencia dominante en el comportamiento mecánico de la célula. Estos elementos clave incluyen la membrana, el citoplasma, el núcleo, las adhesiones focales (Adfs), el citoesqueleto y la matriz extracelular. La composición y función de estos componentes se resumen en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Principales componentes celulares y sus funciones [24, 25].

Componentes celulares	Composición	Funciones
Membrana celular	Bicapa lipídica delgada con un grosor de 5-10 nm.	Protege el interior de la célula del entorno extracelular y permite la transmisión de señales químicos.
Citoplasma	Complejos de proteínas y orgánulos.	Controla la fluidez y elasticidad de las células.
Núcleo	ADN y proteínas encerrados por la envoltura nuclear de bicapa lipídica.	Controla qué genes se activan y participa en cómo la célula responde a las fuerzas físicas.
Citoesqueleto	Red dinámica de filamentos que interactúan con diversas proteínas de enlace cruzado.	Resiste, transmite y genera fuerzas celulares.
Matriz extracelular (ECM)	Red de macromoléculas con propiedades físicas, bioquímicas y biomecánicas distintivas.	Componente externo a la célula. Proporciona adhesión y soporte a la célula. Además, contribuye al crecimiento celular y a los procesos de cicatrización.
Adhesiones focales	Grandes complejos de proteínas formados por la unión de integrinas.	Acoplan y transmiten fuerzas entre la ECM y el citoesqueleto.

Uno de los componentes más cruciales es el citoesqueleto: compleja red de filamentos entrecruzados que se extienden desde el núcleo hasta la superficie celular. Esta estructura es fundamental para la rigidez estructural de la célula y su interacción mecánica con el entorno extracelular. A diferencia de una estructura estática, el citoesqueleto es dinámico y constantemente experimenta procesos de ensamblaje y desensamblaje de sus componentes, lo que permite a la célula moverse, contraerse, dividirse o fusionarse. Por tanto, el citoesqueleto actúa como un sensor mecánico crucial, responsable de mantener la integridad estructural y la rigidez celular [24, 25, 27].

El citoesqueleto está compuesto por varias estructuras clave que colaboran para preservar la forma y estabilidad de la célula. Entre estos componentes se encuentran los microtúbulos (MTs), los filamentos de actina (FAs) y los filamentos intermedios (FIs). Los MTs, formados por dímeros de tubulina, poseen la capacidad de elongarse y acortarse continuamente, un fenómeno conocido como inestabilidad dinámica. Esta propiedad permite a los MTs adaptarse rápidamente a las necesidades celulares, como se muestra en la Figura 2.2a, donde se presenta su representación física, y en la Figura 2.2b, que muestra su distribución real en la célula. Por otro lado, los FAs son cadenas flexibles de moléculas de actina, visibles en la Figura 2.2c, que representa su estructura física, y en la Figura 2.2d, que ilustra su distribución en verde dentro de una célula. Los FIs, que son fibras similares a cuerdas compuestas por diversas proteínas, se presentan en la Figura 2.2e, que muestra su representación física, y en la Figura 2.2f, donde se observa su distribución en rojo dentro de la célula. Los FAs contribuyen a soportar la tensión, mientras que los FIs proporcionan resistencia a las fuerzas de corte para garantizar así la estabilidad y funcionalidad celular.

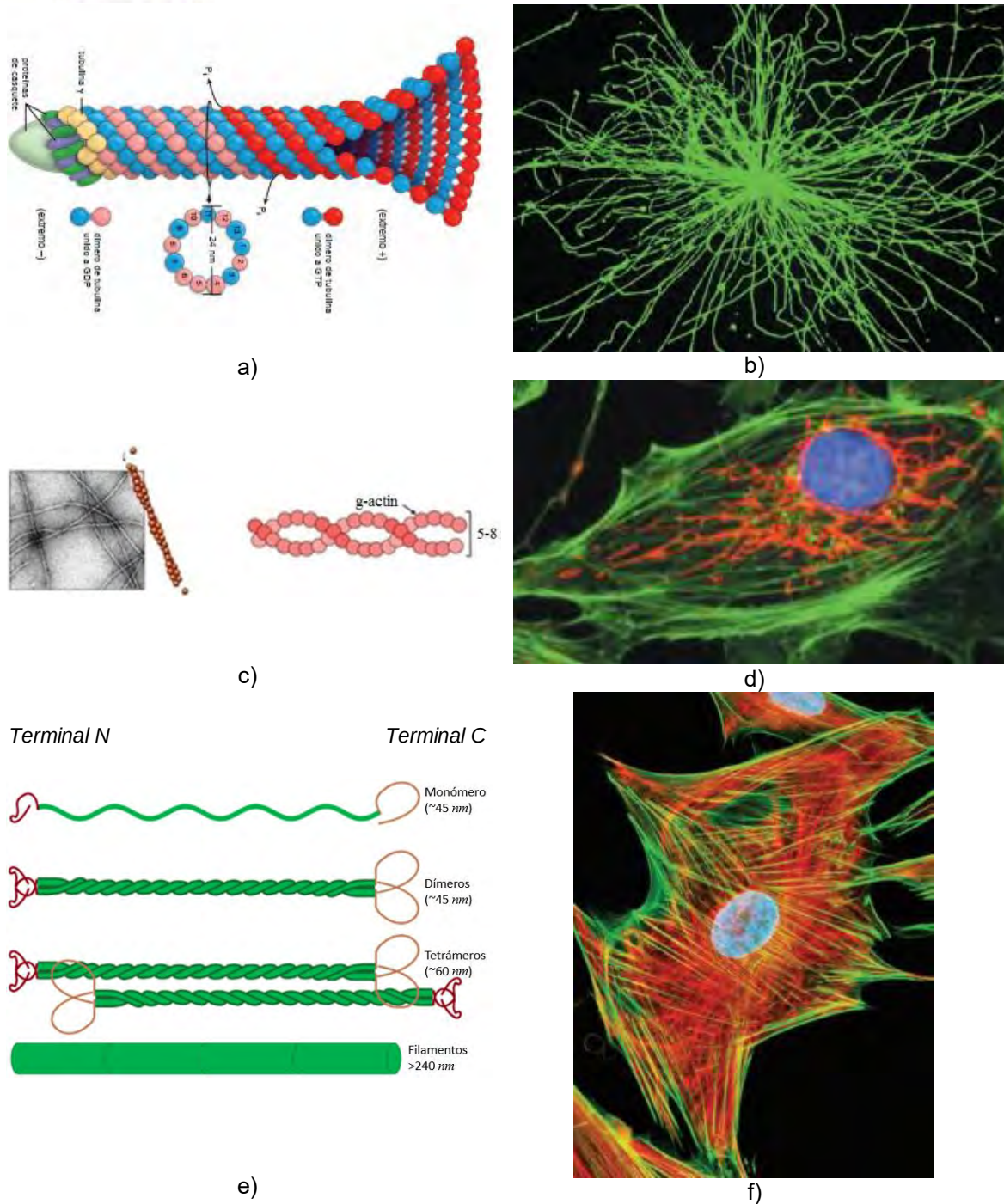


Figura 2.2. Representación física y real de los componentes del citoesqueleto: a), c) y e) muestran las representaciones físicas de los MTs, FAs y FIs, respectivamente; mientras que b), d) y f) ilustran estos componentes en su distribución real dentro de una célula. Obtenidos de [24 y 28].

Además, los componentes del citoesqueleto están vinculados físicamente, lo que facilita la transmisión de señales mecánicas entre ellos. Aunque poseen características únicas, todos estos elementos colaboran para mantener la integridad estructural de la célula, permitiéndole conservar una forma específica y cumplir con

su función biológica. Las propiedades distintivas de los filamentos del citoesqueleto se detallan en la Tabla 2.2, mientras que las propiedades del núcleo, citoplasma y membrana se presentan en la Tabla 2.3. Es importante destacar que el citoesqueleto está también vinculado con el núcleo, el citoplasma y la membrana celular, como se observa en la Figura 2.3 [29].

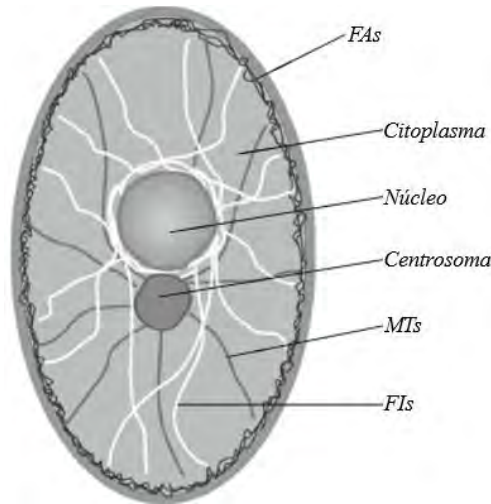


Figura 2.3. Estructura celular que ilustra la vinculación física entre el citoesqueleto, el núcleo, el citoplasma y la membrana celular. Modificada de [29].

Tabla 2.2. Propiedades mecánicas de los componentes del citoesqueleto.

Elementos	Módulo de Elasticidad (Mpa)	Relación de Poisson [30-32]	Densidad Kg/m ³
Microtúbulos	1 200 [18, 19, 20]	0.3	1 470 [30]
Filamentos de actina	2 200 [19, 20], 2 600 [20]	0.3	1 150 [17]
Filamentos intermedios	2 000 [20], 7 600 [31]	0.3	1 400

Tabla 2.3. Propiedades mecánicas del núcleo, citoplasma y membrana celular.

Elementos de la Célula	Parámetros	MCF-7	MCF10A
Núcleo	Densidad (kg/m ³)	1 300 [16, 17, 31]	1 300 [16, 17, 31]
	Módulo de elasticidad (KPa)	2.1 [25], 4.7 [17] 87.3 o 30.2 [32]	7 [17]
	Relación de Poisson	0.49 [16, 33]	0.49 [17, 32]
Membrana	Densidad (kg/m ³)	1 500 [16, 17, 33]	1 500 [16, 17, 33]
	Módulo de elasticidad (KPa)	1.125 [16, 17]	1.1 [16, 17, 31]
	Relación de Poisson	0.49 [16, 17]	0.49 [16, 17, 31]
Citoplasma	Densidad (kg/m ³)	1 050 [16, 32]	1 050 [16, 32]
	Módulo de elasticidad (KPa)	0.47 [17]	0.7 [17]
	Relación de Poisson	0.49 [16, 17]	0.49 [16, 17]

2.2 Modelados de células mediante MEF para determinar frecuencias naturales

Para identificar las frecuencias naturales de las células, se han desarrollado diversos estudios con el MEF, tanto para células sanas como cancerosas. Jaganathan *et al.* [33] llevaron a cabo una simulación de células MCF10A y MCF-7, además de células de cáncer de próstata BPH y células sanas LNCap, y las modelaron como cuerpos esféricos sin elementos subcelulares. En su investigación determinaron frecuencias naturales de 6.2 Hz para MCF10A y 4.8 Hz para MCF-7. En el caso del cáncer de próstata, las frecuencias fueron de 11.5 Hz para BPH y 8.7 Hz para LNCap. Los autores concluyeron que la transformación de células sanas en cancerosas conlleva una disminución en su rigidez, lo que se refleja en una reducción de sus frecuencias naturales.

En un estudio posterior, Geltmeier *et al.* [17] utilizaron el MEF para calcular la primera frecuencia natural de las células de cáncer de mama MCF-7 y compararla con la de las células normales MCF10A. El modelo empleado consideró el núcleo, el citoplasma y una capa de actina. Los resultados obtenidos indicaron frecuencias de 21 kHz para las células MCF-7 y 34 kHz para las células MCF10A. Para validar estos hallazgos, utilizaron un equipo de ultrasonido que sometió a ambas líneas celulares en suspensión, es decir, células flotantes en el medio de cultivo, a diferentes frecuencias e intensidades. Se observó que, una exposición a 24.5 kHz con una intensidad de 1.65 W/cm² indujo la muerte total de las células MCF-7, como se ilustra en la Figura 2.4a. En la Figura 2.4b se ilustra una disminución en la viabilidad de las células MCF10A, aunque no todas murieron. Esta misma combinación de frecuencia e intensidad también resultó letal para las células MDA-MB-231, otra línea celular de cáncer. En contraste, frecuencias superiores a 29 kHz causaron daño en las células MCF10A. La variación en la respuesta de las células a frecuencias externas de 24.5 y 29 kHz se atribuyó a la proximidad de 24.5 kHz a la frecuencia natural de las células cancerosas y a la diferencia de 5 kHz respecto a la frecuencia natural de las células sanas. Además, los autores explicaron que las diferencias en las frecuencias naturales se deben a variaciones en la rigidez y tamaño celular.

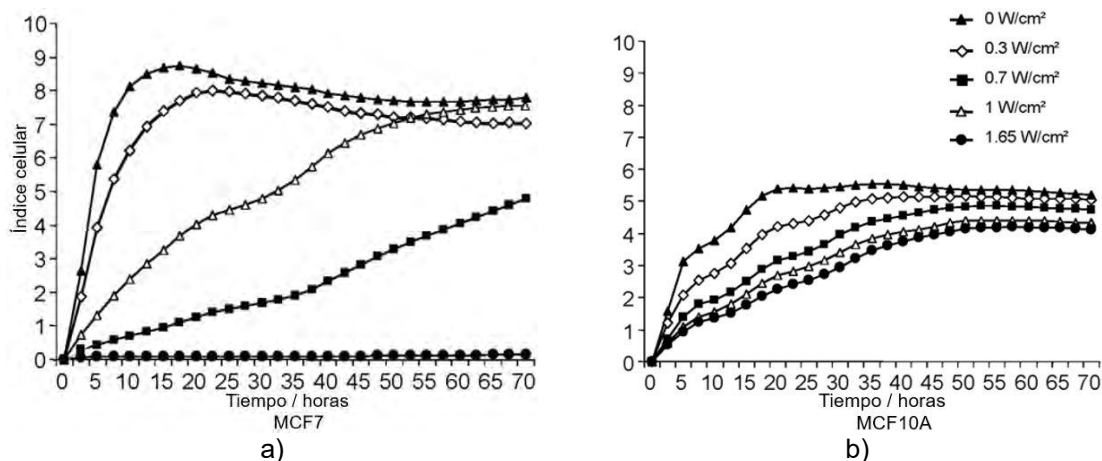


Figura 2.4. Disminución de la supervivencia de las células MCF7 después de la radiación a 24.5 [17].

En un trabajo similar, Heyden y Ortiz [15] exploraron dos tipos de células, una sana y otra con carcinoma. Estos investigadores utilizaron un modelo de MEF que incluyó no solo el citoplasma y la membrana, sino también el núcleo y el nucleolo. A través de un análisis modal, determinaron las frecuencias naturales de 79.8 kHz para las células cancerosas y 42.8 kHz para las células sanas. Estos resultados fueron validados mediante la simulación de una respuesta armónica transitoria que demostró que las células cancerosas pueden ser dañadas al ser excitadas a su frecuencia natural. En la Figura 2.5 se ilustra la respuesta transitoria de una célula cancerosa (arriba) y una célula sana (abajo) cuando fueron sometidas a una excitación de ultrasonido a 80 kHz, a los 71.37 μ s se observó la ruptura de la membrana nuclear en las células cancerosas, mientras, que las células sanas permanecieron intactas. Estos resultados destacan la viabilidad de utilizar excitaciones armónicas precisas para atacar selectivamente las células cancerosas.

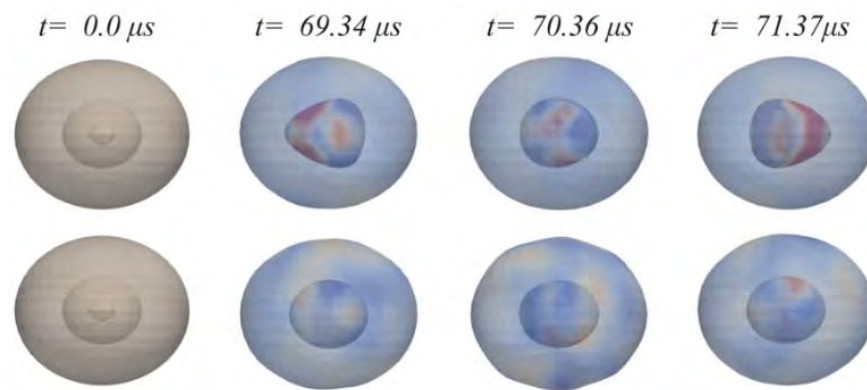


Figura 2.5. Respuesta transitoria de una célula cancerosa (arriba) y una célula sana (abajo) en resonancia [15].

Finalmente, en otra investigación, Ahmed *et al.* [16] desarrollaron dos modelos celulares utilizando MEF: un modelo homogéneo (M1) que considera la célula como una esfera única, ilustrada en la Figura 2.6a, y un modelo no homogéneo (M2) que incluye núcleo, citoplasma y membrana, como se observa en la Figura 2.6b. En los resultados de las simulaciones de células MCF10A y MCF-7 encontraron que las frecuencias naturales en el modelo homogéneo fueron mayores en comparación con el modelo no homogéneo, que toma en cuenta las propiedades mecánicas de las subestructuras celulares. Los primeros cuatro modos de vibración, presentados en la Tabla 2.4, muestran que las células sanas tienen frecuencias naturales más altas que las células cancerosas, lo que confirma que las células pierden rigidez al volverse malignas, como lo señalan los autores [15, 16, 17, 33].

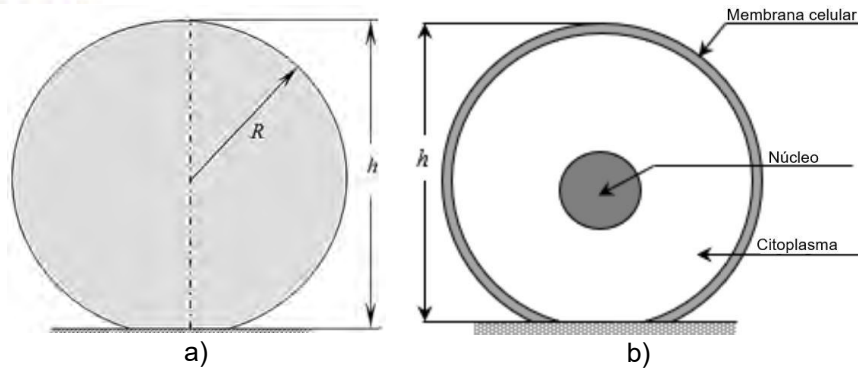


Figura 2.6. Modelos de células: a) modelo homogéneo y b) modelo no homogéneo. De [16].

Tabla 2.4. Frecuencias naturales de célula MCF-7 y MCF0A [16].

Modos	w_n (kHz)			
	MCF-7		CMF10A	
	M1	M2	M1	M2
1	9.61	5.76	22.94	14.24
2	9.65	5.79	22.99	14.28
3	12.85	8.71	30.56	21.04
4	16.46	9.40	36.47	21.79

2.3. Modelos de MEF con tenseguridad, tenseguridad híbrida y bendo-tenseguridad

Otro enfoque desarrollado en paralelo a los trabajos de [15, 16, 17, 33] en el análisis celular mediante MEF es el uso del método de tenseguridad, que combina los principios de "tensión" e "integridad" [34]. Este concepto se refiere a estructuras que integran componentes sometidos tanto a tensión como a compresión [35, 36]. En los primeros trabajos del modelo de tenseguridad celular [37, 38], el citoesqueleto se compone de MTs y FAs, tal como se ilustra en la Figura 2.7 en a y b, ambos componentes en una aproximación de 1D. Estos elementos forman una red interconectada, donde los FAs actúan como cables bajo tensión y los MTs como vigas en compresión. En este sistema, los puntos de intersección entre FAs y MTs corresponden a las Adfs, visualizadas en verde en las Figura 2.7b, las cuales, tienen contacto directo con la membrana celular. La Figura 2.7c representa una célula real adherida a la matriz extracelular (en gris), donde los FAs están representados por líneas negras, los MTs por líneas rojas que irradian desde el núcleo (en gris) hacia la periferia de la célula, y las Adfs por puntos negros. Esta Figura 2.7c muestra cómo estos elementos se organizan en una célula real para mantener su integridad estructural.

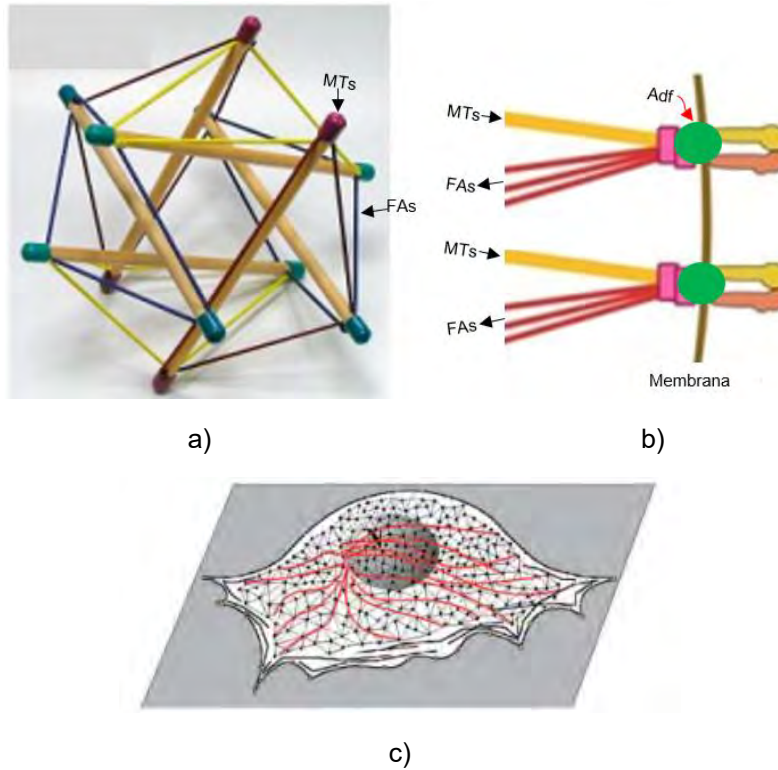


Figura 2.7. Representación esquemática de la tensegridad celular: a) red con seis vigas en compresión conectadas por cables tensados, b) equilibrio estructural entre FAs tensados, MTs en compresión, y puntos de adhesión focal y c) célula adherida a la matriz extracelular en gris, con núcleo central y MTs radiales en rojo contrarrestando fuerzas hacia adentro [38].

En un esfuerzo por avanzar en la modelización celular mediante el enfoque de tensegridad, un equipo de la Universidad Tecnológica de Brno desarrolló un modelo que incorpora el núcleo, nucléolo y centrosoma dentro de la estructura celular [39]. En este trabajo, ilustrado en la Figura 2.8, los FAs, representados en color azul, se organizan en una geometría de icosidodecaedro, una estructura tridimensional que presenta 30 vértices y 60 aristas. Los MTs, visualizados en color rojo, conectan el núcleo con las Adfs, y añadieron los FIs en su modelo, representados en morado, los cuales se extienden desde la superficie nuclear hasta las Adfs. Estos componentes emularon una red compleja y altamente organizada que refleja la dinámica interna de la célula.

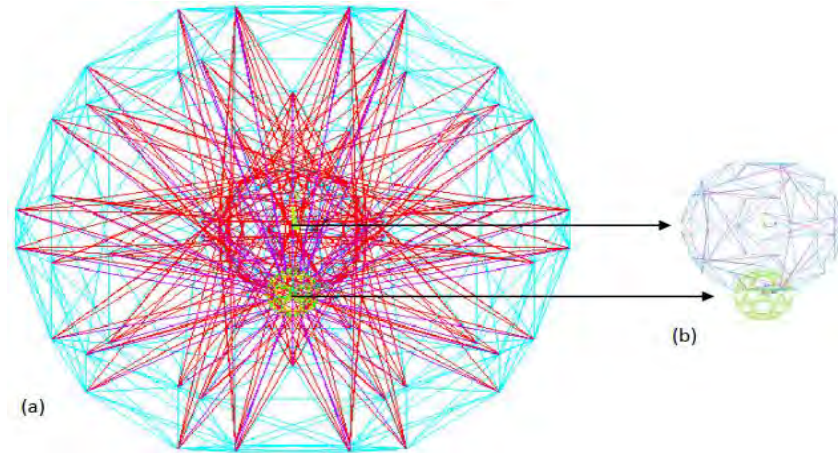


Figura 2.8. Aplicación de tensegridad en células: a) Principio de tensegridad basado en un modelo computacional del citoesqueleto de una célula de músculo liso y b) Núcleo (azul con rojo) y centrosoma (verde) [39].

Históricamente, los modelos de tensegridad [35-39] en los análisis por MEF no consideraron componentes esenciales como el núcleo, citoplasma y membrana celular. Para superar estas limitaciones, McGarry *et al.* [40] propusieron un modelo que denominaron "tensegridad híbrida". En este enfoque, ilustrado en la Figura 2.9, integra los componentes tradicionales como los MTs y FAs, junto con el citoplasma (no visible), el núcleo (en verde) y la membrana celular (en azul suave), todos modelados en 3D. Este modelo demostró que el citoesqueleto desempeña un papel fundamental en la determinación de la rigidez celular bajo la aplicación de fuerzas en los límites de la célula, y captura de manera precisa el comportamiento estructural, incluida la rigidez inducida por el esfuerzo a lo largo de su superficie.

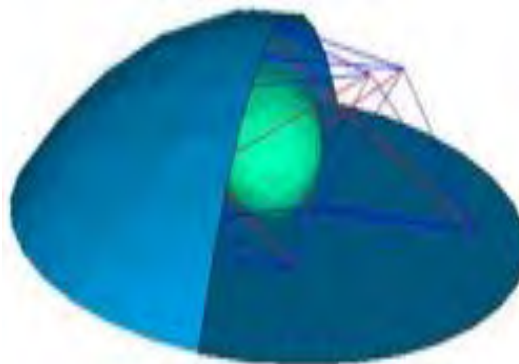


Figura 2.9. Modelo de células adherentes: Representación de MTs (rojo) y FAs (azul), con elementos en 3D que incluyen el núcleo (verde), citoplasma y membrana celular (azul claro) [40].

Posterior al desarrollo del modelo de tensegridad híbrida, Bursa *et al.* [41, 42] propusieron un modelo celular avanzado que consta de 210 elementos, como se ilustra en las Figura 2.10 en a y b. Este modelo incorpora FIs visibles en color verde en la Figura 2.10b, los cuales, se posicionaron de manera radial alrededor del

núcleo y están anclados en las Adfs. Los investigadores validaron sus resultados mediante pruebas de tensión e indentación mediante el uso de MEF y compararon estos resultados con mediciones obtenidas a través de microscopía de fuerza atómica (AFM). La validación demostró una concordancia significativa entre los resultados del MEF y los experimentales, con diferencias porcentuales de solo un 3%, de esta manera se destacó la precisión y robustez del modelo propuesto.

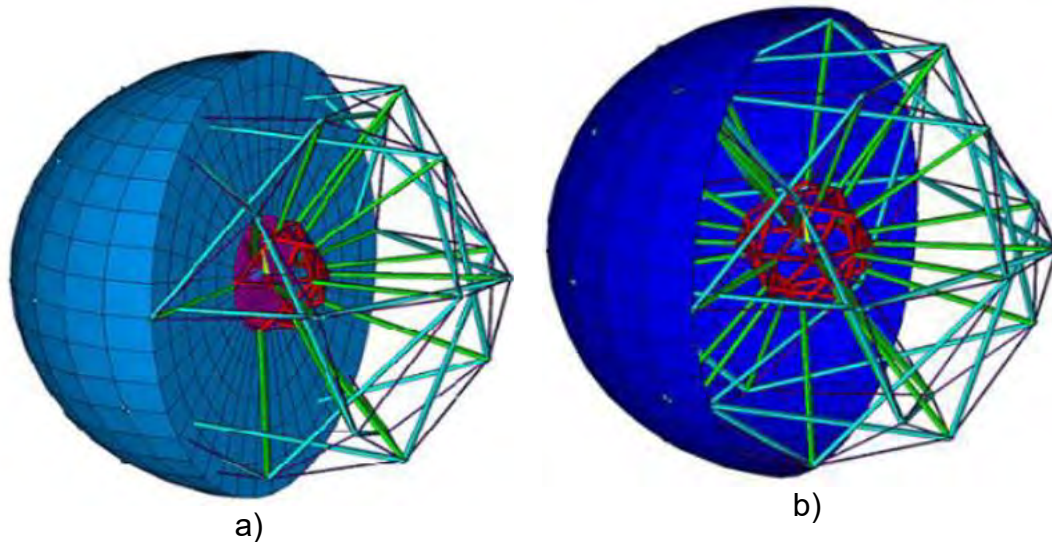


Figura 2.10. Modelos de tensegridad celular: a) representación de elementos en 3D que corresponden al núcleo (violeta) y citoplasma (azul), y b) representación en 1D del citoesqueleto, donde los FAs (morado), MTs (azul claro) y FIs (verde) se conectan al núcleo (rojo) y a la membrana celular (azul oscuro) [41, 42].

En un estudio relacionado, Barreto *et al.* [43] desarrollaron un modelo para células adherentes con el objetivo de investigar las diferencias biofísicas y bioquímicas en el papel mecánico de los componentes individuales del citoesqueleto bajo carga. Este modelo utilizó una geometría semi-elipsoidal para la célula e incorporó FAs y MTs dentro del citoplasma, como se muestra en la Figura 2.11. Además, se añadió una corteza de actina (CA) (en color rojo) en la superficie externa de la célula, ilustrada en la Figura 2.12. El modelo demostró que los MTs, junto con la CA, son fundamentales para mantener la rigidez celular durante la indentación en este tipo de células. Aunque el modelo es avanzado, no puede predecir con precisión el papel del núcleo en la transmisión de fuerzas, debido a que no consideró la estructura de los IFs que conectan la CA con el núcleo.

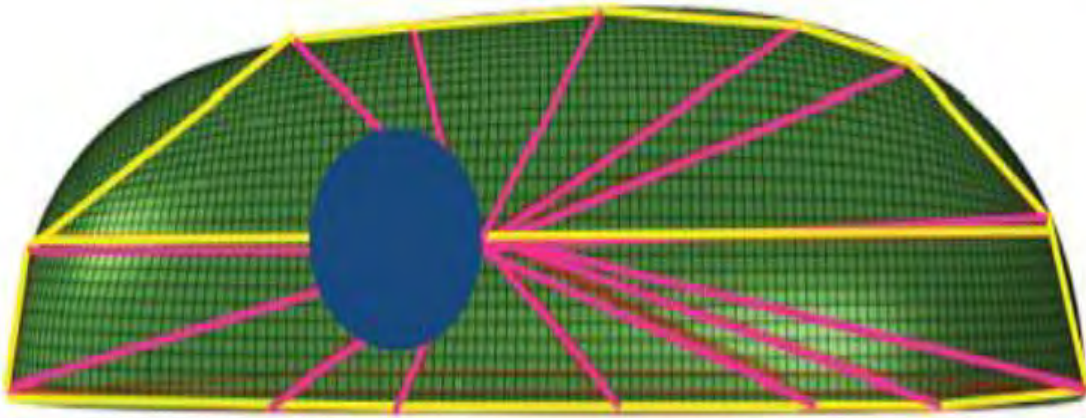


Figura 2.11. Modelo de células adherentes, que incluye FAs en amarillo, MTs en rosa, componentes tridimensionales del núcleo en azul, citoplasma (no visible) y membrana celular en verde [43].

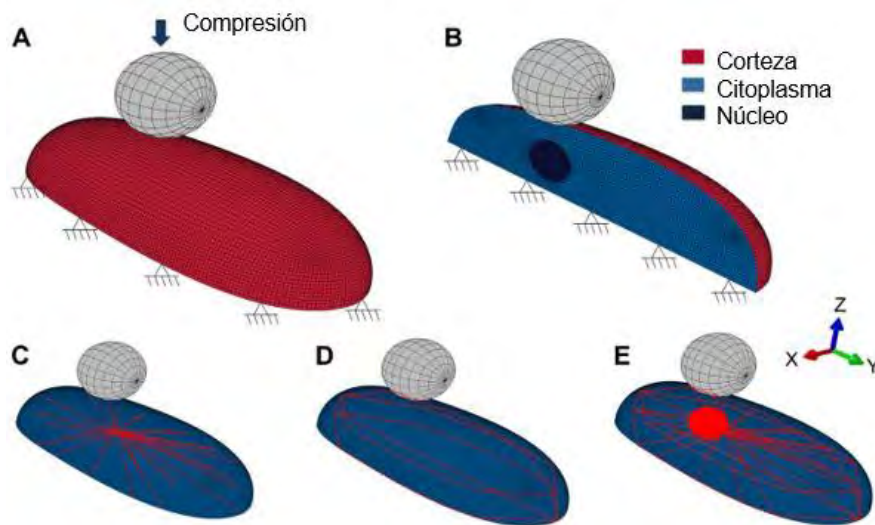


Figura 2.12. Representación detallada del modelo celular: a) condiciones de frontera y simulación del movimiento por compresión, b) sección transversal de la célula donde muestra los componentes tridimensionales, c) distribución de MTs, d) distribución de FAs y e) Interacción entre FAs y MTs, y su relación con el núcleo [43].

En investigaciones recientes sobre tensegridad híbrida, Mohammad *et al.* [19] desarrollaron un modelo para evaluar la contribución mecánica de los componentes celulares. En su estudio, representaron el citoplasma, la membrana y el núcleo en tres dimensiones, mientras que el citoesqueleto y el esqueleto nuclear se modelaron con principios de tensegridad, como se ilustra en la Figura 2.13. En simulaciones con Abaqus, aplicaron cargas para analizar la contribución mecánica de cada componente celular y validaron sus resultados mediante experimentos de microscopía de fuerza atómica. Durante la aplicación de cargas a una célula, evaluaron las fuerzas de reacción y encontraron que el citoesqueleto soportaba aproximadamente el 90% de la fuerza de reacción, el citoplasma el 9%, y las partes de la membrana y el esqueleto nuclear, alrededor del 1%.

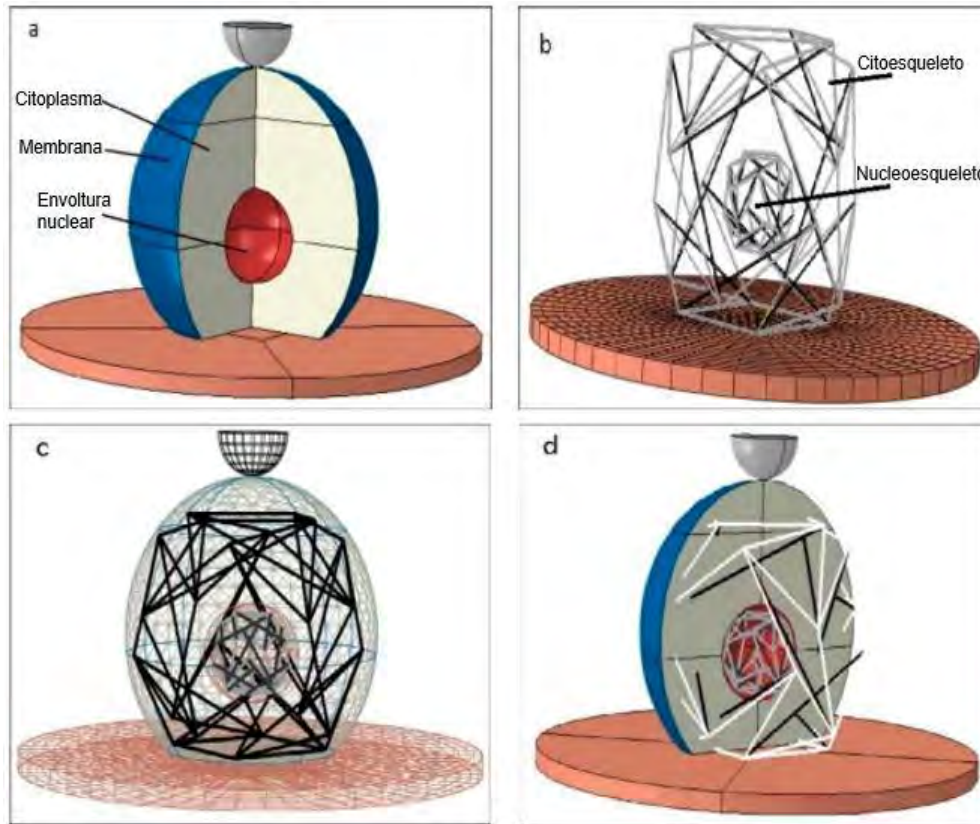


Figura 2.13. Geometría del modelo celular: a) citoplasma, membrana y el núcleo como componentes 3D, b) tensegridad del citoesqueleto y esqueleto nuclear, c) mallado del modelo celular y d) vista de corte del modelo [19].

A pesar de que los resultados obtenidos mediante el MEF en los trabajos [34-43] proporcionan una buena correlación con los estudios experimentales, los MTs no se representaron en su configuración real, como se observa en las Figura 2.1 y Figura 2.2 de este capítulo. Estos presentan una curvatura característica: están sujetos a una tensión constante y forman nodos en las Adfs junto con los FAs y los FIs. En respuesta a estos hallazgos, los modelos más recientes de análisis estructural celular han incorporado una representación de los microtúbulos con curvatura, los cuales, crecen cerca del núcleo en un punto denominado centrosoma. A este enfoque se le llamó bendo-tensegridad, y ha sido adoptado en estudios recientes para ofrecer una perspectiva más precisa sobre la estructura celular.

El primer trabajo de bendo-tensegridad fue realizado por Bansod *et al.* [18], quienes desarrollaron dos modelos distintos: uno para células suspendidas en un medio y otro para células adherentes. En el modelo de la célula suspendida, la geometría se asemeja a un icosidodecaedro con 30 vértices, que representan las Adfs como se ilustra en la Figura 2.14 en a y c. En lo que respecta al modelo de célula adherente, se utilizó una geometría elipsoidal, como se muestra en la Figura 2.14b y d. En ambos modelos los FAs se modelan como aristas de esta estructura y forman una red semiesférica, mientras que los FIs se extienden desde el núcleo hasta los

vértices del icosidodecaedro. Los MTs se originan en un punto denominado centrosoma y se dispersan hacia la membrana. El núcleo y el citoplasma se modelaron en tres dimensiones (Figura 2.14a y c), mientras que los elementos del citoesqueleto se representaron en una dimensión. La curva de fuerza-deformación obtenida de la simulación de la prueba de tracción se ajustó al rango de características obtenidas experimentalmente y se mostró un incremento no lineal en la fuerza de reacción con el estiramiento celular. Los autores también reportaron que las FAs, los FIs y los MTs desempeñan un papel crucial en el aumento de la rigidez celular al prevenir la deformación excesiva.

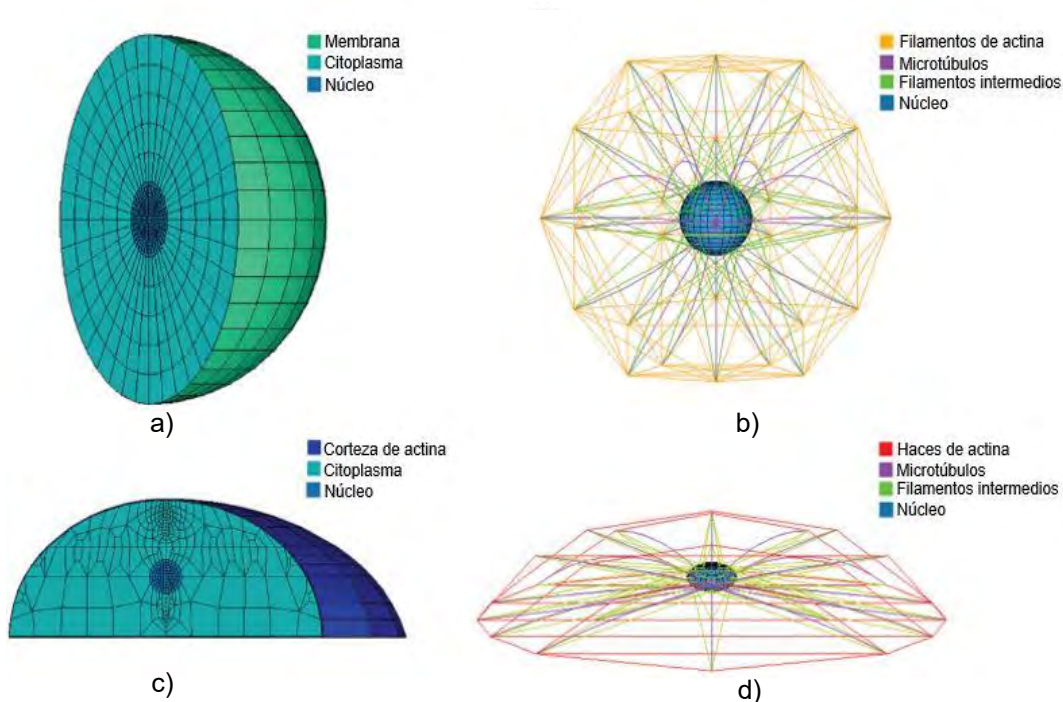


Figura 2.14. Modelos celulares y la disposición estructural de componentes del citoesqueleto: a) y b) modelo de células suspendidas. En c) y d) modelo de células adherentes. De [18].

Otro trabajo que utilizó una metodología similar fue realizado por Jakka y Bursa [20] quienes modelaron células endoteliales. En su estudio, modelaron la célula como un prisma hexagonal con un espesor de 5 μm (Figura 2.15a), que refleja la naturaleza plana y estirada de estas células. Los MTs se representaron como 12 vigas curvas que se extienden desde el centrosoma hasta los vértices de la geometría, capaces de soportar flexión, tensión y compresión. Además, el modelo incluyó FAs y FIs, representados por 36 y 24 elementos de cable y armaduras, respectivamente.

En un segundo modelo, los mismos autores desarrollaron una célula endotelial adherente con forma esférica y actinas gruesas (Figura 2.15 en b y c). Ambos modelos fueron sometidos a compresión hasta alcanzar una deformación del 50% de su geometría inicial. Los MTs, las FAs y los FIs se orientaron perpendicularmente a la dirección de la carga. Durante la compresión, los MTs, situados en la región

central, se enderezaron y soportaron eficazmente las fuerzas de tracción (ver Figura 2.15f). Las FAs resistieron de manera efectiva las fuerzas de tracción (ver Figura 2.15d). En contraste, los FIs mostraron solo una ligera desestabilización desde su ondulación inicial (ver Figura 2.15e). Los autores reportaron que la curva de fuerza-deformación obtenida de las simulaciones de la prueba de compresión se correlacionó bien con las curvas experimentales obtenidas de las pruebas de compresión de células endoteliales cultivadas.

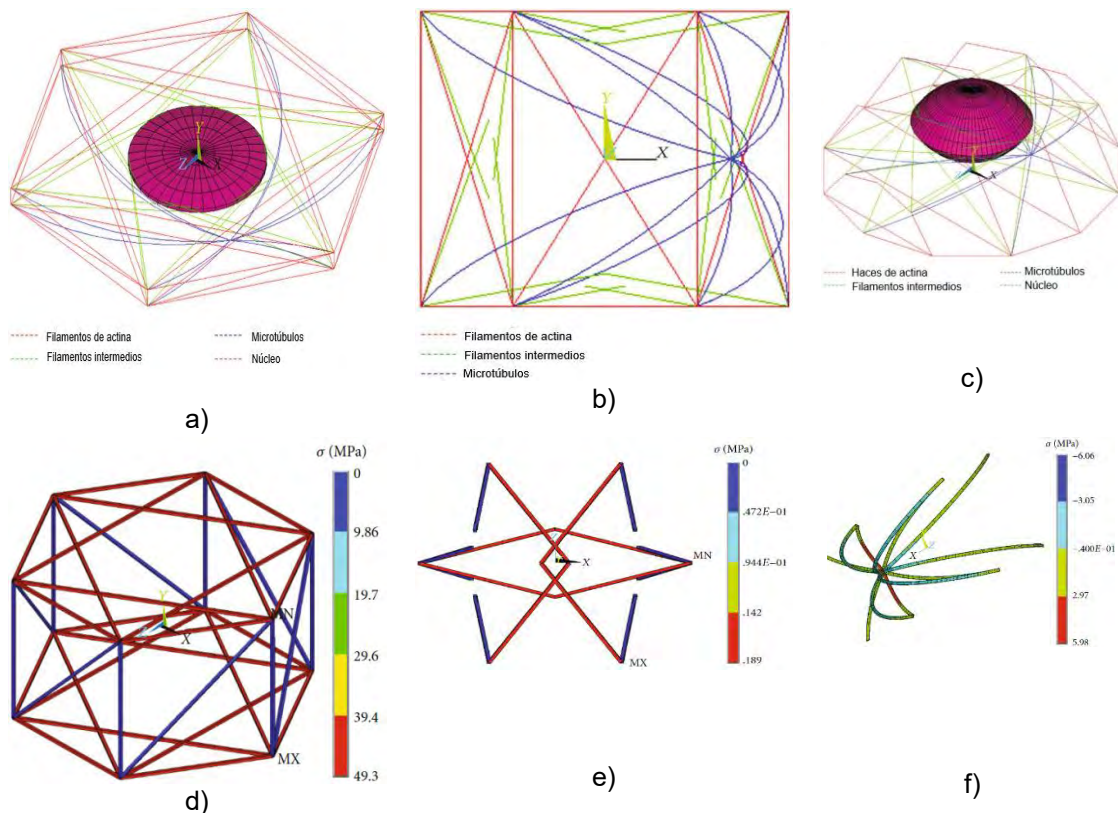


Figura 2.15. Modelos de células: a) representación 3D de una célula endotelial plana, b) modelo de célula esférica para simulación de prueba de compresión, c) componentes del citoesqueleto en una célula adherente. Resultados de la simulación con vistas isométricas: d) FAs, e) red de FIs y f) distribución de MTs [20].

Un trabajo paralelo fue realizado por Katti *et al.* [44] quienes, aunque no emplearon el enfoque de bendo-tenseguridad, desarrollaron un modelo con características similares. Ellos crearon un modelo del MEF para una célula cancerosa MCF-7, como se ilustra en la Figura 2.16a. Este modelo incorporó MTs rectos originados en el núcleo celular, así como FIs y FAs que se curvan y se dispersan por todo el citoplasma. Se llevaron a cabo tres casos de estudio: en el caso 1, se consideró el citoesqueleto completo, es decir, con el 100% de sus componentes; en el caso 2, se eliminó el 50% de los MTs, FIs y FAs; y en el caso 3, se eliminó el 90% de estos componentes. En cada caso, se aplicó una carga de 0.002 nN, y se obtuvieron deformaciones de la membrana celular de 8.39, 9.13 y 11.76 nm para los casos 1, 2 y 3, respectivamente. La Figura 2.16b muestra la gráfica de fuerza-deformación

(F-D) para los tres casos. En la misma gráfica se representa una respuesta no lineal y diferencias en la respuesta F-D de la célula en los distintos casos de estudio. Los autores concluyeron que una reducción en el número de elementos del citoesqueleto incrementa la suavidad de la célula.

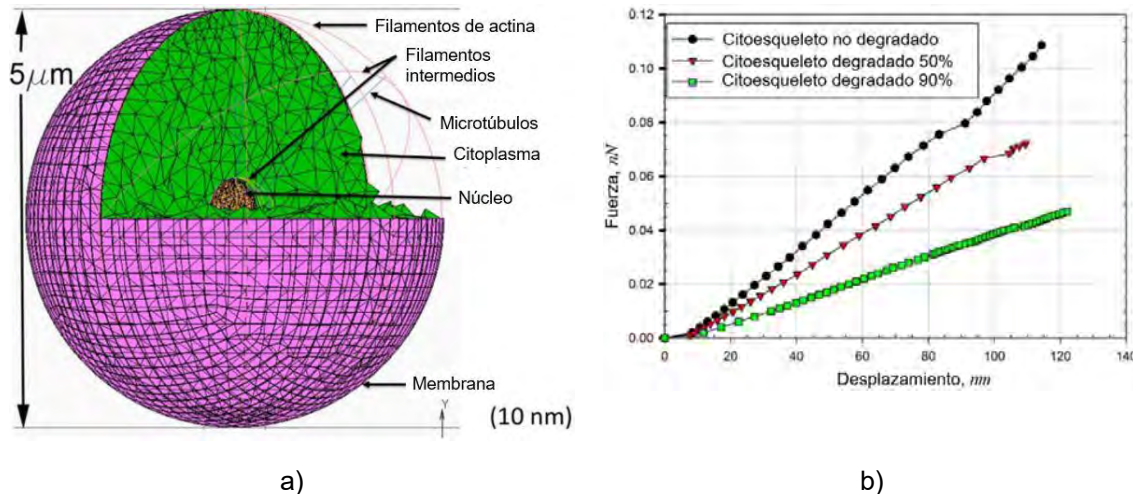


Figura 2.16. Modelo tridimensional de célula cancerosa de 5 micrómetros de diámetro: a) visualización en 3D del modelo de elemento finito con recorte que ilustra los diferentes componentes celulares y b) gráfico de la relación fuerza-deformación [44].

La literatura científica muestra que las frecuencias naturales varían entre células sanas y cancerosas. Sin embargo, los estudios disponibles no proporcionan un valor único para estas frecuencias debido a dos factores principales: la diversidad de componentes celulares incluidos en los modelos y el tipo de sujeción celular, ya sea adheridas a un plato de cultivo o en suspensión. Los modelos que determinaron las frecuencias naturales generalmente incorporaron el núcleo, el citoplasma y la membrana celular. Sin embargo, en otros estudios que no se enfocaron específicamente en el cálculo de frecuencias naturales, se observó que el citoesqueleto es un componente crucial para la rigidez estructural de las células. Por lo tanto, su inclusión en los modelos del MEF es esencial y no debe ser pasada por alto.

Un aspecto notable es que la mayoría de los estudios se centran en células en suspensión, con la excepción del trabajo de Ahmed *et al.* [16]. Al calcular las frecuencias naturales en células en suspensión, pueden surgir variaciones en comparación con células adheridas a un plato de cultivo o en un entorno *in vivo*. Por lo tanto, es necesario realizar investigaciones que consideren las condiciones de frontera que las células presentan en su entorno natural, ya sea *in vivo* o adheridas a un plato de cultivo. Esto incluye considerar las Adfs, que son fundamentales para el anclaje celular en su entorno. Además, se debe integrar el citoesqueleto en los modelos, ya que es un factor clave en la rigidez celular.

2.4 Trabajos con ultrasonido de alta intensidad en pacientes con cáncer

En esta sección se presentan estudios que han empleado ultrasonido focalizado de alta intensidad (HIFU, por sus siglas en inglés) como modalidad de tratamiento para tumores cancerosos [45]. El sistema HIFU, representado en la Figura 2.17, emplea un transductor con forma de cono que emite ondas ultrasónicas. Estas ondas se proyectan de manera que convergen en un punto focal específico. El objetivo del dispositivo es permitir que las ondas ultrasónicas atraviesen diversas capas de tejido y se concentren en el punto focal, donde la intensidad y la frecuencia de las ondas se suman para generar un efecto terapéutico preciso.

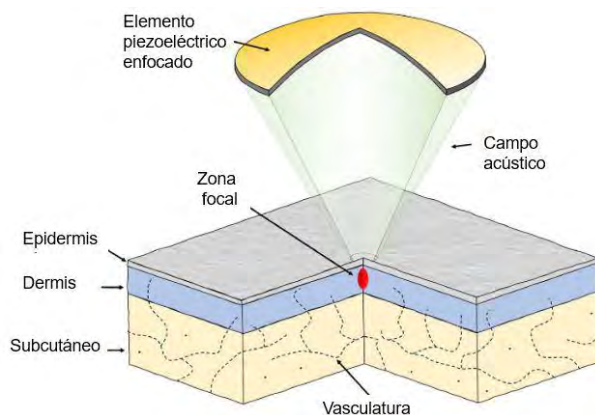


Figura 2.17. Esquema del principio de funcionamiento del HIFU, que ilustra la formación de un punto focal acústico de alta intensidad en un medio [45].

Uno de los primeros estudios destacados en el uso de HIFU para el tratamiento de tumores cancerosos fue llevado a cabo por Wu *et al.* [8]. En su investigación, trataron a 48 pacientes con cáncer de mama mediante el uso de esta tecnología avanzada, seguida de mastectomía radical. Durante el tratamiento, 14 pacientes experimentaron dolor local leve, calor y sensación de presión en el cuerpo, de los cuales solo 4 requirieron analgésicos durante 3-5 días. Solo un paciente presentó una quemadura cutánea leve, la cual se recuperó por completo después de 10 días. No se registraron casos de sangrado o infección en las mamas tratadas, ni se observó hemorragia tumoral ni ruptura de vasos sanguíneos. Todos los pacientes sobrevivieron durante el seguimiento de 10 a 36 meses, y 47 pacientes estuvo libre de la enfermedad. Además, el análisis de las células cancerosas tratadas reveló daño subcelular y destrucción de la membrana, así como, orgánulos celulares.

En otro estudio, Kim *et al.* [9] emplearon HIFU guiado por resonancia magnética (RM) para el tratamiento de fibromas uterinos. La investigación incluyó a 27 mujeres con fibromas de más de 11.3 cm³, con edades a partir de 44 años. Los resultados indicaron que, tras una sola sesión de tratamiento, el volumen de los fibromas se redujo en un 50% en todas las pacientes, sin que se reportaran efectos adversos significativos en la salud. Estos hallazgos sugieren que la combinación de HIFU con

guía por RM constituye una estrategia segura y eficaz para la reducción del volumen de fibromas uterinos.

En una línea de investigación relacionada, Yang *et al.* [10] llevaron a cabo un estudio adicional en el tratamiento de miomas uterinos: combinaron HIFU con inyección intratumoral de etanol guiada por ecografía. En este estudio, 40 pacientes fueron asignadas aleatoriamente a dos grupos: el Grupo H, que recibió únicamente tratamiento con HIFU, y el grupo H + A, que recibió la terapia de inyección de etanol seguida de HIFU al día siguiente. Los resultados revelaron que el grupo H + A no experimentó efectos secundarios y se benefició de un tiempo de tratamiento más corto, una dosis reducida de ultrasonido y menos dolor. Este enfoque también se destaca como una opción factible, segura y eficaz para el tratamiento de miomas uterinos, con más opciones disponibles para abordar esta condición.

Por su parte, Guan *et al.* [11] investigaron los efectos del HIFU en los tejidos del cáncer de mama y los vasos sanguíneos circundantes. El estudio, que incluyó a veinticinco pacientes, empleó parámetros ultrasónicos específicos, tales como una frecuencia de 1.6 MHz, una longitud focal de 90 mm, una zona focal de 3.3×1.1 mm, un diámetro de transductor de 200 mm y una intensidad ultrasónica de 5 a 20 kW/cm². Después del tratamiento con HIFU se observó la muerte celular por efectos térmicos internos y la ruptura de la membrana celular en las células cancerosas. Además, se evidenció la desintegración de las fibras en los vasos sanguíneos asociados con el tumor, lo que indicó que el HIFU puede interrumpir el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos inducidos por el tumor. Estos resultados aportaron una comprensión adicional sobre el impacto del HIFU en la estructura tumoral. Contrastaron con los hallazgos de estudios previos que se enfocaron en la reducción del volumen tumoral y los efectos sobre tejidos adyacentes.

Con base en los resultados de los trabajos anteriores [8-11, 45], Kuo *et al.* [12] desarrollaron un transductor especializado para HIFU, diseñado para focalizarse específicamente en el tumor cancerígeno. Este dispositivo fue sometido a pruebas tanto *in vivo*, con el uso de tejido de conejo, como *ex vivo*, con tejido porcino. La guía del HIFU se realizó mediante resonancia magnética con termometría para un control preciso de la temperatura. El transductor ultrasónico fue concebido en forma de anillo para adaptarse al seno de la mujer, con el propósito de destruir el tumor mamario sin dañar el tejido sano circundante. En el experimento con tejido porcino, se emplearon parámetros de potencia acústica de 315 W/cm² y un tiempo de exposición de 8 segundos. Las imágenes térmicas obtenidas mediante resonancia magnética revelaron que las temperaturas máximas de ablación fluctuaron entre 66 y 91 °C, sin provocar daños en el tejido sano más allá de 3 mm del objetivo principal. De manera similar, en el tejido de conejo, el sistema mostró resultados prometedores con una potencia acústica de 221 W/cm² y un tiempo de exposición de 6 segundos, sin afectar el tejido más allá de 2.5 mm desde el objetivo. La frecuencia del transductor anular fue de 1.2 MHz. Las imágenes del transductor y del tejido porcino se ilustran en la Figura 2.18 en a y b, respectivamente.

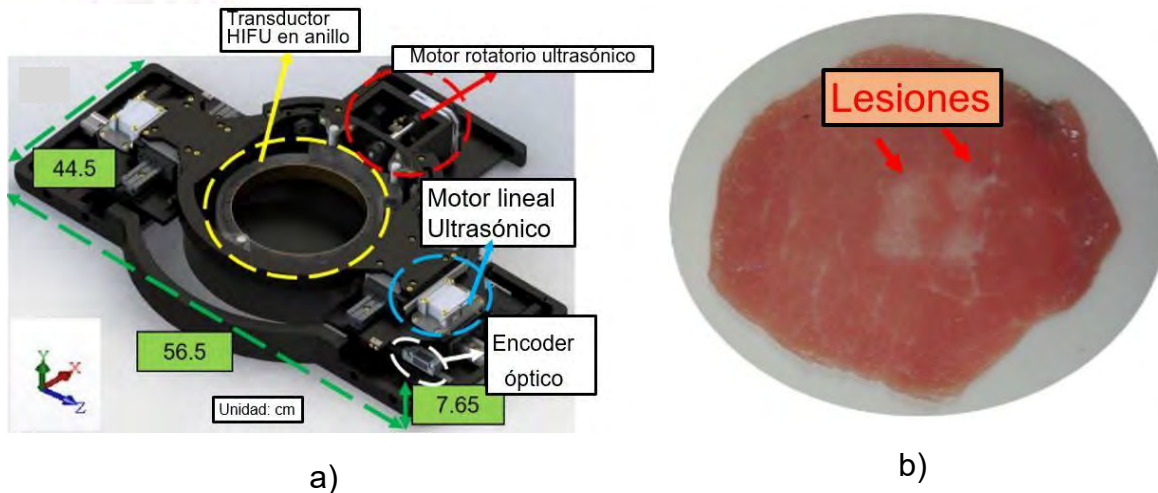


Figura 2.18. Elementos del experimento: a) transductor de diseño anular adaptado para la aplicación en tratamientos de HIFU y b) tejido porcino con lesiones localizadas [12].

En investigaciones paralelas, Yu *et al.* [13] cultivaron células de cáncer de páncreas en ratones para desarrollar tumores tanto ortotópicos como subcutáneos. Cuando estos tumores alcanzaron un tamaño de 200-300 mm³, se inició el tratamiento mediante exposición al HIFU, como se observa en la Figura 2.19a. Utilizaron una frecuencia de 3.5 MHz, un tiempo de radiación de 500 ms y una potencia acústica de salida de 47.92 W. La distancia entre dos puntos de irradiación fue de 1 mm, y la intensidad promediada espacialmente fue de 1 134 W/cm². Antes del tratamiento, se detectaron células tumorales circulantes (CTC) alrededor del tumor, que viajaban por los vasos sanguíneos, como se ilustra en la Figura 2.19b. Sin embargo, después de la exposición in vivo al HIFU, se observó que estas CTC estaban muertas. Los investigadores informaron que el tratamiento con HIFU no promueve la diseminación de células cancerosas a otras partes del cuerpo, sino que ayuda a reducirla. Se atribuyeron las muertes celulares al rompimiento de la membrana, al aumento de la temperatura, a la desestabilización interna y a la generación de ondas de choque en el citoplasma.

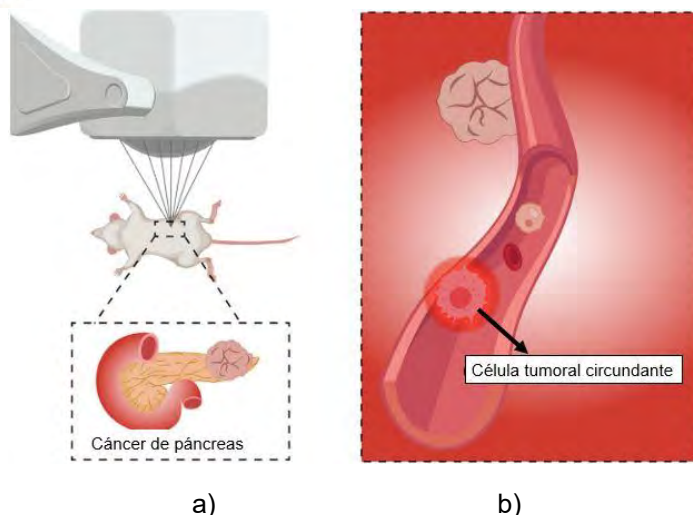


Figura 2.19. Detalles del experimento: a) representación del sistema de HIFU utilizado en la radiación del ratón y b) esquema de células cancerosas escapando del tumor a través de los vasos sanguíneos [13].

En investigaciones adicionales, Serup *et al.* [14] exploraron el uso de HIFU en un contexto diferente, lo aplicaron al tratamiento del cáncer de piel. Utilizaron un sistema de HIFU de 20 MHz, trataron a cinco pacientes con diversas formas de cáncer cutáneo. En el primer caso, el paciente había iniciado tratamiento con terapia fotodinámica para una queratosis actínica (QA), pero abandonó el tratamiento debido al dolor asociado. Sin embargo, encontró que el dolor del HIFU era tolerable, y se logró eliminar completamente la lesión en tres meses. En el segundo caso, un tratamiento similar con HIFU en el cuello eliminó por completo la QA en seis meses sin dejar cicatrices. El tercer caso implicó una QA en el lóbulo de la oreja que se curó después de tres meses de terapia con HIFU. En el cuarto caso, un carcinoma de células basales recurrente en el cuero cabelludo, que no respondió a la fotodinámica ni a la radioterapia, fue eliminado tras dos meses de tratamiento con HIFU, sin recurrencia en seis meses. Finalmente, en el quinto caso, un sarcoma de Kaposi en la piel fue tratado con HIFU, eliminó la masa sólida en diez semanas, aunque dejó una mancha oscura. Estos resultados no solo destacan la eficacia del HIFU en la eliminación de lesiones cutáneas, sino que también sugieren ventajas sobre la terapia fotodinámica. Este estudio representa el primer informe en la literatura científica sobre la aplicación exitosa del HIFU en el tratamiento del cáncer de piel, con resultados favorables que podrían impulsar su adopción como un método estándar en el futuro.

A pesar de estos resultados prometedores, es crucial reconocer que el HIFU, al igual que otros tratamientos no invasivos, presenta limitaciones y desafíos inherentes. Por ejemplo, la terapia fotodinámica puede generar resistencia si las sustancias fotosensibilizadoras penetran en el núcleo de las células tumorales [46, 47]. La radioterapia, por su parte, puede dañar células sanas debido al uso de elementos radiactivos y fomentar el crecimiento de macrófagos, lo que podría

contribuir al aumento del tamaño del tumor [48]. Del mismo modo, el HIFU puede causar daño al tejido sano si no se enfoca adecuadamente. Estos factores subrayan la necesidad de una evaluación cuidadosa al considerar opciones de tratamiento, y se destaca que, a pesar de sus ventajas, el HIFU debe ser utilizado con precaución y en el contexto adecuado.

En relación con el ultrasonido, es importante destacar que el HIFU no promueve la diseminación de células cancerosas a otras partes del cuerpo y puede interrumpir la formación de nuevos vasos sanguíneos inducidos por el tumor, los cuales, son esenciales para el proceso metastásico. Sin embargo, el HIFU no afecta los vasos sanguíneos ya preexistentes. Aún quedan aspectos importantes por explorar, como determinar la frecuencia e intensidad de ultrasonido necesarias para eliminar específicamente las células cancerosas sin dañar tejidos sanos u otros órganos. Esta investigación sería fundamental para mejorar la eficacia y seguridad de los tratamientos con ultrasonido en el futuro.

2.5 Fenómenos provocados por ultrasonidos en tejidos biológicos

Dado el potencial del US en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, es fundamental comprender los fenómenos que el US puede inducir en los tejidos biológicos. Los US se propagan a través del tejido humano y generan diversos efectos en función de los parámetros específicos como la frecuencia, la potencia y el tiempo de exposición. Estos fenómenos incluyen la ablación térmica, el estrés térmico, la hipertermia y las perturbaciones mecánicas e histotricia.

Por su parte, la ablación térmica se refiere a la destrucción de tejido mediante calor y es una de las aplicaciones más comunes del ultrasonido terapéutico. Este fenómeno se basa en la conversión de energía ultrasónica en calor en el punto focal del US, que genera un calentamiento rápido a temperaturas de 60-85°C [11, 45, 49]. La ablación térmica se emplea como una alternativa no invasiva a la cirugía para extirpar tumores y gracias a ello se minimiza el daño al tejido circundante [11].

En contraste, el estrés térmico y la hipertermia resultan de la exposición prolongada a US. La Figura 2.20 ilustra cómo la elevación de temperatura está directamente relacionada con el tiempo de exposición a las ondas ultrasónicas. Las temperaturas entre 0 y 50°C se consideran seguras para el tejido, mientras que, temperaturas superiores pueden provocar quemaduras. El estrés térmico se produce cuando el US calienta los tejidos a temperaturas bajas, entre 40 y 45°C, durante algunos segundos a minutos. La hipertermia, por otro lado, se induce a temperaturas similares, pero durante períodos de 30 a 90 minutos, y se ha estudiado extensamente como terapia contra el cáncer debido a sus efectos inmunológicos complejos y su capacidad para potenciar la quimioterapia o radioterapia [50, 51]. Esta técnica causa daños en las proteínas y el ADN, interfiere con la formación de componentes esenciales de las células y altera el ciclo celular, lo que puede llevar a la muerte celular directa o apoptosis [52, 53].

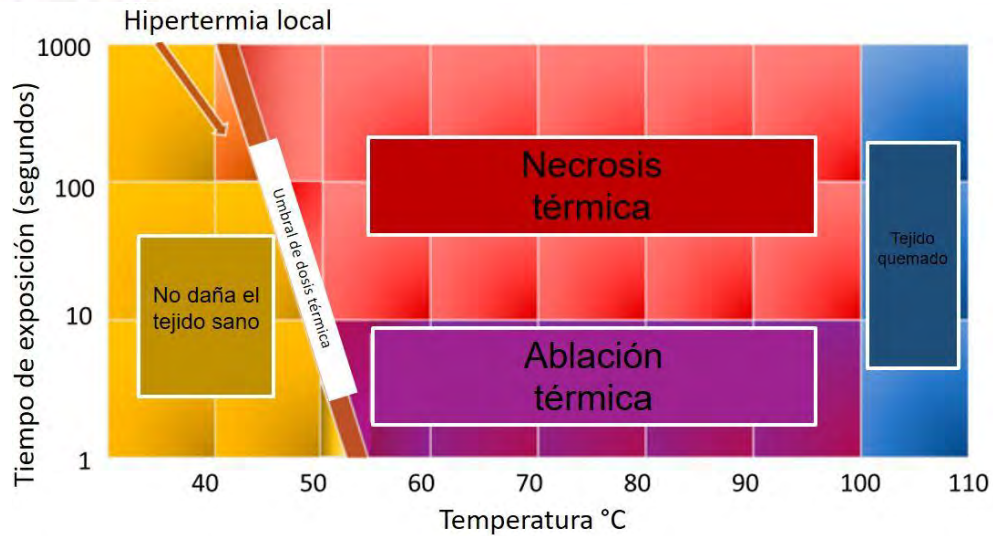


Figura 2.20. Relación entre la temperatura, el tiempo de exposición al ultrasonido y los efectos biológicos en los tejidos [52].

Las perturbaciones mecánicas e histotricia son fenómenos que involucran la ruptura de estructuras celulares debido a las ondas acústicas. Las perturbaciones mecánicas, causadas por US en el rango de 200 kHz a 3 MHz con tiempos de tratamiento de segundos a minutos, pueden dilatar vasos sanguíneos y abrir poros en las células sin calentar significativamente los tejidos [54, 55]. La magnitud del daño en la membrana celular está directamente relacionada con el tipo de muerte celular: si la membrana se repara, la célula puede sobrevivir o morir por efectos internos; si no es reparable, la célula muere por la liberación del citoplasma [55].

La histotricia, por su parte, utiliza presiones extremadamente altas de 10-80 MPa para fragmentar el tejido sin causar daño térmico significativo [56, 57]. En este proceso, se generan burbujas densas y con vacíos internos que se expanden y contraen rápidamente lo que provoca descomposición mecánica en el tejido. Estas burbujas se forman cuando la presión negativa máxima supera los 28 MPa para los tejidos blandos, y pueden generarse mediante un solo pulso de presión negativa o múltiples pulsos de ultrasonido que forman burbujas distribuidas y dispersas [58].

La Tabla 2.5 presenta un resumen de los parámetros del ultrasonido utilizados en aplicaciones clínicas para inducir los fenómenos descritos. La selección y ajuste precisos de estos parámetros son esenciales para maximizar la eficacia y seguridad del ultrasonido en tejidos y células, de manera que se logren los efectos terapéuticos deseados y se minimicen los riesgos para los tejidos sanos circundantes.

Tabla 2.5. Rango de parámetros del ultrasonido en el uso clínico para inducir ablación térmica, estrés térmico, hipertermia y perturbación mecánica.

Parámetros	Ablación térmica [45, 49]	Estrés térmico e hipertermia [59, 60]	Perturbación mecánica [61, 62]	Histotricia [62, 63]
Frecuencia (MHz)	200 KHz-20	200 KHz-3	200 KHz-3	200 KHz-3
Presión (MPa)	3-70	0.1-4	0.1-4	10-80
Ciclo de trabajo (%)	0.5-100	0.5-100	0.5-50	0.01-4
Tiempo de tratamiento (por punto focal)	Segundos a minutos	30-90 min.	Segundos a minutos	Segundos a minutos

Capítulo 3

Metodologías para la solución numérica y experimental

En este capítulo se describe, en detalle, el método del elemento finito (MEF) implementado para resolver las ecuaciones gobernantes del análisis modal y armónico amortiguado. Además, se expone la metodología aplicada para el estudio experimental *in vitro*, tanto los procedimientos experimentales como las técnicas análisis de viabilidad celular utilizadas.

3.1 El método de elementos finitos

En este trabajo se empleó el MEF, una herramienta numérica que permite la discretización de sistemas continuos al transformar las ecuaciones diferenciales que los representan en un conjunto de matrices. Este método es especialmente útil para calcular las frecuencias naturales de un sistema, ya que la solución se reduce a la búsqueda iterativa de los valores y vectores propios de la relación entre rigidez y masa. Además, el MEF permite la incorporación de fuerzas, presiones y frecuencias externas en una estructura, así como la inclusión de rigideces adicionales para modelar de manera precisa las condiciones de frontera. La implementación del MEF consta de tres etapas que son el pre-procesamiento, procesamiento y post-procesamiento [64, 65].

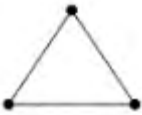
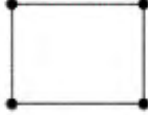
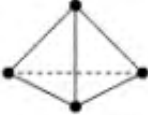
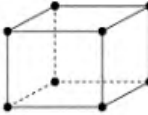
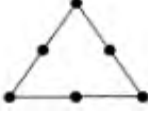
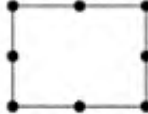
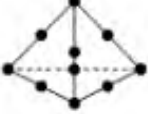
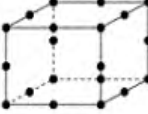
3.1.1 Pre-procesamiento

Esta sección abarca el pre-procesamiento del modelo, que incluye la discretización del dominio físico mediante el mallado, proceso en el cual se subdivide el dominio en una serie de elementos más pequeños y manejables. Posteriormente, se verifican las métricas de malla, se generan los contactos, se definen las condiciones de frontera y se asignan las propiedades mecánicas a los componentes del sistema. En esta sección se detallan los aspectos más relevantes.

3.1.1.1 Discretización del dominio físico

La discretización del dominio físico o generación de malla en el MEF consiste en subdividir el dominio continuo de un problema en una colección de subdominios más pequeños, denominados elementos finitos. Para medios físicos en 3D, estos elementos pueden ser tetraedros con cuatro o diez nodos, o hexaedros con ocho o diez nodos, mientras que para medios 2D se utilizan triángulos con tres o seis nodos, o cuadriláteros con cuatro u ocho nodos. En el caso de elementos 1D, la discretización implica simplemente dividir una línea en segmentos más pequeños, los cuales, pueden tener dos o tres nodos. Todos estos elementos de malla se presentan en la Tabla 3.1. La malla resultante, conformada por nodos y elementos, permite aproximar la solución de las ecuaciones diferenciales del problema original mediante un sistema de ecuaciones algebraicas. Esta discretización es crucial para obtener una representación precisa del comportamiento del sistema físico bajo estudio, con ello, se facilita el análisis numérico y la simulación de fenómenos complejos.

Tabla 3.1. Tipos de elementos de malla para geometrías 1D, 2D y 3D.

1D	2D		3D	
	Triángulo	Cuadrado	Tetraedro	Hexaedro
 2 nodos	 3 nodos	 4 nodos	 4 nodos	 8 Nodos
 3 nodos	 6 nodos	 8 nodos	 10 nodos	 20 nodos

Los hexaedros de 8 nodos se utilizan para problemas que requieren menor precisión y tienen geometrías regulares, mientras que los de 20 nodos ofrecen mayor precisión y geometrías complejas debido a su mayor capacidad de deformación. Los tetraedros de 4 nodos son adecuados para mellar geometrías irregulares de manera rápida, pero ofrecen menor precisión. Los tetraedros de 10 nodos, con nodos adicionales en las aristas, proporcionan una mejor aproximación en problemas con altos gradientes de deformación y esfuerzos: ideales para geometrías complejas y análisis detallados. Las líneas de 2 nodos se usan en modelos simples y lineales, mientras que las de 3 nodos son preferidas para capturar curvaturas y comportamientos no lineales.

3.1.1.2 Métricas de malla

Antes de realizar cálculos computacionales es fundamental revisar ciertas métricas para garantizar un mallado de alta calidad. Las métricas más importantes se mencionan en esta sección.

3.1.1.2.1 Calidad de malla

La calidad de malla se refiere a la conformidad y precisión con las que una malla discreta representa la geometría y los atributos físicos del modelo analizado. En la Figura 3.1 se muestra la evaluación de la calidad de malla mediante la representación de un triángulo en cuyo centro emergen los vectores f_1 , f_2 y f_3 . A su vez, los vectores A_1 , A_2 y A_3 se proyectan perpendicularmente a la superficie del triángulo central. La calidad de la malla se determina cuantitativamente mediante el cálculo del producto punto entre estos vectores, el cual se divide posteriormente entre el producto de sus magnitudes (ver ecuación 3.1) [66, 67].

El valor ideal de calidad de malla es 1 para todos los tipos de elementos. Sin embargo, una calidad de malla con un valor a partir de 0.2 es considerada aceptable [66, 67]. Este cumplimiento de calidad garantiza que las variables que se buscan calcular en las simulaciones sean representativas del comportamiento real de los modelos bajo condiciones de cargas o excitaciones específicas.

$$\frac{A_i \cdot f_i}{|A_i| |f_i|} \quad (3.1)$$

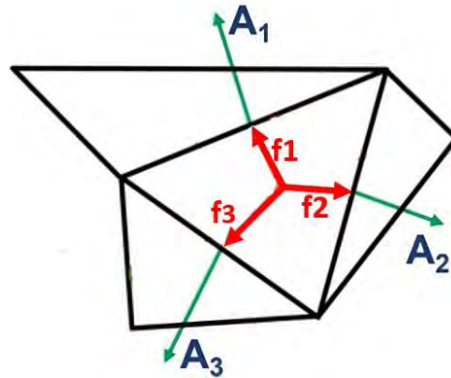


Figura 3.1. Elementos triángulos que representan la malla [67].

3.1.1.2.1 Relación de aspecto de malla

La relación de aspecto es una medida de la conformidad dimensional de los elementos de malla respecto a una geometría ideal. Por ejemplo, en un hexaedro, la forma ideal es un cubo con aristas iguales y ángulos de 90° , mientras que, en un tetraedro, la forma ideal es una pirámide triangular con aristas iguales y ángulos internos uniformes. Durante el mallado de un cuerpo, la geometría ideal de los elementos de malla puede deformarse, por lo que es crucial monitorear los valores de la relación de aspecto. El valor óptimo de la relación de aspecto es 1. No obstante, estos valores pueden incrementarse significativamente; cuando superan 10 es necesario volver a mallar hasta lograr valores cercanos a 1 [66, 67].

Una relación de aspecto cercana a 1 en la mayoría de los elementos de la malla refuerza la integridad del modelo debido a que se minimizan las distorsiones geométricas que podrían introducir errores numéricos en el análisis. Mantener una relación de aspecto baja permite una mejor representación de geometrías complejas, lo que contribuye a la precisión de los resultados. En conjunto, estos factores destacan la importancia de una malla bien diseñada para obtener conclusiones válidas y confiables en los análisis numéricos.

3.1.2 Tipos de contactos

En un análisis modal y armónico mediante el uso del MEF sólo se aceptan contactos lineales. Los tipos de contactos lineales son el "contacto unido" y el "contacto sin separación" [67].

El "contacto unido" se refiere a una condición en la que dos elementos están completamente unidos, de modo que no existe movimiento relativo entre ellos y tampoco se considera la fricción. Este tipo de contacto es ideal para simular situaciones en las que los componentes están rígidamente conectados, como en una soldadura o una conexión adhesiva.

Por otro lado, el "contacto sin separación" se refiere a una condición en la que dos cuerpos permanecen en contacto sin permitir la penetración, pero pueden deslizarse uno respecto al otro sin considerar coeficientes de fricción. Este contacto es útil para modelar interacciones en las que los componentes están en contacto, pero permiten cierto grado de movimiento relativo, como en las juntas sin fricción o las conexiones atornilladas donde el deslizamiento puede ocurrir bajo ciertas condiciones de carga.

Estos contactos lineales son esenciales para la precisión del análisis modal porque aseguran que las interacciones entre los componentes se modelen de manera realista. Influyen adecuadamente las frecuencias naturales y los modos de vibración del sistema.

3.2 Procesamiento

En la etapa de procesamiento se resuelven las ecuaciones que describen el fenómeno en estudio. En este trabajo, se llevaron a cabo estudios modales y armónicos, los cuales, se explican detalladamente en esta sección.

3.2.1 Análisis modal

El análisis modal es el estudio de la vibración libre que ocurre cuando un sistema oscila debido a fuerzas internas, sin influencia externa. La frecuencia de oscilación de estos sistemas se denomina frecuencia natural, y está determinada por la rigidez y distribución de masa del sistema cuando no existe amortiguamiento. Para ilustrar este concepto, en la Figura 3.2 se presenta un sistema de masa-resorte con un

grado de libertad, donde k representa la rigidez del resorte, m la masa del sistema, y $F(t)$ una fuerza externa aplicada [67, 68].

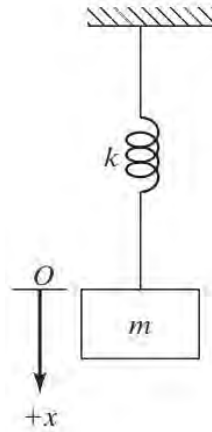


Figura 3.2. Sistema masa-resorte de un grado de libertad [68].

Al aplicar la segunda ley de Newton y considerar una fuerza externa nula en el sistema representado en la Figura 3.2, la ecuación de movimiento se define en forma matricial como se muestra en la ecuación (3.2) [67].

$$[M]\{\ddot{u}\} + [K]\{u\} = \{0\} \quad (3.2)$$

Donde $[M]$ es la matriz de masa, $[K]$ matriz de rigidez estructural, $\{\ddot{u}\}$ es el vector de aceleración y $\{u\}$ es el vector de posición.

Si al sistema, Figura 3.2, se le considera un movimiento armónico la posición y aceleración se representan con las ecuaciones (3.3) y (3.4).

$$\{u\} = \{\phi\}_i \sin(\omega_{n_i} t + \theta_i) \quad (3.3)$$

$$\{\ddot{u}\} = -\omega_{n_i}^2 \{\phi\}_i \sin(\omega_{n_i} t + \theta_i) \quad (3.4)$$

Donde ω_n es el eigenvalor o la frecuencia natural, ϕ es el eigenvector o el modo de vibración y θ es el ángulo de fase.

Las ecuaciones (3.3) y (3.4) se sustituyen en la ecuación (3.2) y se obtiene la ecuación (3.5) [67]. Con esta última ecuación se extraen las frecuencias naturales y los modos de vibración mediante un algoritmo en MEF.

$$[K] - \omega_{n_i}^2 [M] \{\phi_i\} = \{0\} \quad (3.5)$$

3.2.2 Análisis armónico

Un análisis armónico implica explorar un espectro de frecuencias para discernir la respuesta del sistema ante diversas fuerzas de excitación. Este enfoque se emplea para determinar la respuesta estable de una estructura lineal a cargas que varían sinusoidalmente en el tiempo. El objetivo es calcular la respuesta de la estructura a diferentes frecuencias y generar gráficos que representen los desplazamientos en

función de la frecuencia, lo que permite identificar las amplitudes máximas del sistema en la gráfica resultante.

Las cargas o fuerzas armónicas externas de un sistema se representan mediante la ecuación (3.6) [67].

$$F(t) = F_0 \cos \omega t \quad (3.6)$$

donde:

F_0 es la fuerza forzada y ω frecuencia forzada.

Un sistema sometido a una fuerza armónica puede presentar o no amortiguamiento, lo que da lugar a dos tipos de estudios: el análisis armónico no amortiguado y el análisis armónico amortiguado. A continuación, se detallan ambos análisis para comprender mejor sus características y aplicaciones específicas.

3.2.2.1 Análisis armónico no amortiguado

Este sistema se representa en la Figura 3.3. Dado que no existe amortiguamiento, el modelo matemático que describe el movimiento se expresa mediante la ecuación (3.7) [67].

$$m\ddot{u} + ku = F_0 \cos \omega t \quad (3.7)$$

donde:

m es la masa.

k es la constante de rigidez.

$\ddot{u}$ es la aceleración.

u es la posición.

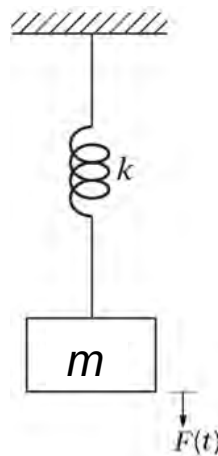


Figura 3.3. Sistema masa-resorte de un grado de libertad sometido a carga externa [68].

La ecuación (3.7) se puede solucionar con la ecuación (3.8), donde X representa la amplitud del sistema en respuesta a la excitación armónica. La variable δ_{est} , definida en la ecuación (2.9) es la deflexión estática del sistema bajo una carga constante.

$$X = \frac{F_0}{k - m\omega^2} = \frac{\delta_{est}}{1 - \left(\frac{\omega}{\omega_n}\right)^2} \quad (3.8)$$

$$\delta_{est} = \frac{F_0}{k} \quad (3.9)$$

3.2.2.2 Análisis armónico amortiguado

Este análisis estructural incluye amortiguamiento como se observa en la Figura 3.4. Por lo tanto, la ecuación de movimiento se representa por la ecuación (3.10) [68].

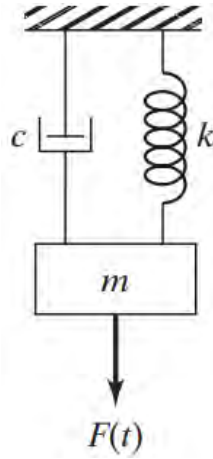


Figura 3.4. Sistema masa-resorte-amortiguador de un grado de libertad sometido a carga externa [68].

$$m\ddot{x} + c\dot{x} + kx = F_0 \cos \omega t \quad (3.10)$$

donde:

c es la constante de amortiguamiento y $\dot{x}$ la velocidad.

Una solución de la ecuación (3.10) es $x_p = X \cos(\omega t + \phi)$. Con esta expresión se determina la amplitud con la ecuación (3.11):

$$X = \frac{F_0}{[(k - m\omega^2)^2 + c^2\omega^2]^{1/2}} \quad (3.11)$$

Y el ángulo de fase se calcula con la ecuación (3.12).

$$\phi = \tan^{-1} \left(\frac{c\omega}{k - m\omega^2} \right) \quad (3.12)$$

La relación de amortiguamiento en el sistema armónico amortiguado se establece con la ecuación (3.13).

$$\xi = \frac{c}{2m\omega_n} \quad (3.13)$$

Por lo tanto, la amplitud en función de la relación de amortiguamiento se expresa en la ecuación (3.14).

$$\frac{X}{\delta_{est}} = \frac{1}{\left\{ \left[1 - \left(\frac{\omega}{\omega_n} \right)^2 \right]^2 + \left[2\xi \frac{\omega}{\omega_n} \right]^2 \right\}^{1/2}} \quad (3.14)$$

Finalmente, el ángulo de fase se determina con la ecuación (3.15).

$$\phi = \tan^{-1} \left\{ \frac{2\xi \frac{\omega}{\omega_n}}{1 - \left(\frac{\omega}{\omega_n} \right)^2} \right\} \quad (3.15)$$

3.2.3 Suposiciones y restricciones del análisis modal y armónico

Es importante mencionar que, en el MEF, el análisis modal y armónico se basa en varias suposiciones y restricciones clave [64, 65, 67]. Primero, se asume que toda la estructura posee efectos de rigidez, amortiguamiento y masa constantes o dependientes de la frecuencia. No se permiten no linealidades, por lo que se ignoran las propiedades de materiales no lineales, como la plasticidad, incluso si están definidas. Además, no se calculan los efectos transitorios, es decir, las vibraciones que usualmente ocurren al comienzo de la excitación. Finalmente, se asume que las cargas de aceleración y de los rodamientos son reales y están en fase.

3.3 Post-procesamiento

El post-procesamiento en el MEF representa la etapa final del análisis, en la cual se interpretan y analizan los resultados obtenidos del modelo. En esta fase, los datos numéricos resultantes del cálculo se visualizan y examinan mediante gráficos, tablas y representaciones tridimensionales. Esto permite una comprensión detallada del comportamiento del sistema bajo las condiciones simuladas.

Durante el post-procesamiento se generan gráficos que ilustran desplazamientos, esfuerzos, deformaciones y otras variables relevantes en función del tiempo, frecuencia u otras magnitudes de interés.

3.4 Metodología experimental in-vitro

En esta sección se describe la metodología experimental para la radiación con US de células en un entorno *in vitro*. Para implementar esta metodología es necesario contar con un sistema de US, cultivos celulares adecuados y realizar un análisis detallado de la viabilidad celular.

3.4.1 Sistema de ultrasonido

El US consiste en ondas sonoras emitidas a frecuencias superiores a 20 kHz. Para los experimentos es esencial disponer de un dispositivo emisor de US que opere a las frecuencias de resonancia específicas de las células cancerosas y que permita la variación en la intensidad del ultrasonido (I). La intensidad del US, que es la

potencia acústica transferida por una onda sonora por unidad de área perpendicular a la dirección de propagación, se calcula mediante la ecuación 3.16 [69].

$$I = \frac{P_e}{A} \left(\frac{W}{cm^2} \right) \quad (3.16)$$

Donde:

P_e es la potencia eléctrica del dispositivo.

A es el área transversal a la propagación (cm^2).

También es fundamental controlar la presión del US para evaluar su impacto en la excitación celular. Antes de definir la presión de US en el dispositivo es necesario emplear el MEF para determinar el valor adecuado. En el MEF, la presión se introduce en unidades de Pascales. Por lo tanto, es preciso convertir la intensidad del ultrasonido, medida en W/cm^2 , a unidades de Pascales. Este procedimiento se inicia al transformar la intensidad del ultrasonido al nivel de presión sonora en decibelios (dB) mediante el uso de la ecuación 3.17. Posteriormente, el nivel de presión sonora se convierte a unidades de Pascales mediante la ecuación 3.18 [70].

$$\text{Nivel de presión sonora (dB)} = 10\text{Log}\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (3.17)$$

donde:

I es intensidad de ultrasonido en W/cm^2 .

I_0 es intensidad mínima auditiva para el humano en W/cm^2 .

$$\text{Nivel de presión sonora (dB)} = 20\text{Log}\left(\frac{P}{P_0}\right) \quad (3.18)$$

donde:

P es la presión de ultrasonido en Pascales.

P_0 es la presión de referencia (umbral de audición) en Pascales.

El objetivo de experimentar con parámetros de ultrasonido específicos obtenidos del MEF es validar el modelo numérico al identificar los valores óptimos que permitan eliminar las células cancerosas sin causar daño a las células sanas.

3.4.2. Cultivo celular

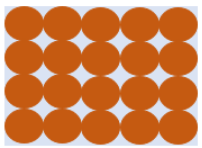
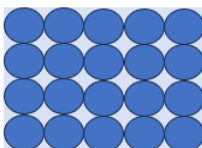
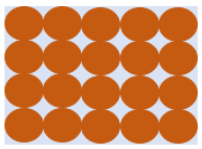
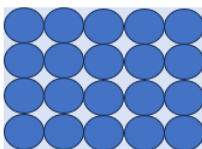
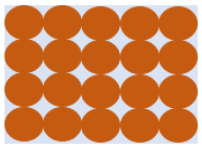
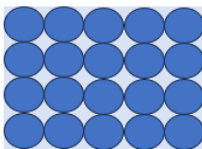
Se debe contar con cultivos de células MCF7 y MCF10A en una placa de cultivo celular con ambiente controlada mediante una incubadora de células. La incubadora debe ser capaz de mantener las células a una temperatura de $37^\circ C$ y una concentración de 5% de dióxido de carbono, lo cual es crucial para asegurar la reproducción celular. La reproducción celular observada en estas condiciones indica que se está emulando correctamente el comportamiento de las células in vivo.

3.4.2.1 Cultivos celulares radiados con ultrasonido y cultivos de control

Para analizar los efectos del US, se emplean dos tipos de cultivos celulares: los radiados con US y los cultivos de control. Los cultivos de control se refieren a aquellos que crecen en condiciones idénticas, pero sin exposición al US. Los tiempos de 24, 48 y 72 horas se seleccionaron para cubrir diferentes fases del ciclo celular, evaluar respuestas tanto tempranas como tardías, observar efectos acumulativos y comparar con la literatura científica.

En la Tabla 3.2 se detalla el número de cultivos celulares necesarios para el análisis de los efectos del ultrasonido en los intervalos de tiempo de 24, 48 y 72 horas. Para el periodo de 0 a 24 horas se requiere un cultivo de células cancerosas expuesto a ultrasonido y otro cultivo de control (no radiado) para comparar y verificar los efectos específicos del ultrasonido. De igual manera, se necesita un cultivo de células sanas radiado y uno de control. Por lo tanto, a las 24 horas, se debe contar con cuatro cultivos celulares en total: dos de células cancerosas y dos de células sanas. Este procedimiento se repite de forma idéntica a las 48 y 72 horas para evaluar los efectos a lo largo del tiempo.

Tabla 3.2. Representación de los cultivos celulares de control y con radiación de US.

Células de cáncer (MCF-7) y sanas (MCF10A)				Tiempo de análisis
Control	Radiación con US	Control	Radiación con US	
 MCF-7	 MCF-7	 MCF10A	 MCF10A	24 horas
 MCF-7	 MCF-7	 MCF10A	 MCF10A	48 horas
 MCF-7	 MCF-7	 MCF10A	 MCF10A	72 horas

3.4.3 Análisis de viabilidad celular

Un análisis de viabilidad celular es un procedimiento que determina la proporción de células vivas en una muestra; el compuesto 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o conocido comúnmente como método MTT es uno de los métodos

más efectivos para el análisis de viabilidad celular, ya que el compuesto de MTT penetra directamente en las células y proporcionan información precisa sobre si una célula está viva o muerta.

El procedimiento del método MTT se lleva a cabo de la siguiente manera [71, 72]:

1. Preparación de células: Se retiran las células de control y las expuestas al US de la incubadora, y se procede a la extracción de su medio de cultivo.
2. Preparación del compuesto MTT: Se eleva la temperatura del compuesto MTT a 37°C con agua destilada.
3. Mezcla del compuesto MTT: Se mezclan 2 ml del compuesto MTT con 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) para facilitar su absorción en las membranas celulares. Esta manipulación se realiza en oscuridad para evitar la degradación del compuesto.
4. Incubación con MTT: Se reemplaza el medio de cultivo celular por la mezcla de MTT y DMSO, y se incuban nuevamente durante 4 a 5 horas.
5. Absorción y cambio de color: Las células vivas absorben el MTT a través de la membrana celular, lo que provoca un cambio de color a tonalidades moradas. Este cambio de color se debe a la conversión del MTT en cristales de formazán, un compuesto que se forma solo dentro de las células vivas y cuya acumulación indica la actividad metabólica de las mismas.
6. Desprendimiento de células: Después de 4.5 horas de incubación con MTT, las células se desprenden de la placa de cultivo y se transfieren a una placa multipocillos para su análisis mediante espectrofotometría.
7. Lectura de absorbancia: Se realiza una lectura del formazán mediante el uso de un espectrofotómetro multipocillos que emite luz entre 450-600 nm a través de la muestra. El espectrofotómetro mide la cantidad de luz que es absorbida por el formazán, que es directamente proporcional a la concentración de células vivas metabólicamente activas en la muestra. La absorbancia es una medida de la capacidad de una sustancia para absorber luz a una longitud de onda específica y se relaciona con la concentración de la sustancia en solución. Esta se cuantifica siguiendo la ley de Beer-Lambert, y se expresa mediante la ecuación (3.16):

$$Abs = -\text{Log}_{10}(T) \quad (3.16)$$

Donde:

Abs es la absorbancia.

T es la transmitancia, que representa la fracción de luz que pasa a través de la muestra.

Después de obtener las lecturas de absorbancia se suman y promedian los valores correspondientes a cada tipo de cultivo para calcular un promedio general. A continuación, se determina el porcentaje de células viables mediante la ecuación (3.17):

$$Viabilidad\ celular = \frac{\text{Promedio de absorbancia de células con US}}{\text{Promedio de absorbancia células de control}} * 100\% \quad (3.17)$$

El porcentaje derivado refleja la viabilidad de las células sometidas a US, y este cálculo se repite en todas las muestras de células cultivadas. Los pasos detallados para realizar el análisis de viabilidad celular se resumen en el diagrama de flujo de la Figura 3.5.

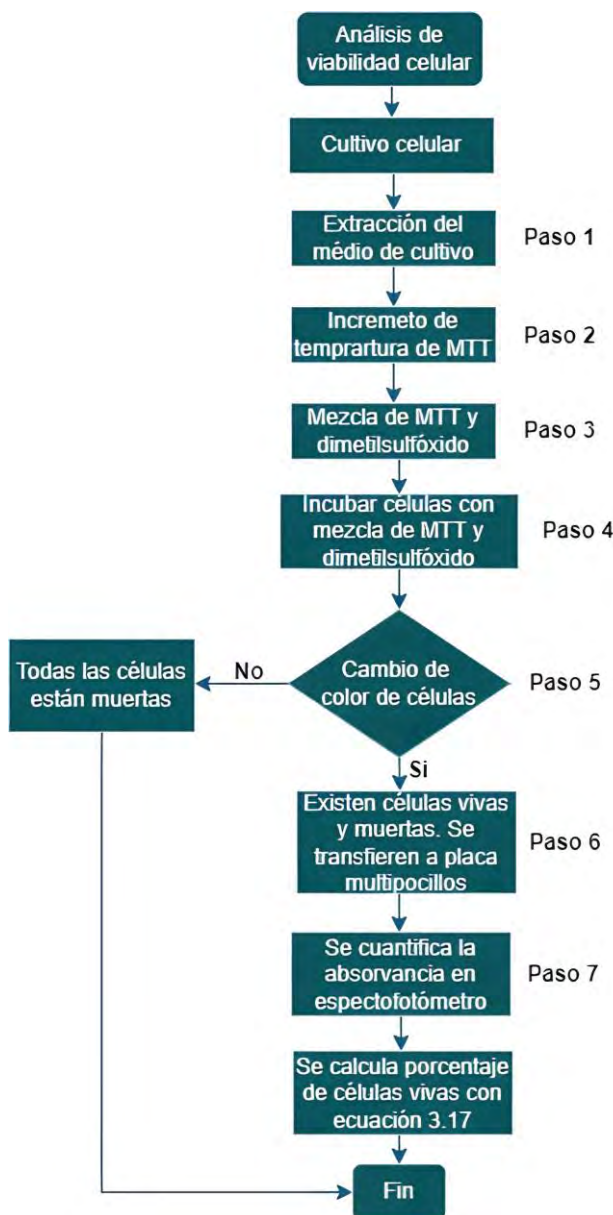


Figura 3.5. Diagrama de flujo del procedimiento para evaluar la viabilidad celular.

Capítulo 4

Análisis de elementos finitos

En la presente sección se detallan las herramientas y modelos usados en el método del elemento finito desde el modelo físico hasta el análisis y la discusión de los resultados en los modelados de células.

4.1 Modelo de elemento finito

El modelo desarrollado en este estudio incluye componentes tanto en 1D como en 3D. Los componentes en 3D comprenden el núcleo, el citoplasma y la membrana celular. En estos componentes, el núcleo se encuentra en el centro, rodeado por el citoplasma en una segunda capa, y finalmente, la membrana celular. Estos elementos se ilustran en la Figura 4.1, donde el modelo MCF-7 se presenta en la Figura 4.1a y el modelo MCF10A en la Figura 4.1b. En esta representación, el núcleo se denota en verde, el citoplasma en azul y la membrana en morado.

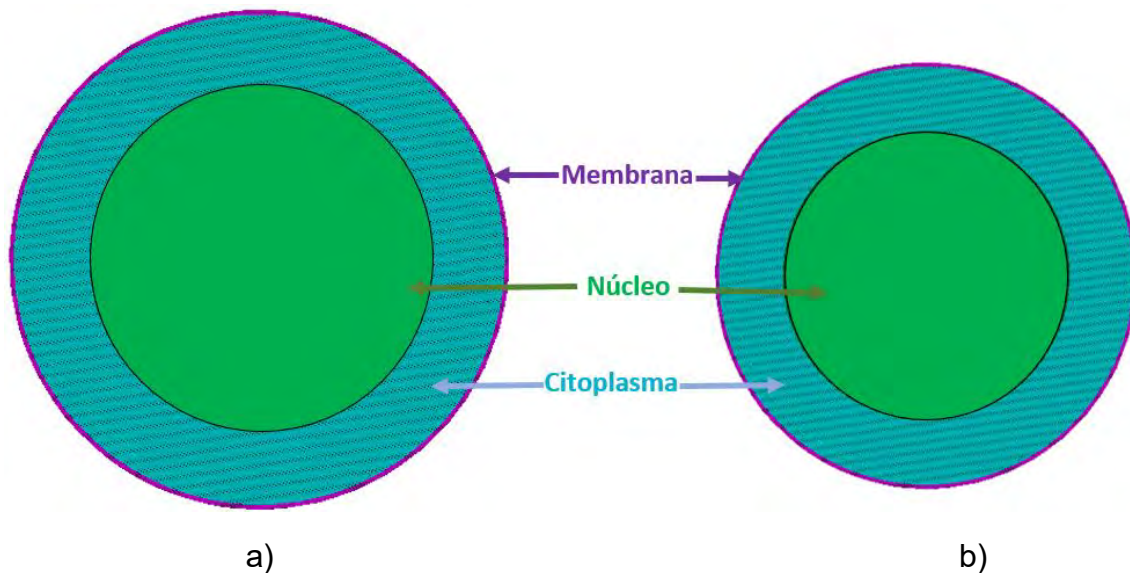


Figura 4.1. Componentes en 3D de los modelos de células: a) MCF-7 y b) MCF10A.

Se utilizó el mismo tipo de modelado para ambas células. La diferencia crucial radica en las dimensiones de los componentes celulares. Durante la transformación de una célula sana a cancerosa, se observa un incremento en el tamaño. El diámetro del

núcleo y la membrana aumentan en 4.1 y 7.7 μm , respectivamente, por su lado, el espesor del citoplasma incrementa en 1.8 μm , como se detalla en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Parámetros geométricos [16, 17].

Elementos celulares	Parámetros	MCF-7	MCF10A
Núcleo	Diámetro	12.9 μm	8.8 μm
	Volumen	1 122 μm^3	360 μm^3
Citoplasma	Espesor	2.65 μm	0.85 μm
	Diámetro interno	12.9 μm	8.8 μm
	Diámetro externo	18.2 μm	10.5 μm
Membrana	Espesor	0.2 μm	0.2 μm
	Diámetro interno	18.2 μm	10.5 μm
	Diámetro externo	18.6 μm	10.9 μm
Filamentos de Actinas	Longitud	5 750 nm	3 368 nm
	Diámetro	4.5 nm	4.5 nm
Filamentos Intermedios	Longitud	2 850	2 000 nm
	Diámetro	10 nm	10 nm
Microtúbulos	Longitud	3-16	2-8 μm
	Diámetro interno	17 nm	17 nm
	Diámetro externo	25 nm	25 nm

Por su parte, en la Figura 4.2 (en a y b), se muestra el citoesqueleto con el núcleo de las células MCF-7 y MCF10A, respectivamente. El citoesqueleto, considerado un componente en 1D, está formado por MTs, FIs y FAs. Los FAs se representan en rojo, los MTs en azul y los FIs en amarillo, como se observa en la Figura 4.2c, donde se muestra únicamente el citoesqueleto sin el núcleo.

Los componentes del citoesqueleto están conectados en nodos de color amarillo, visibles en la Figura 4.2d. Estos nodos desempeñan un papel crucial en la estructura celular, ya que representan las adhesiones focales (Adfs), que son los puntos de unión entre el citoesqueleto y la membrana celular. Además, se identifica un nodo de color negro, ubicado a una distancia de 1 μm del núcleo, el cual, representa el centrosoma celular, punto de origen de los MTs, que se extienden en su característica forma curva.

Un factor clave en la arquitectura del citoesqueleto son los MTs, que son estructuras tubulares con diámetros interno y externo constantes, pero con longitudes variables las cuales se observan en la Tabla 4.1, donde también se presentan todos los parámetros geométricos usados en este trabajo. Los MTs tienen forma pandeada debido a que se originan en el centrosoma y se extienden en forma curva alrededor del núcleo celular y a través del citoplasma hasta llegar a las adhesiones focales, donde interactúan con los otros elementos del citoesqueleto. En este trabajo los MTs se configuraron como vigas con 30 componentes para ambas líneas celulares.

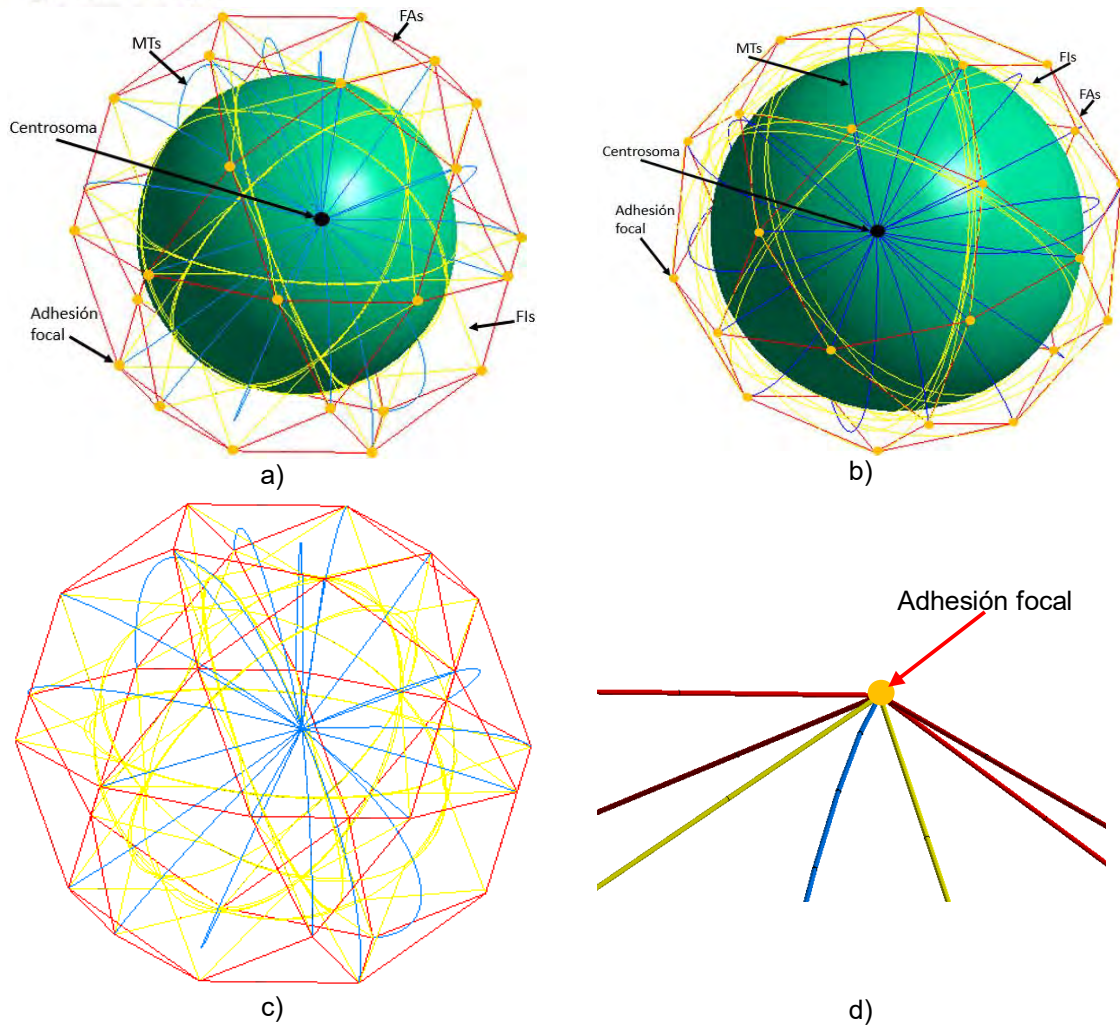


Figura 4.2. Componentes del citoesqueleto en los modelos de células: a) MCF-7, b) MCF10A, c) modelo de citoesqueleto sin núcleo y d) unión de MTs, FAs y FIs en la adhesión focal (nodo amarillo).

Por otra parte, los FIs, esenciales en el citoesqueleto se hallan distribuidos por todo el citoplasma y se conectan dos FIs en cada adhesión focal. Los FIs rodean el núcleo y cada uno de sus extremos se conectan a una adhesión focal, de esta forma el núcleo se posiciona en el centro de la célula (Figura 4.2, en a y b) [18, 19]. En este estudio los FIs se modelaron como elementos viga, 30 de ellos en cada célula y tienen interacción con una densa red de delgados FAs (Figura 4.2, en a y b) ubicada en la pared interna de la membrana celular [18, 20], y todos se conectan en la adhesión focal como se observa en la Figura 4.2 en c y d. En lo que respecta a los FAs se encargan de dar la forma esférica a las células. En este estudio los FAs se estructuraron mediante la forma geométrica del icosidodecaedro. La longitud de los FAs son las aristas del icosidodecaedro, y los vértices de la geometría son las adhesiones focales. Todos los FAs se modelaron como elementos de vigas de 60 componentes en cada modelo de célula (Figura 4.2 en a y b). Para lograr interacción complementaria de los componentes del citoesqueleto, los elementos que

representan los MTs, FIs y FAs se conectan en las aristas del icosidodecaedro (Figura 4.2, en c y d). A pesar de que en ambas células se utiliza el mismo número de MTs, FIs y FAs la distinción fundamental radica en el aumento de la longitud y diámetro de los elementos en 1D y 3D de la célula de cáncer, como se muestra en la Tabla 4.1.

4.2 Discretización de la geometría

En esta sección se presenta la discretización geométrica, o mallado, de los modelos celulares. En primer lugar, se describen los tipos de elementos de malla seleccionados para cada componente celular. A continuación, se abordan las métricas de malla, incluyendo la calidad y la relación de aspecto. Finalmente, se discute la convergencia de la malla.

4.2.1 Tipos de elementos de malla seleccionados

La selección de los tipos de elementos de malla se realizó en función de la geometría de cada componente celular. El núcleo celular fue el único componente que permitió ser mallado con elementos hexaédricos de 8 nodos. En cambio, el citoplasma y la membrana no pudieron ser mallados con elementos hexaédricos, por lo que se optó por utilizar tetraedros de 10 nodos, los cuales, ofrecen una mejor aproximación en comparación con los tetraedros de 8 nodos. Estas discretizaciones geométricas están ilustradas en la Figura 4.3 donde el núcleo se denota en verde, el citoplasma en azul y la membrana en morado. En la Figura 4.3a se presenta el modelo MCF-7 y en la Figura 4.3b el modelo MCF10A. La Figura 4.3c muestra que la malla de la célula MCF-7 tiene ocho elementos en el espesor del citoplasma y dos en el espesor de la membrana. En la Figura 4.3d se observa que la malla de la célula MCF10A cuenta con cinco elementos en el espesor del citoplasma y dos en el espesor de la membrana.

En el caso del citoesqueleto, al tratarse de componentes unidimensionales, el mallado consiste en dividirlos en segmentos pequeños. Estas divisiones se observan en la Figura 4.4. En a) se muestra la intersección de cuatro FAs en un solo punto; en b) se presenta el centrosoma, el punto de origen de todos los MTs, junto con las divisiones que se inician en dicho punto; y en c) se ilustra una sección de un FI con sus divisiones.

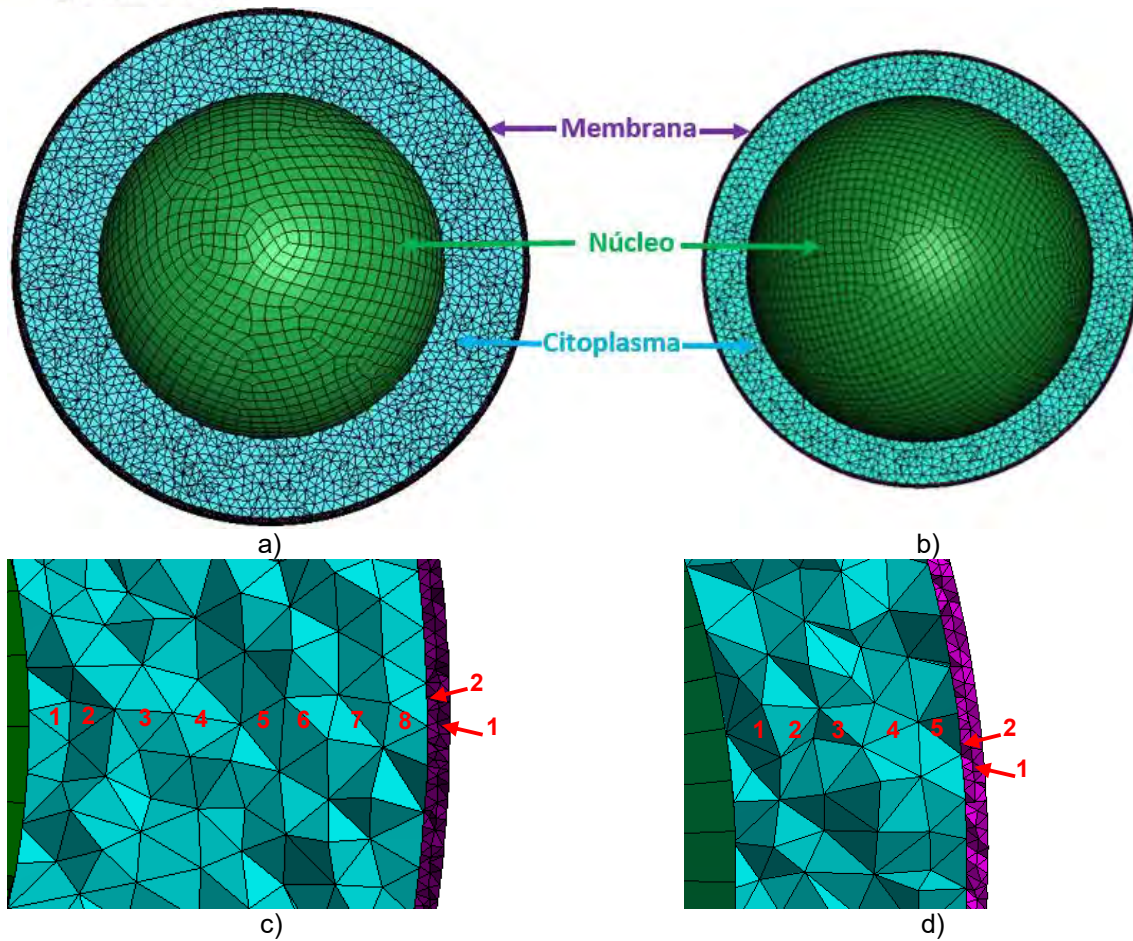


Figura 4.3. Elementos en 3D de los modelos de células: a) MCF-7, b) MCF10A, c) ocho elementos en el espesor del citoplasma y dos elementos en la membrana de célula MCF-7 y d) ocho elementos en el espesor del citoplasma y dos elementos en el espesor de la membrana de célula MCF10A.

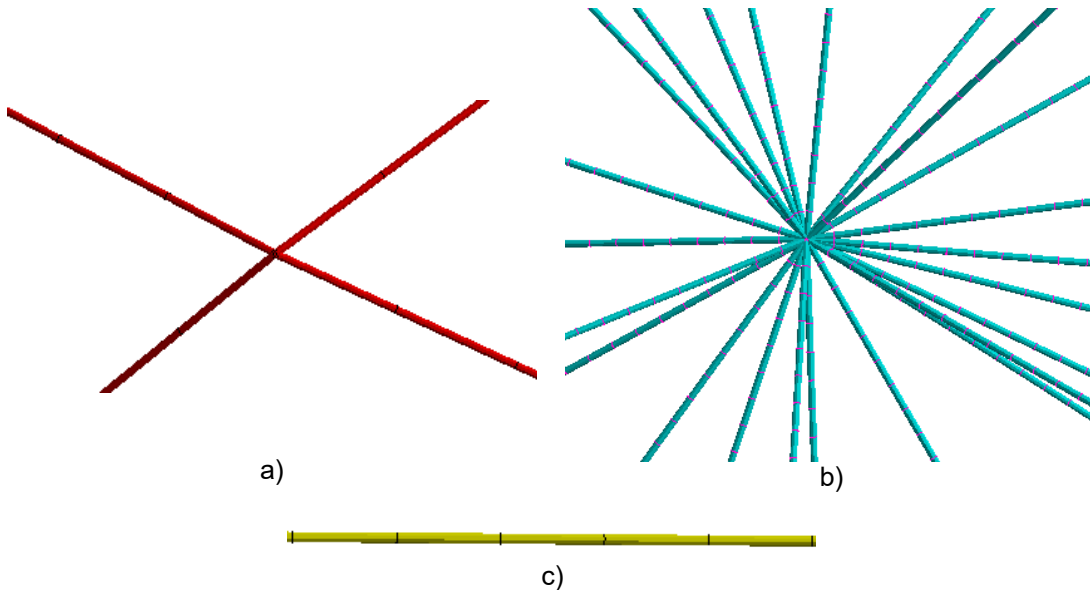


Figura 4.4. Mallado del citoesqueleto: a) unión de cuatro FAs, b) punto de origen de todos los MTs y c) sección de un FI.

4.2.2 Métricas de malla

En esta sección se presenta la calidad y relación de aspecto de la malla generada.

4.2.2.1 Calidad de malla

En la Figura 4.5 se presenta la calidad de malla de los modelos de células. En el modelo de célula MCF-7, en Figura 4.5a, la calidad de malla varía de 0.43 a 1, mientras que en el modelo de célula MCF10A, en Figura 4.5, varía de 0.23 a 1. Por lo tanto, ambos modelos cumplen con el rango de calidad aceptable de 0.2 a 1, conforme a los estándares establecidos.

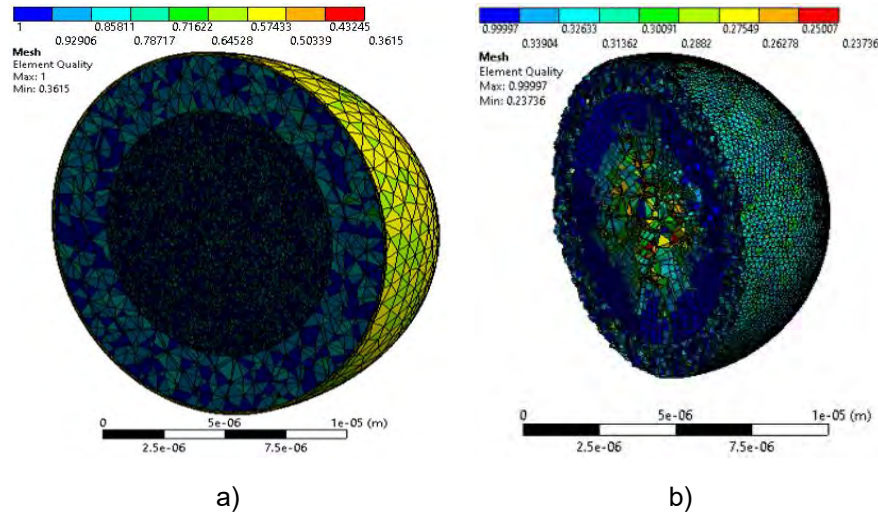


Figura 4.5. Calidad de malla de las células: a) MCF-7 y b) MCF10A.

4.2.2.2 Relación de aspecto de malla

Las relaciones de aspecto de los modelos se muestran en la Figura 4.6. En el modelo de célula MCF-7 mostrada en Figura 4.6a, la relación de aspecto varía de 1.18 a 6. Sin embargo, cualitativamente la mayoría de los elementos se encuentran en el rango de 1.18 a 2.25. En el modelo celular de MCF10A, en Figura 4.6b, la relación de aspecto varía de 1.17 a 4.94, con la mayoría de los elementos en el rango de 1.17 a 2. En ambos modelos celulares, la relación de aspecto es cercana a 1, lo que indica que las geometrías de las mallas son casi ideales.

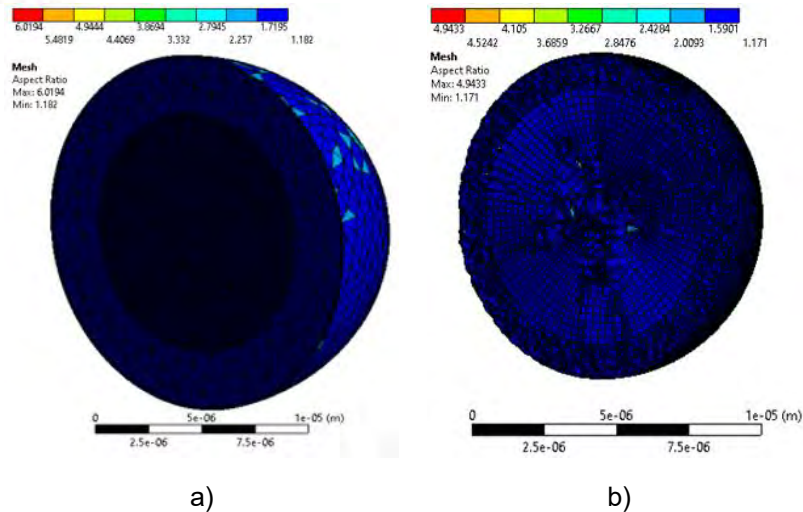


Figura 4.6. Relación de aspecto de mallado de célula: a) MCF-7 y b) MCF10A.

4.3 Contactos entre componentes celulares

En el modelo celular desarrollado se implementó un contacto sin separación en la interfaz núcleo-citoplasma. Este enfoque se justifica por la capacidad del citoplasma para moverse alrededor del núcleo mientras mantiene una conexión constante con él, sin que ocurra una separación física entre estas dos estructuras. Adicionalmente, se aplicó el mismo tipo de contacto entre el citoplasma y la membrana celular, lo que permite un movimiento relativo del citoplasma respecto a la membrana, pero ambos componentes permanecen siempre en contacto directo. Esta configuración de contacto sin separación es crucial para reflejar de manera precisa el comportamiento mecánico y biológico de la célula bajo diversas condiciones. Estos contactos se pueden observar en la Figura 4.7a.

En el caso de los MTs, FIs y FAs que se unen en las intersecciones de los componentes se implementó un contacto unido. Este tipo de contacto se seleccionó debido a que estos elementos no se separan en sus puntos de unión, al contrario: mantienen una conexión estructuralmente constante y sin movimiento relativo. La configuración de contacto unido es esencial para representar con precisión las interacciones mecánicas y la integridad estructural del citoesqueleto; de esta forma se asegura que las fuerzas y tensiones se transmitan correctamente a través de los puntos de unión sin permitir separación o deslizamiento entre los componentes. En la Figura 4.7b se observa el punto donde se implementó el contacto unido.

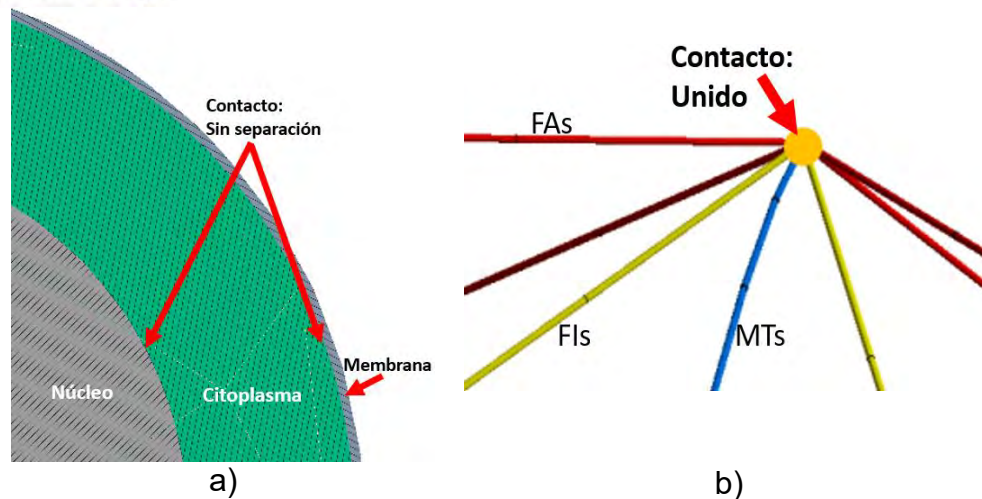


Figura 4.7. Contactos en los modelos celulares: a) Contacto sin separación en la interfaz núcleo-citoplasma y citoplasma-membrana y b) Contacto unido en la intersección de los MTs, FAs y Fls.

4.4 Convergencia de malla

Se realizó la convergencia de malla de los elementos en 3D y 1D de los modelos de las células sana y de cáncer. En el caso de la célula cancerosa, se aumentó el número de elementos de 43 696 a 404 124, mientras que, para la célula sana se incrementó de 31 288 a 331 420 elementos. Se seleccionó 377 162 elementos con 604 193 nodos para la célula cancerosa y 296 322 elementos con 596 454 nodos para la célula sana. El citoesqueleto de malla 1D consta de 8 861 elementos y 17 722 nodos para las células de cáncer, y 6 151 elementos con 12 302 nodos para las células sanas. Se seleccionaron los valores de las primeras tres frecuencias naturales para observar la variación de sus valores durante el refinamiento de malla. Dichas variaciones se presentan en la Tabla 4.2 y Tabla 4.3 para la célula de cáncer y sana, respectivamente. Se observa que, con el aumento de elementos de malla, las diferencias porcentuales de las frecuencias naturales disminuyen hasta alcanzar una diferencia porcentual de 0.2% para las células cancerosas y 0.02% para las células sanas. Esto indica que los resultados ya no dependen del tamaño de la malla.

Tabla 4.2. Convergencia de malla de célula MCF-7.

	E1= 43 696	E2= 224 784	%dif. entre E1 y E2	E3= 340 125	%dif. entre E2 y E3	E4= 377 162	%dif. entre E3 y E4	E5= 404 124	%dif. entre E4 y E5
W_{n1}(Hz)	27 246	25 645	6.2	25 249	1.5	25 163	0.34	25 121	0.2
W_{n2}(Hz)	29 887	27 698	8	27 325	1.3	27 193	0.485	27 137	0.2
W_{n3}(Hz)	31 348	29 536	6.2	29 201	1.1	28 941	0.9	28 875	0.2

E: Elementos.

W_n : Frecuencia natural.

%dif.: diferencia porcentual.

Tabla 4.3. Convergencia de malla de célula MCF10A.

	E1= 31 288	E2= 174 784	%dif. entre E1 y E2	E3= 259 434	%dif. entre E2 y E3	E4= 296 322	%dif. entre E3 y E4	E5= 331 420	%dif. entre E4 y E5
$W_{n1}(\text{Hz})$	59 755	56 001	6.8	55 701	0.53	55 630	0.12	55 620	0.02
$W_{n2}(\text{Hz})$	67 322	64 051	5.2	63 795	0.4	63 726	0.1	63 712	0.02
$W_{n3}(\text{Hz})$	70 022	67 735	3.4	67 388	0.51	67 300	0.13	67 283	0.03

E: Elementos.

W_n : Frecuencia natural.

%dif.: diferencia porcentual.

4.5 Condiciones de frontera

En este trabajo se emuló la sujeción de las líneas celulares en un tumor; en esta consideración las células de cualquier tipo se adhieren a otras células o a los componentes de la matriz extracelular a través de proteínas presentes en las adhesiones focales. Por tanto, en el modelo de elementos finitos, se consideró sujeción en las adhesiones focales que se encuentran en los 30 vértices del icosidodecaedro. Los elementos de malla en las adhesiones focales de los MTs, FAs y FIs tienen restricción en los desplazamientos, $u_x = u_y = u_z = 0$, pero se les permite rotar libremente en los mismos ejes (x, y, z) en sentido positivo y negativo, como se muestra en la Figura 4.8

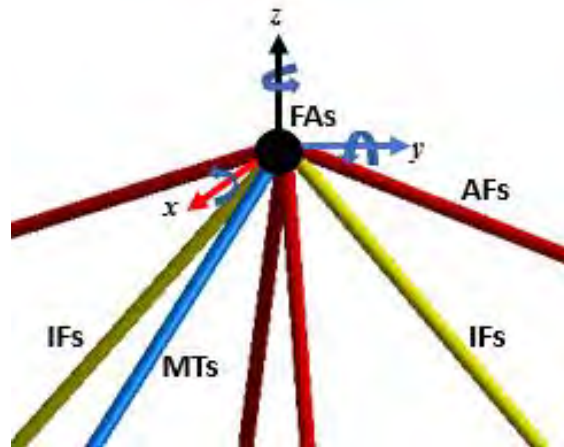


Figura 4.8. Condición de frontera en la adhesión focal (nodo negro) de las células.

4.6 Propiedades de los materiales

Las propiedades mecánicas seleccionadas son las reportadas en la literatura, en concordancia con las referencias de los estudios más recientes. En la Tabla 4.4 y Tabla 4.5 se presentan las propiedades de los elementos 3D y 1D, respectivamente. Para el análisis armónico las relaciones de amortiguamiento fueron 10, 20 y 30%.

El amortiguamiento se estableció al utilizar relaciones amortiguamiento cuyos valores fueron seleccionados con base en la variabilidad reportada en la literatura, donde se reportan valores desde el 10% hasta el 30% [17, 73, 74]. Al no existir un valor único ampliamente aceptado, se optó por considerar múltiples opciones para abarcar diferentes escenarios y evaluar su impacto en los resultados del análisis.

Es relevante destacar que se realizaron simulaciones adicionales en las cuales el módulo de elasticidad se igualó para el núcleo y el citoplasma, conforme al enfoque propuesto por Mubben et al. [16]. En estas simulaciones, se utilizaron valores de 0.15 kPa para las células cancerosas y 0.25 kPa para las células sanas. Los resultados de las frecuencias naturales obtenidas con estas propiedades mecánicas se presentan en los Anexos A, B y C.

Tabla 4.4. Propiedades mecánicas de las células [16, 17].

Elementos de la Célula	Parámetros	MCF-7	MCF10A
Núcleo	Densidad (kg/m ³)	1 300	1 300
	Módulo de elasticidad (kPa)	4.7	7
	Relación de Poisson	0.49	0.49
Membrana	Densidad (kg/m ³)	1 500	1 500
	Módulo de elasticidad (kPa)	1.125	1.1
	Relación de Poisson	0.49	0.49
Citoplasma	Densidad (kg/m ³)	1 050	1 050
	Módulo de elasticidad (kPa)	0.47	0.7
	Relación de Poisson	0.49	0.49

Tabla 4.5. Propiedades mecánicas de los elementos del citoesqueleto [17, 20, 30, 73].

Componentes	Módulo de Elasticidad (MPa)	Relación de Poisson	Densidad Kg/m ³
Microtúbulos	1 200	0.3	1 470
Filamentos de actina	2 200	0.3	1 150
Filamentos intermedios	2 000	0.3	1 400

4.7 Análisis de los resultados

En esta sección se presentan los resultados del análisis modal y armónico.

4.7.1 Resultados del análisis modal

En la Tabla 4.6 se muestran los resultados obtenidos de los modos y frecuencias naturales de ambas líneas celulares. De acuerdo con los resultados, se tiene una diferencia de 121% en el valor de la frecuencia natural de ambas células en el modo

1. Asimismo, se observa que la diferencia porcentual incrementa en promedio 5% conforme aumenta el número de modos de tal forma que en el modo 7 alcanza el 152%. Esta diferencia porcentual indica que la respuesta dinámica entre ambas estructuras es diferente.

Tabla 4.6. Frecuencias naturales (w_n) de células MCF-7 y MCF10A.

Modos	Frecuencias Naturales en Hz		Diferencia porcentual de las w_n
	MCF-7	MCF10A	
1	25 163	55 630	121
2	27 193	63 726	134
3	28 941	67 300	132
4	29 978	72 812	142
5	30 510	74 778	145
6	31 272	77 899	149
7	32 577	82 045	152

4.7.1.1 Análisis de masa efectiva de la célula de cáncer

La masa efectiva de la célula de cáncer se presenta en la Tabla 4.7, para cada frecuencia natural corresponde a una cantidad de masa movida en los ejes de movimiento "x,y,z". Destacan los modos 2 y 6 porque son los que mueven mayor cantidad de masa. En el modo 2, la masa que se desplaza en los ejes "x" e "y"; representa el 27.1 y 28.61% respectivamente; en el eje "z" el movimiento es nulo. En el modo 6, los desplazamientos son 23, 23.4 y 25% correspondientes a los ejes "x,y,z". Este último modo es el que provocar mayor desplazamiento de masa en la estructura celular del cáncer.

Tabla 4.7. Masa efectiva y porcentaje de la masa desplazada en función de las frecuencias naturales de célula MCF-7.

Modos	Frecuencias Naturales en Hz	Masa efectiva (Kg)			% de masa que se mueve		
		Eje x	Eje y	Eje z	Eje x	Eje y	Eje z
1	25 163	5.5808e-14	8.8622e-14	2.3401e-14	1.34	2.14	0.56
2	27 193	1.1241e-12	1.184e-012	1.9617e-15	27.166	28.613	0.047
3	28 941	6.7859e-13	3.6375e-13	1.6296e-12	16.4	8.79	39.38
4	29 978	4.5538e-13	5.6549e-13	7.9686e-15	11.005	13.666	0.192
5	30 510	5.8666e-14	1.4039e-13	3.9152e-13	1.417	3.392	9.46
6	31 272	9.5413e-13	9.7e-13	1.0361e-12	23.059	23.442	25.039
7	32 577	1.0611e-16	3.0197e-15	6.8727e-15	0.002	0.072	0.166

Con el fin de tomar una decisión más informada para seleccionar el modo que produce el mayor desplazamiento de masa en el sistema celular de cáncer en la se realizó una comparación del porcentaje de las masas en rotaciones. En el modo 2 se observa máxima rotación de 2.61% en el eje "x". Por otro lado, en el modo 6

se registra una rotación de 2.7% en el eje "x", pero su porcentaje máximo se encuentra en el eje "y" alcanza un valor de 9.7%.

Tabla 4.8. Porcentaje de masa en rotación en los diferentes modos de la célula MCF-7.

Modos	Frecuencias Naturales en Hz	% de masa en rotación		
		Eje x	Eje y	Eje z
1	25 163	20.303	26.314	15.224
2	27 193	2.614	1.577	0.646
3	28 941	2.739	1.877	3.849
4	29 978	9.429	19.237	52.477
5	30 510	37.971	20.35	0.142
6	31 272	2.711	9.781	0.767
7	32 577	0.073	0.007	0.018

En este análisis de rotaciones se observa que existen tres modos importantes a analizar, modo 1, 4 y 5. El modo 1 tiene rotaciones del 20.3, 26.3 y 15.2% en los ejes "x,y,z", el modo 4 con 9.4, 19.2 y 52.4% en los ejes "x,y,z" y el modo 5 con 37.9, 20.3 y 0.14% en los ejes "x,y,z" estos tres modos presentan las máximas rotaciones.

En el modo 1, Tabla 4.7, se observan los porcentajes de masa movidas los cuales son de: 1.34, 2.14 y 0.56% en los ejes "x, y, z"; modo 4: de 11,13.6 y 0.19% en los ejes "x, y, z", y el modo 5 de: 1.4, 3.3 y 9.4% en los ejes "x, y, z". El modo 1 se puede descartar como un potencial generador de perturbaciones mecánicas ya que sus desplazamientos son mínimos. Sin embargo, los modos 2, 4, 5 y 6 son los que generan mayor desplazamiento y rotación. Para conocer el mayor generador de perturbaciones mecánicas se deben realizar otros estudios como un análisis armónico.

4.7.1.2 Patrones de movimiento de célula de cáncer

En la Figura 4.9 se muestran los patrones de movimientos de manera cualitativa para los modos 1, 2 y 6. En el modo 1 (ver Figura 4.9a y d) hay movimiento en todos los elementos celulares en los ejes "x" e "y", pero el centro del núcleo permanece estático porque predomina la rotación. La membrana y el citoplasma tienen los máximos desplazamientos denotados con P1, P2, P3 y P4, ya que tienen zonas en color naranja y amarillo. Aunque existe desplazamiento es solo el 2% de la masa total, ya que, predomina la rotación y provoca la flexión del 100% del citoesqueleto en donde los FAs son los que presentan máxima flexión. En el modo 2 (Figura 4.9b y e), en el eje z, una parte de la masa celular permanece estática (representados en azul en la Figura 4.9b) debido a la influencia de los microtúbulos en la zona de color azul, los desplazamientos de la célula son en los ejes "x" e "y". El citoplasma y la membrana son los que tienen los máximo desplazamientos (P5,

P6 y P7) con color amarillo y el citoesqueleto se desplaza en dirección al eje "y" los FAs son los que en tienen máximos desplazamiento.

En el modo 6, Figura 4.9c y f, todos los componentes celulares experimentan movimientos en los ejes "x,y,z", sin embargo, nuevamente el citoplasma y la membrana son los que experimentan los máximos desplazamientos en el punto P8 de color rojo, y en los puntos P9, P10 y P12 de color amarillo. En este modo 6 el 100% del núcleo se mueve. Los FAs y FIs se flexionan un 50% de ellos, pero los MTs en el centrosoma permanecen sin movimiento. El núcleo es el que presenta menor movimiento, ya que, se encuentra en equilibrio al centro de la célula rodeada de los FIs. Además, el movimiento del núcleo está limitado por el centrosoma donde se originan todos los MTs.

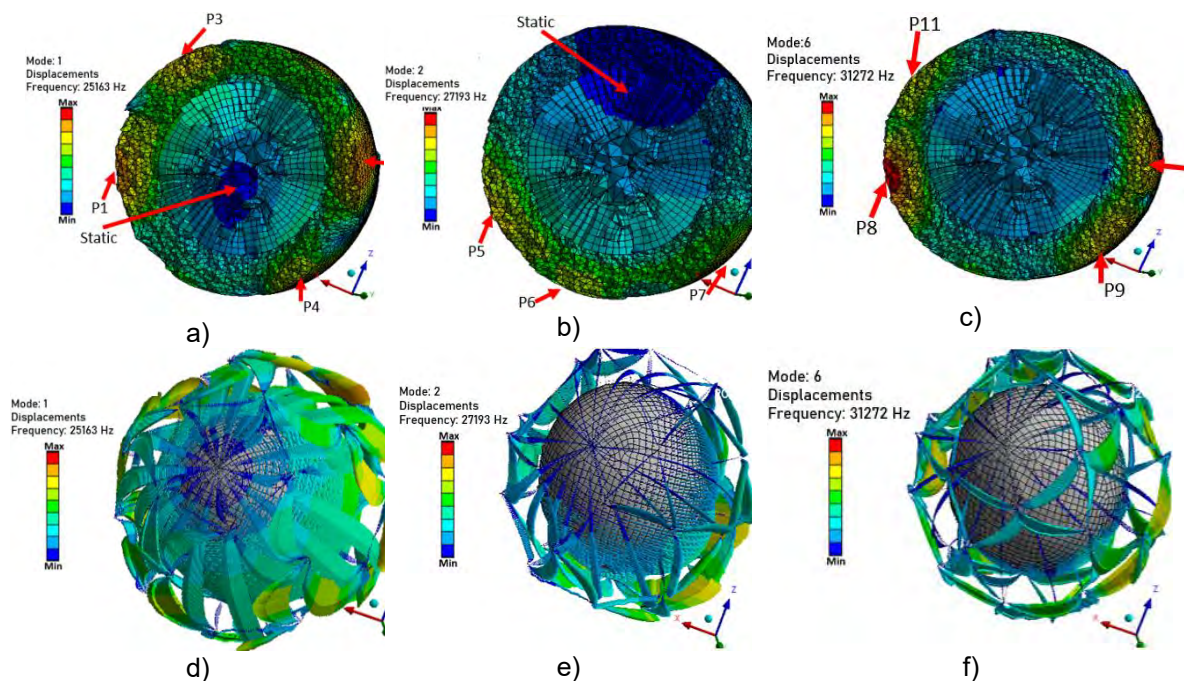


Figura 4.9. Patrones de movimiento de la célula MCF-7.

4.7.1.3 Análisis de masa efectiva de la célula sana

En la Tabla 4.9 se muestra la masa efectiva desplazada y su correspondiente porcentaje en los primeros siete modos de vibración de la célula sana. Se observa que los modos 2, 3 y 4 son los que desplazan mayor porcentaje de masa. El modo 2 en x, y, z: 11.4, 37.2 y 29.9%. En modo 3 en x, y, z: 28.6, 22.7 y 3.6%. Y modo 4 en x, y, z: 36.8, 0.5 y 4.5%. Pero, al observar la Tabla 4.10, donde se reporta el porcentaje de masa en rotación, se destaca el modo 4 que induce rotación de la masa en 2.62, 42.4 y 10.5% en los ejes x, y, z; respectivamente. Dado los grandes desplazamientos de masa en los modos 2, 3 y 4, es importante evitar excitar la célula sana en las frecuencias 63.7, 67.3 y 72.8 kHz.

Tabla 4.9. Masa efectiva y porcentaje de la masa desplazada en función de las frecuencias naturales de célula MCF10A.

Modos	Frecuencias Naturales en Hz	Masa efectiva (Kg)			% de masa que se mueve		
		Eje x	Eje y	Eje z	Eje x	Eje y	Eje z
1	55 630	2.2557e-14	8.6287e-14	1.3084e-14	2.594	9.924	1.505
2	63 726	9.9163e-14	3.2396e-13	2.6028e-13	11.406	37.262	29.937
3	67 300	2.4903e-13	1.9756e-13	3.1642e-14	28.644	22.724	3.639
4	72 812	3.2076e-13	4.8097e-15	3.9954e-14	36.894	0.553	4.595
5	74 778	7.8147e-015	3.3532e-14	3.5283e-14	0.898	3.856	4.058
6	77 899	4.2988e-14	1.0401e-13	3.1625e-13	4.944	11.963	36.375
7	82 045	4.3407e-16	9.4436e-15	1.1195e-15	0.049	1.086	0.128

Tabla 4.10. Porcentaje de masa en rotación en los diferentes modos de la célula MCF10A.

Modos	Frecuencias Naturales en Hz	% de masa en rotación		
		Eje x	Eje y	Eje z
1	55 630	22.965	17.183	5.860
2	63 726	22.816	12.56	0.025
3	67 300	5.02	2.04	15.666
4	72 812	2.625	42.41	10.574
5	74 778	22.017	0.208	29.33
6	77 899	0.0034	1.693	4.077
7	82 045	0.0007	0.004	0.889

4.7.1.4 Comparación de 45 frecuencias naturales de células

La gráfica de la Figura 4.10 representa los primeros 45 modos de ambas líneas celulares. La primera frecuencia natural de la célula cancerosa comienza en 25.2 kHz, con un incremento promedio de aproximadamente 2.51% hasta la frecuencia natural 37. Posteriormente, los incrementos son de 0.1% hasta llegar a incrementos nulos en el modo 45, donde la frecuencia natural es de 48 064 Hz. Después de este último valor, existe un intervalo de 7.56 kHz, desde 48 064 Hz hasta 55 629 Hz, en donde no hay valores de frecuencia natural de ninguna de las líneas celulares.

La primera frecuencia natural de la célula sana comienza en 55 630 Hz y se incrementa a una tasa de 4.9% hasta la frecuencia natural 16. Luego, los incrementos son del 0.7% hasta la frecuencia natural 40, y finalmente, los incrementos son de 0.1% hasta la frecuencia natural 45.

La diferencia entre las frecuencias naturales de las células cancerosas y sanas se debe principalmente a la rigidez de las propiedades mecánicas; es decir, una mayor rigidez implica frecuencias naturales de mayor magnitud. Es importante resaltar que ningún valor de las frecuencias naturales de la célula cancerosa se acerca a las frecuencias naturales que pueden generar grandes desplazamientos en la célula

sana, que son los primeros seis modos analizados en secciones anteriores. Lo cual es importante para la hipótesis de esta tesis.

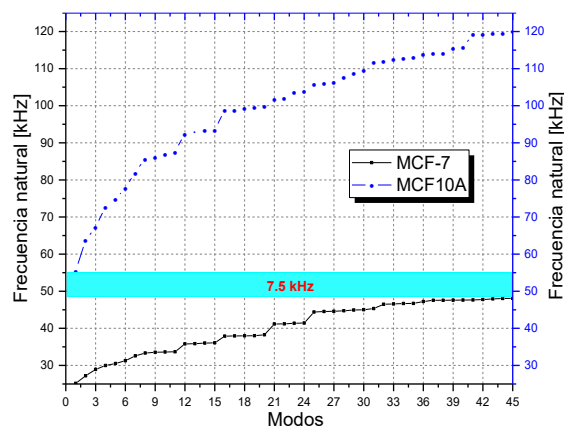


Figura 4.10. Comparación de las frecuencias naturales de células MCF-7 y MCF10A.

4.8 Análisis armónico de células

En el análisis armónico amortiguado se colocó una carga de presión de 2 567.61 kPa sobre la membrana celular que representa los efectos de la presión generada por una fuente de ultrasonido. El rango del barrido de las frecuencias forzadas fue de 5 kHz a 130 kHz, para abarcar valores inferiores a la primera frecuencia natural de la célula MCF-7 y superiores a la frecuencia natural del modo 45 de la célula MCF10A.

4.8.1 Resultados del análisis armónico amortiguado de las células

En la Figura 4.11 y Figura 4.12 se presentan las amplitudes del núcleo y la membrana, respectivamente. En núcleo MCF-7 se destaca con amplitud máxima de 8.1 μm a 31.27 kHz con amortiguamiento del 10%. Sin embargo, la amplitud disminuye a 3.9 y 1.87 μm con amortiguamientos del 20 y 30%, respectivamente. En cuanto a la membrana a 31.27 kHz sus amplitudes son de 28, 13.6 y 6.4 μm para amortiguamientos del 10, 20 y 30%.

La menor amplitud en el núcleo y membrana de la célula cancerosa es del 2.5 μm en la frecuencia de 41 kHz. Enseguida, la amplitud aumenta hasta alcanzar su máximo en la frecuencia de 47.5 kHz, con amplitudes de 2, 1 y 0.5 μm para el núcleo y de 8.3, 4.3 y 2.2 μm para la membrana; en los casos de amortiguamiento del 10, 20 y 30%, respectivamente. Después, la amplitud de la célula cancerosa disminuye gradualmente hasta volverse nula a partir de la frecuencia de 80 kHz. Por consiguiente, la frecuencia de 31.27 kHz induce la mayor perturbación en la estructura celular de cáncer.

También en la Figura 4.11 y Figura 4.12 se muestra que el núcleo de la célula sana tiene máxima amplitud con excitación forzada de 72.5 kHz que genera amplitudes

del 6.7, 3.4 y 1.9 μm en los amortiguamientos que corresponden al 10, 20 y 30%. Hay otras dos frecuencias que generan amplitudes significativas en el núcleo el primero 73.1 kHz con amplitudes de 6.5, 3.3 y 1.8 μm para los amortiguamientos del 10, 20 y 30%, respectivamente; el segundo 71.8 kHz, con amplitudes de 6, 3.4 y 1.8 μm en los mismos amortiguamientos.

La amplitud del núcleo MCF10A se anula en la frecuencia de 100 kHz, pero experimenta un nuevo incremento hasta 2.5 μm en la frecuencia de 109 kHz, luego, disminuye nuevamente la amplitud a 0.5 μm y se mantiene así hasta los 130 kHz.

En cuanto a la membrana de célula sana, se observa que presenta sus mayores amplitudes en cinco frecuencias específicas: 73.1, 77.5, 78.1, 78.7 y 107.5 kHz. Las amplitudes correspondientes con las relaciones de amortiguamiento del 10, 20 y 30% en estas frecuencias son las siguientes:

En 73.1 kHz: 12.1 μm , 6.2 μm , 3.3 μm .

En 77.5 kHz: 12.7 μm , 6.6 μm , 3.8 μm .

En 78.1 kHz: 12.8 μm , 6.9 μm , 3.8 μm .

En 78.7 kHz: 12 μm , 7 μm , 4 μm .

En 107.5 kHz: 12.3 μm , 6.62 μm , 3.6 μm .

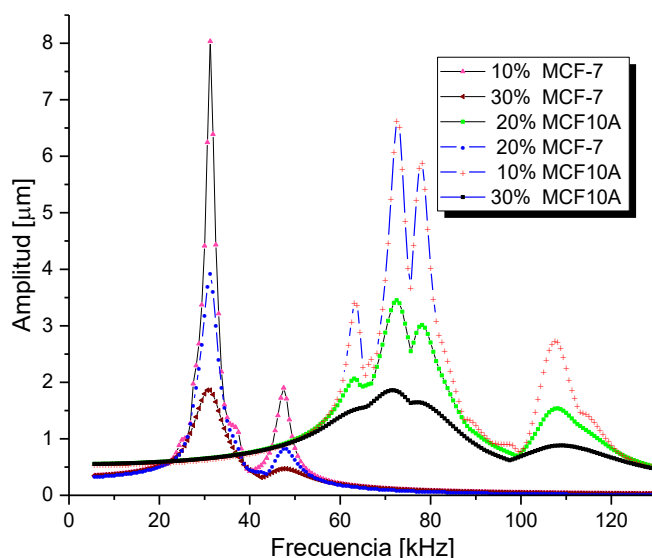


Figura 4.11. Amplitudes del núcleo de células MCF-7 y MCF10A con relación de amortiguamiento 10, 20 y 30%.

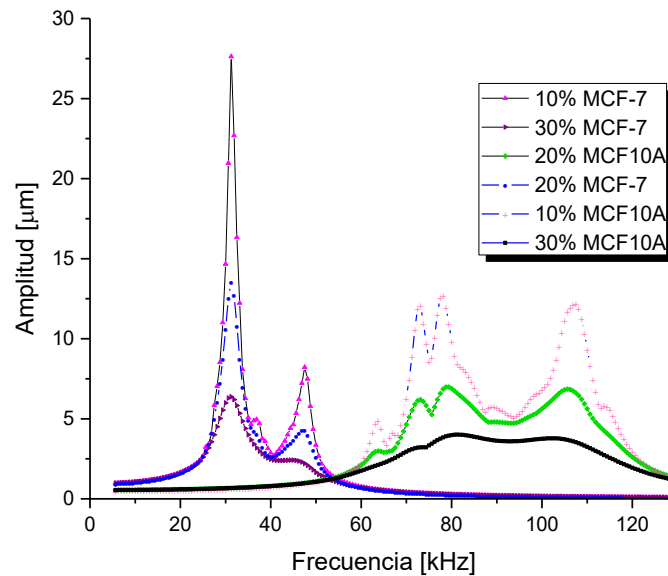


Figura 4.12. Amplitudes de la membrana de las células MCF-7 y MCF10A con relación de amortiguamiento 10, 20 y 30%.

4.9 Análisis armónico de la variación de la intensidad de US en el núcleo de célula MCF7

Se realizaron análisis armónicos amortiguados para evaluar la variación de la intensidad del US en el núcleo de las células cancerosas MCF-7. El objetivo de este análisis fue identificar las amplitudes generadas a diferentes intensidades de US y determinar la intensidad óptima que produce las máximas amplitudes para su uso en experimentos *in vitro*.

Para llevar a cabo el análisis armónico mediante el MEF se requirieron dos parámetros fundamentales. El primero es la frecuencia forzada, establecida en 31.2 kHz, identificada previamente como la que genera los máximos desplazamientos en el análisis armónico presentado en la sección 4.8. El segundo parámetro es la presión forzada proveniente de la fuente de US, la cual se introduce en el MEF en unidades de Pascales.

Dado que la intensidad del US obtenida del dispositivo de US se mide en unidades de W/cm^2 fue necesario convertir estos valores a Pascales. Este procedimiento se realizó mediante las ecuaciones 3.17 y 3.18 del capítulo 3 de este trabajo.

Para determinar la intensidad de ultrasonido óptima fue requerido iniciar las simulaciones con un valor de $1.65 W/cm^2$, basado en el trabajo de Geltmeier *et al.* [17], y se incrementó la intensidad en un 30% en cada paso hasta alcanzar un máximo de $4.6 W/cm^2$. En cada caso, la intensidad de ultrasonido fue primero convertida a nivel de presión sonora (en decibelios) y posteriormente a Pascales, tal como se muestra en la Tabla 4.11.

Tabla 4.11. Intensidades de ultrasonido empleadas en las simulaciones y su conversión a decibeles y Pascales.

	Intensidad de ultrasonido (W/cm^2)	Nivel de presión Sonora (dB)	Presión en Pascales
1	1.65	162.17	2567.61
2	2.14	163.31	2927.72
3	2.64	164.21	3247.35
4	3.10	164.96	3540.21
5	3.59	165.55	3789.04
6	4.12	166.15	4060.03
7	4.6	166.70	4325.43

Los valores de presión en Pascales obtenidos en la Tabla 4.11 se aplicaron como carga sobre la membrana celular, dado que este es el punto inicial donde se manifiesta la presión generada por el US. En todas las simulaciones la frecuencia forzada se mantuvo constante en 31.2 kHz. Esta representación física del fenómeno se ilustra en la Figura 4.13.

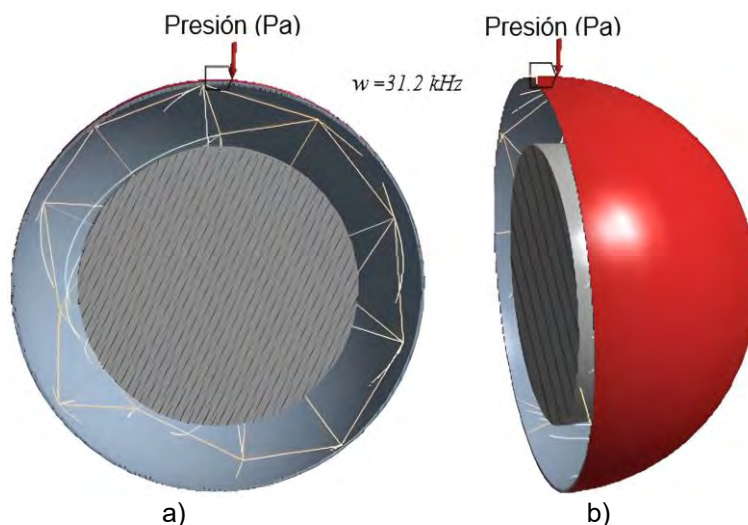


Figura 4.13. Sección transversal de la célula utilizada en el análisis armónico con una frecuencia de 31.2 kHz en donde se muestra la distribución de presión sobre la membrana celular: a) vista frontal y b) vista lateral.

La Figura 4.14 muestra las amplitudes del núcleo celular generadas bajo diferentes intensidades de US. Inicialmente, se observa una amplitud de $8.1 \mu\text{m}$ con una intensidad de $1.65 \text{ W}/\text{cm}^2$. A medida que la intensidad del ultrasonido se incrementa a 2.14, 2.64, 3.10, 3.59, 4.12 y $4.6 \text{ W}/\text{cm}^2$, las amplitudes del núcleo también aumentan hasta alcanzar valores de 10, 11.1, 12, 13, 13.8 y $14.6 \mu\text{m}$, respectivamente.

En la gráfica de la Figura 4.14 se observa una relación directa entre la intensidad del ultrasonido y la amplitud del núcleo celular. A medida que la intensidad del

ultrasonido aumenta de 1.65 W/cm^2 a 4.6 W/cm^2 , la amplitud del núcleo incrementa de $8.1 \text{ }\mu\text{m}$ a $14.6 \text{ }\mu\text{m}$. Esto indica que mayores intensidades de ultrasonido inducen desplazamientos más significativos en el núcleo, lo cual, es relevante para aplicaciones que requieren la manipulación precisa de estructuras celulares mediante ultrasonido.

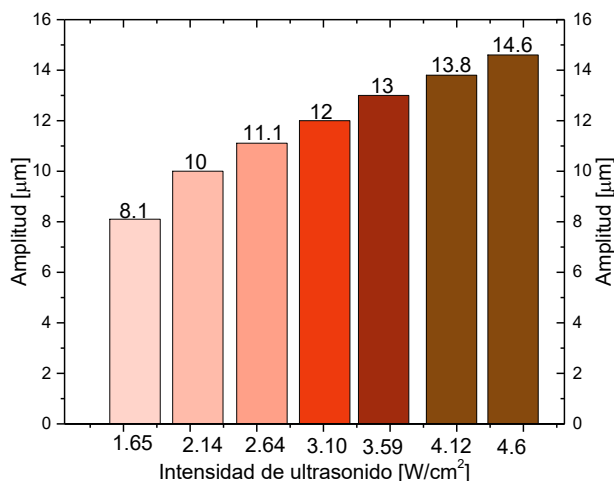


Figura 4.14. Amplitudes del núcleo celular con frecuencia forzada de 31.2 kHz con diferentes intensidades de US obtenidos del análisis armónico.

4.10 Análisis del citoesqueleto de la célula MCF-7 mediante el MEF

Se realizaron simulaciones utilizando el MEF para analizar la contribución de cada componente del citoesqueleto en la determinación de las frecuencias naturales. Los elementos del citoesqueleto considerados fueron los FAs, Fls y MTs. Estas simulaciones también incluyeron el núcleo (N), el citoplasma (C) y la membrana (M); estos tres últimos componentes celulares se denominan colectivamente como NCM. Para obtener una comprensión completa, se calcularon las frecuencias naturales para cuatro modelos celulares distintos.

1. M1: **NCM**
2. M2: **NCM + FAs**
3. M3: **NCM + Fls**
4. M4: **NCM + MTs**

Las condiciones de frontera para los modelos M2 a M4 son las mismas que las presentadas en la sección 4.5, dado que estos modelos incluyen el citoesqueleto. Las condiciones de frontera para el modelo M1 se ilustran en la Figura 4.15, donde se destacan dos áreas de color rojo de $5 \text{ }\mu\text{m}$ de diámetro. Estas áreas representan los puntos de sujeción celular, formados por la interacción célula-célula. En cuanto al número de elementos de malla para todos los componentes de los modelos M1

a M4 se utilizaron los mismos valores establecidos en la convergencia de malla de la Tabla 4.2.

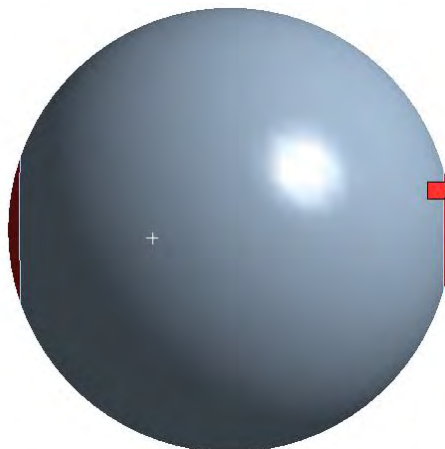


Figura 4.15. Condiciones de frontera del modelo NCM. Las áreas en rojo representan los puntos de sujeción debidos al contacto entre células.

En la Figura 4.16a se presenta el modelo NCM. En la Figura 4.16b, se ilustra el modelo NCM + Fls, donde solo son visibles el núcleo y la membrana, ya que los Fls son muy delgados en comparación con el NCM. En la Figura 4.16c, se exhibe el modelo NCM + FAs, en el que solo se visualizan el núcleo y los filamentos de actina. Finalmente, en la Figura 4.16d se representa el modelo NCM + MTs, en el que únicamente son visibles el núcleo y los microtúbulos.

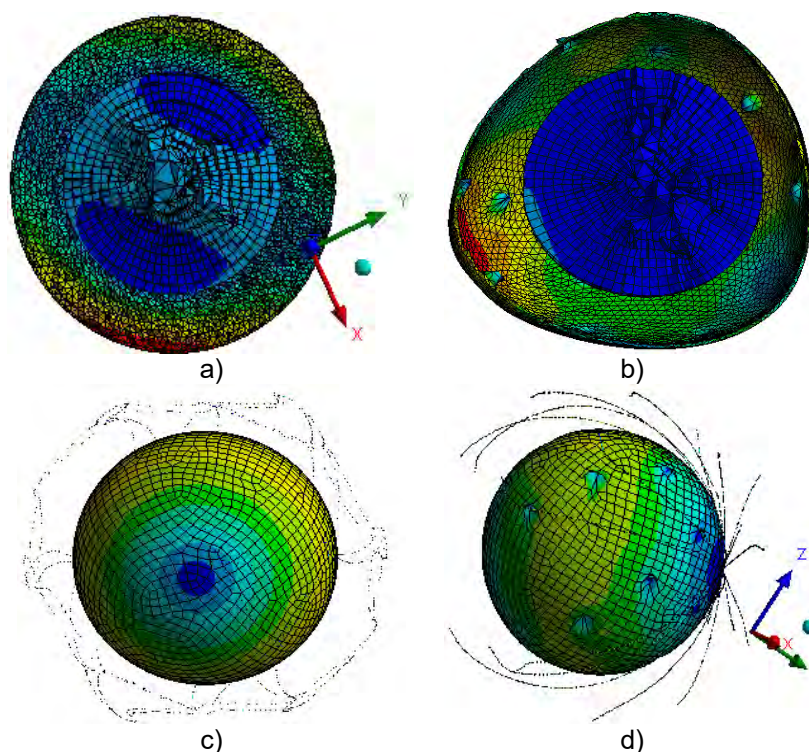


Figura 4.16. Modelos celulares: a) NCM, b) NCM + Fls, c) NCM + Fas y d) NCM + MTs.

Los resultados de las primeras siete frecuencias naturales de los cuatro modelos se detallan en la Tabla 4.12. Se observa que el modelo NCM muestra frecuencias naturales en el rango de 5 796.9 Hz a 23 183 Hz. Este rango de frecuencias naturales es el menor de todos los modelos, lo cual, es coherente debido a su menor rigidez.

Al integrar los FIs al modelo NCM, las dos primeras frecuencias naturales aumentan un 70%, mientras que del tercer al séptimo lugar el incremento promedio es del 30%. Cuando se añaden los FAs al modelo NCM se registra un aumento del 103% en las dos primeras frecuencias naturales y un promedio del 65% en las frecuencias del tercero al séptimo lugar.

Por último, la inclusión de los MTs en el modelo NCM muestra un incremento del 240% en la primera frecuencia natural y del 276% en la segunda, mientras que el promedio de incremento en las demás frecuencias naturales es del 150%. Por lo tanto, de los tres componentes del citoesqueleto, se destaca que los MTs incrementan las frecuencias naturales en el mayor porcentaje, mientras que los FIs aportan en menor medida al aumento de las frecuencias naturales.

Tabla 4.12. Frecuencias naturales de los modelos celulares M1, M2, M3 y M4.

Frec. natural	NCM (M1)	NCM+ FIs (M2)	%error entre M1 y M2	NCM + FAs (M3)	%error entre M1 y M3	NCM + MTs (M4)	%error entre M1+M4	Completo
w1	5796.9	9726.1	70	11777	103	19709	240	25163
w2	5813.4	9882.2	70	11797	103	21907	276	27193
w3	9200.1	10015	9	11807	29	25124	173	28941
w4	10086	13812	37	18650	84	27706	174	29978
w5	10090	14272	42	18653	84	28757	185	30510
w6	10706	14514	36	18709	75	29338	174	31272
w7	23183	25246	9	31552	37	31673	37	32577

La Figura 4.17 muestra la comparación de 45 frecuencias naturales entre los modelos M1, M2, M3, M4 y el modelo completo de la célula cancerosa. El modelo completo incluye el NCM y los tres componentes del citoesqueleto. En esta comparativa, se evidencia nuevamente que los MTs son los responsables del mayor aumento en la magnitud de las frecuencias naturales. A partir de la séptima frecuencia natural, el modelo NCM + MTs supera la magnitud de la frecuencia natural del modelo completo en un rango de entre 5 y 10%.

En contraste, el modelo NCM + FAs nunca supera las frecuencias naturales del modelo completo. Entre la novena y la cuadragésima quinta frecuencia se mantiene una diferencia en la frecuencia natural entre 2 y 5%, siempre con valores inferiores en el modelo NCM + FAs. Por su parte, los modelos NCM y NCM + FIs mantienen una diferencia porcentual constante con respecto al modelo completo entre 8 y 31%, sin llegar a alcanzarlo en ningún modo.

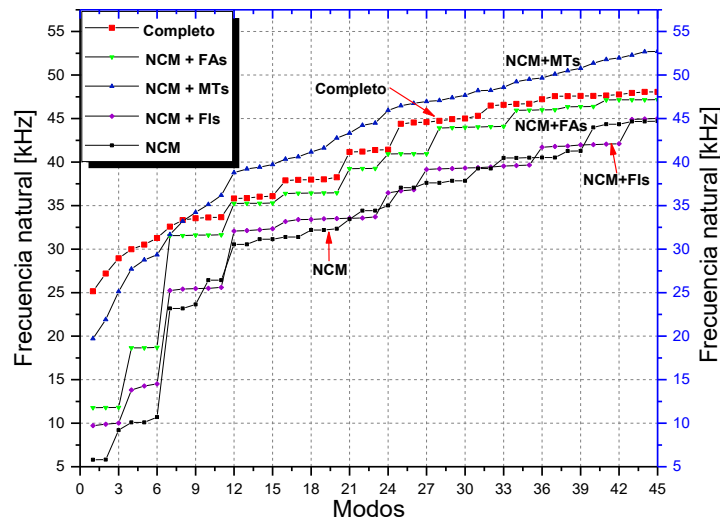


Figura 4.17. Comparación de las frecuencias naturales de los modelos celulares M1, M2, M3, y M4 con el modelo completo.

Es importante resaltar que el modelo NCM desarrollado en este estudio presenta similitudes con el modelo propuesto por Mubeen *et al.* [16], ya que ambos consideran las estructuras del núcleo, citoplasma y membrana celular. No obstante, se identifican dos diferencias fundamentales entre los modelos: las condiciones de frontera y los contactos, aspectos que no están explícitamente detallados en el trabajo de Mubeen *et al.* [16].

A pesar de estas discrepancias, en la Tabla 4.13 se presentan las primeras cuatro frecuencias naturales obtenidas por Mubeen *et al.* [16], junto con una comparación de los resultados obtenidos en el presente estudio, y la diferencia porcentual correspondiente. Las dos primeras frecuencias naturales presentan diferencias porcentuales de 0.5% y 0.25%, respectivamente. Sin embargo, para la tercera y cuarta frecuencia natural, la diferencia porcentual se incrementa a 5.5% y 7.2%. Estos últimos valores pueden atribuirse a las discrepancias entre ambos modelos. No obstante, dichas diferencias porcentuales no son significativas, lo que sugiere que los resultados obtenidos en este estudio son consistentes con los reportados en la literatura.

Tabla 4.13. Valores de las primeras cuatro frecuencias naturales entre el trabajo de Mubeen *et al.* [16] y el presente trabajo.

Frec. natural	Mubeen et al. [2]	Presente trabajo	%error
w_1	5 768	5 796.9	0.50
w_2	5 799	5 813.4	0.25
w_3	8 718	9 200.1	5.53
w_4	9 406	1 0086	7.23

4.11 Discusión de los resultados

Los resultados del análisis modal revelan que todas las frecuencias naturales de ambas líneas celulares presentan diferencias porcentuales mínimas del 121%. Este análisis permitió identificar las frecuencias naturales que generan los máximos desplazamientos de masa en las células MCF-7, las cuales son 27.19, 29.97, 30.51 y 31.27 kHz, mientras que en las células MCF10A son 63.7, 67.3 y 72.8 kHz. Sin embargo, es importante destacar que el análisis modal no cuantifica los desplazamientos exactos. Para obtener estos valores, se recurrió al análisis armónico amortiguado y fueron consideradas las relaciones de amortiguamiento del 10, 20 y 30%.

En el caso de las células MCF-7, destacan tres frecuencias que generan las mayores amplitudes: en primer lugar, 31.27 kHz, que produce amplitudes de 8.1, 3.9 y 1.87 μm en el núcleo, y de 28, 13.6 y 6.4 μm en la membrana; en segundo lugar, 31.9 kHz, con amplitudes de 6.4, 3.6 y 1.7 μm en el núcleo, y de 22.6, 12.7 y 6.2 μm en la membrana; y en tercer lugar, 30.6 kHz, que genera amplitudes de 6.2, 3.7 y 1.86 μm en el núcleo, y de 21, 12.5 y 6.2 μm en la membrana para los amortiguamientos del 10, 20 y 30%, respectivamente.

Estos resultados evidencian una concordancia entre el análisis armónico amortiguado y el análisis modal, debido a que los patrones cualitativos de movimiento obtenidos mediante el análisis modal muestran que el modo 6 exhibe desplazamientos en todos los componentes de la célula cancerosa. Al mismo tiempo, en el análisis armónico, el modo 6 es el responsable de las máximas amplitudes observadas. Esta coincidencia en los modos de vibración y en las amplitudes máximas en ambos análisis respalda la consistencia entre los dos enfoques de modelado, con ello se corrobora que el modo 6 es crítico en la dinámica de la célula cancerosa. Es relevante mencionar que, en las frecuencias donde el núcleo y la membrana de la célula cancerosa alcanzan resonancia o máximas amplitudes, las células sanas muestran amplitudes mínimas: oscilan entre 0.55 y 0.91 μm en el núcleo, y entre 0.55 y 1 μm en la membrana. Dado que el diámetro del núcleo y la membrana de las células sanas es de 8.8 y 11 μm , respectivamente; este rango de amplitudes no resulta en resonancia para las células sanas.

Otro hallazgo significativo en la investigación numérica es que la frecuencia natural no es el único parámetro a considerar para la fuente de US. El segundo parámetro crucial es la intensidad del US, ya que, aunque se utilice la frecuencia de excitación adecuada, una baja intensidad, como 1.65 W/cm², solo genera pequeñas amplitudes de 8.6 μm . En contraste, al utilizar intensidades mayores, como 4.6 W/cm², se pueden alcanzar amplitudes de hasta 14.6 μm .

Finalmente, se observó que, de los tres componentes principales del citoesqueleto, los MTs son los responsables de aportar la mayor rigidez y masa: contribuyen de manera significativa a las frecuencias naturales. Los FAs ocupan el segundo lugar en esta contribución, seguidos por los FIs.

Capítulo 5

Estudio experimental

En este apartado se detalla el desarrollo del estudio experimental, el cual comprende desde la construcción del sistema de ultrasonido hasta la aplicación de la radiación de ultrasonido a las células objeto de estudio.

5.1 Desarrollo del sistema de ultrasonido

En esta sección se describen los elementos clave del sistema de US para el experimento. Se detallan tanto los componentes utilizados como su configuración para alcanzar los parámetros de intensidad y frecuencia requeridos.

A continuación, se detallan los componentes principales del sistema de ultrasonido utilizados para llevar a cabo el experimento:

- 1. Generador de señales.** Marca GW Instek modelo SFG-1013. Es capaz de generar señales desde 10 Hz hasta 3 MHz, Figura 5.1a.
- 2. Fuente de voltaje.** Fuente con un máximo de 24 V, Figura 5.1b.
- 3. Transductor ultrasónico.** Marca Kemo, con geometría circular de 4 cm de diámetro. Funciona continuamente durante 5 horas con un máximo de 24 V y opera en el rango de frecuencias de 2 a 35 kHz, Figura 5.1c.
- 4. Osciloscopio.** Se usó osciloscopio UNI-T modelo UT 81B, Figura 5.1d.
- 5. Multímetro.** Marca Steren y modelo 602-270, Figura 5.1e.
- 6. Placa para soldar circuito,** Figura 5.1f.

En la Figura 5.1 se presentan los componentes utilizados en el sistema de ultrasonido, diseñados para alcanzar una intensidad de 4.6 W/cm^2 a una frecuencia de 31.2 kHz. Según los resultados obtenidos mediante el análisis MEF descrito en el capítulo 4, esta configuración permitió generar una amplitud de $14.6 \mu\text{m}$ en el núcleo celular. Para lograr estos parámetros, se diseñó un circuito de control de potencia, esencial para mantener la intensidad ultrasónica constante en 4.6 W/cm^2 . En lo que respecta a la frecuencia de 31.2 kHz, esta fue suministrada de manera estable por el generador de señales.

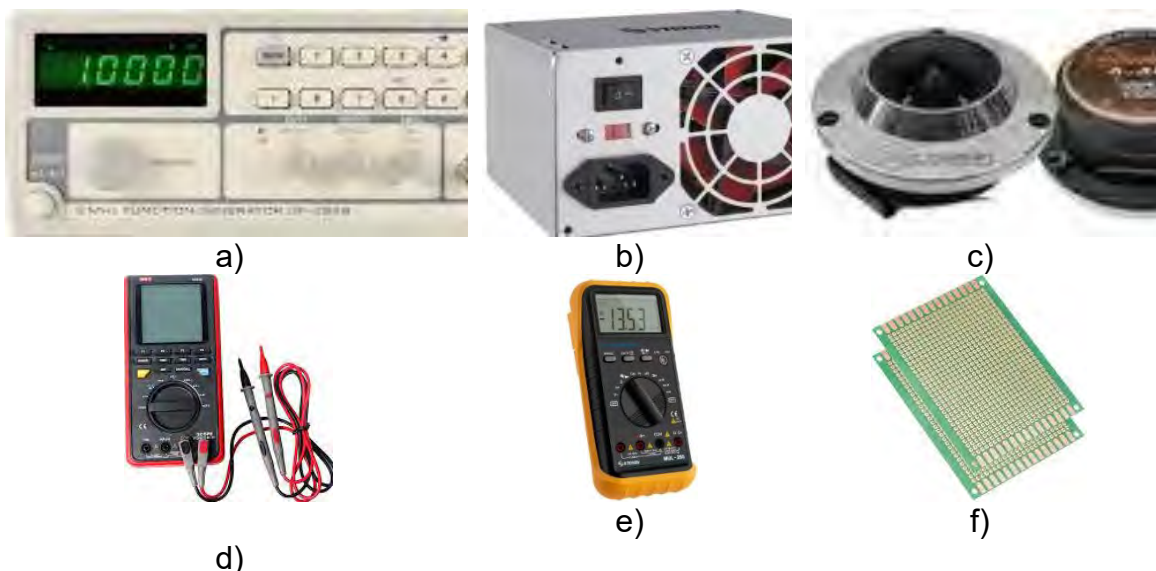


Figura 5.1 Componentes utilizados en el desarrollo del sistema ultrasónico: a) generador de señales, b) fuente de voltaje, c) transductor ultrasónico, d) osciloscopio, e) multímetro y f) placas de circuito impreso.

En el Anexo D se presentan los componentes electrónicos utilizados en el diseño del circuito de control de potencia, junto con el plano electrónico y la simulación realizada para verificar su correcto funcionamiento.

5.2 Cultivo celular

Las células de la línea celular MCF10A, derivadas del epitelio mamario no tumoral, y las células MCF-7, correspondientes a un modelo de cáncer de mama, se cultivaron en medio Gibco™ DMEM/F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 10 µg/ml de insulina, 0.5 µg/ml de hidrocortisona, 20 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico recombinante (EGF) y 1% de antibióticos. La Figura 5.2a muestra las placas con el cultivo celular y el medio de cultivo. Las células se cultivaron en placas de la marca Corning, con un diámetro de 4 cm, ver Figura 5.2b, bajo condiciones de 5% de CO₂ y 95% de oxígeno a 37 °C, parámetros controlados por una incubadora celular ilustrada en la Figura 5.2c. Se sembraron un total de 500 000 células para cada línea celular.

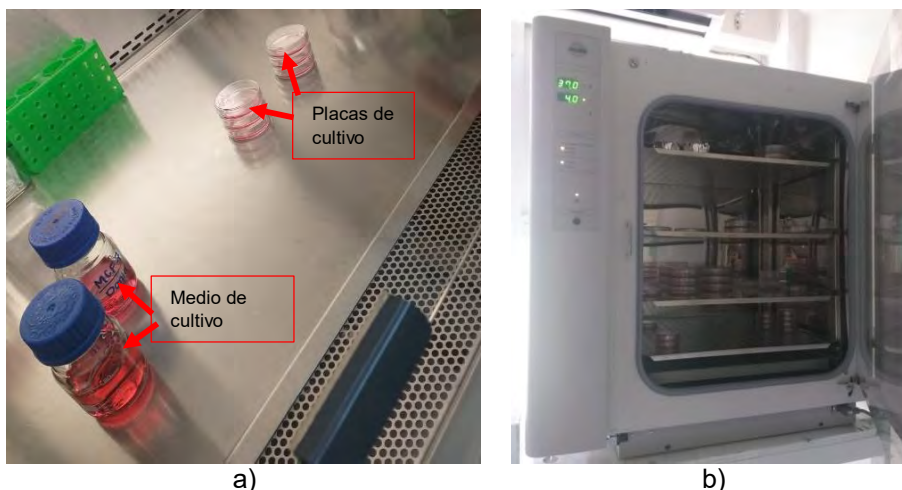


Figura 5.2. Cultivo celular: a) medio y placas de cultivo y b) incubadora de células.

Durante el experimento se manipularon los cultivos celulares en condiciones completamente estériles dentro de una campana de flujo laminar, visible en la Figura 5.3. Para la eliminación de residuos de los cultivos celulares, se siguió la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, la cual, establece la clasificación y especificaciones de manejo de los Residuos Peligrosos Biológicos Infecciosos (RPBI).

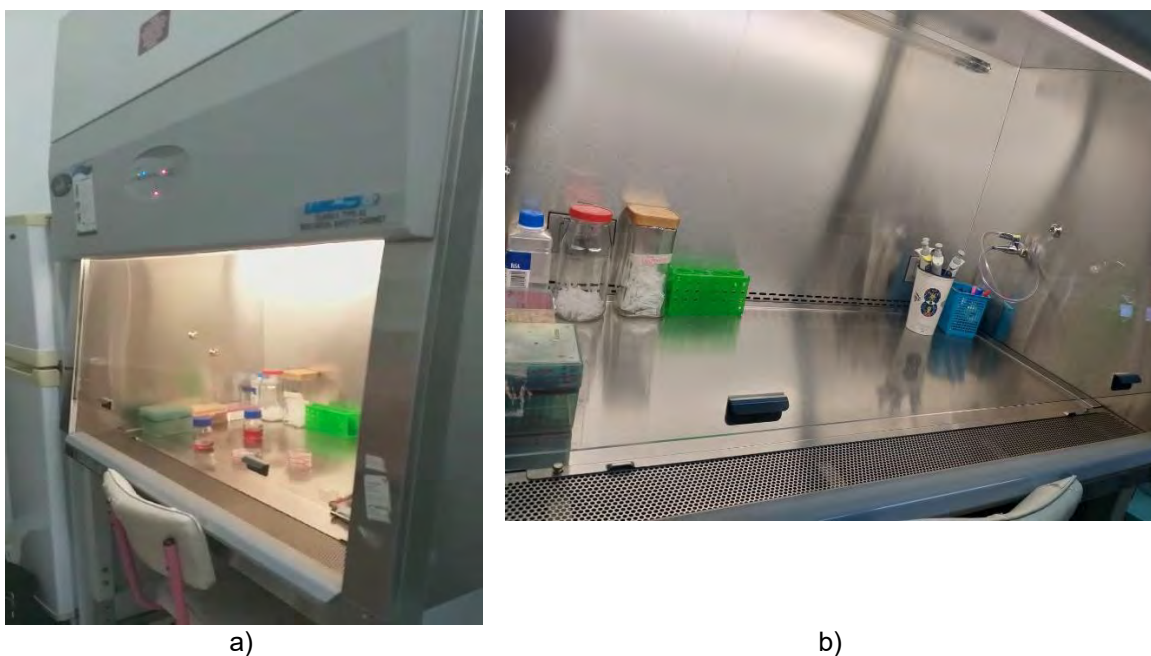


Figura 5.3. Campana de flujo laminar: a) estructura externa y b) espacio de trabajo.

Se realizó un monitoreo del crecimiento celular durante un período de 72 horas previo a la estimulación con US. Durante este intervalo, el medio de cultivo se reemplazó cada 24 horas para reponer los nutrientes consumidos por las células. La Figura 5.4 ilustra el seguimiento del crecimiento celular a lo largo de las 72 horas. Las células MCF-7 y MCF10A mostraron una respuesta favorable al medio de cultivo, evidenciada por un crecimiento continuo en ambas poblaciones cultivadas

en las placas. La adecuada absorción de nutrientes por ambas líneas celulares dio lugar a un aumento significativo en su población.

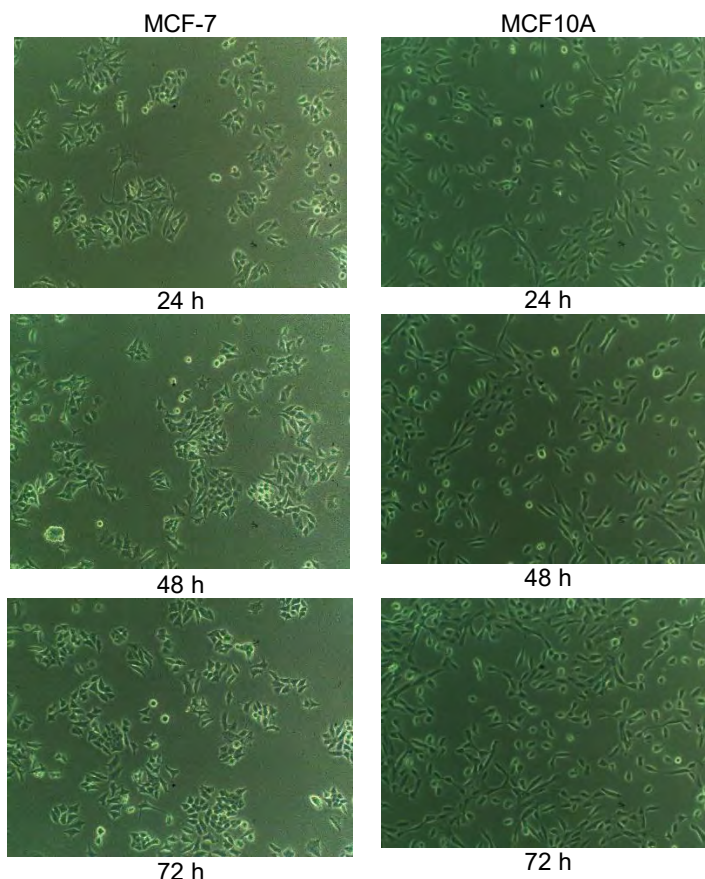


Figura 5.4. Evolución del cultivo celular en 24, 48 y 72 horas.

5.3 Procesos de radiación con ultrasonido

5.3.1 Configuración de los componentes experimentales

El experimento con US en las células se llevó a cabo mediante el procedimiento detallado en la Figura 5.5:

- a) Se realizó la conexión del generador de señales y la fuente de voltaje al control de potencia, ver Figura 5.5d.
- b) Se organizó el cableado correspondiente de los componentes electrónicos y se fijó el transductor sobre una base de madera, tal como se ilustra en la Figura 5.5a.
- c) La placa de cultivo se posicionó sobre el transductor; de esta forma se aseguró un contacto directo entre ambas superficies. Para permitir la transferencia de las ondas ultrasónicas se aplicó un gel en la interfaz placa-transductor. El tipo de gel utilizado se muestra en la Figura 5.5b.
- d) Se integró una cámara al microscopio para capturar imágenes previas y posteriores a la exposición al ultrasonido. Estas imágenes se almacenaron en una laptop para un análisis posterior. Se programó un seguimiento a las 24, 48 y 72

horas para evaluar los cambios y efectos celulares, como se indica en la Figura 5.5c.

Es importante señalar que, antes de la exposición de las células al ultrasonido, se verificó el correcto funcionamiento del control de potencia eléctrica y se aseguró la coherencia entre la señal de salida del transductor y la generada por el generador de señales. Esta verificación garantizó una transmisión precisa y consistente de las ondas ultrasónicas.

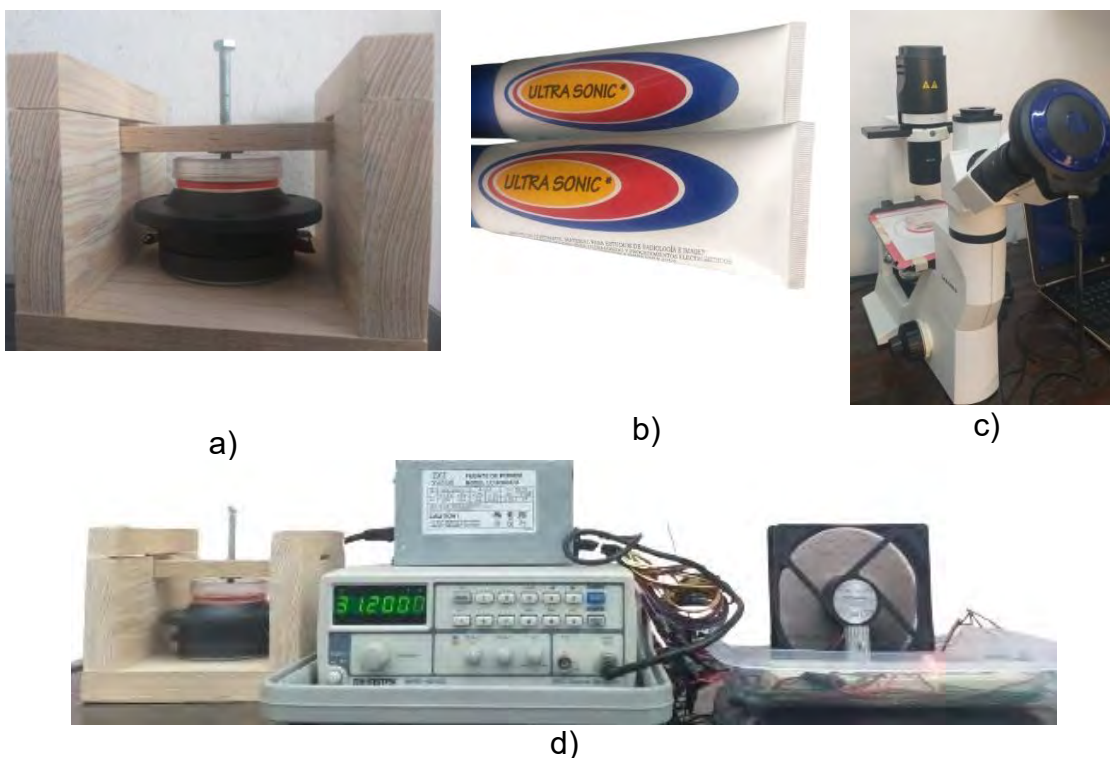


Figura 5.5. Componentes del equipo experimental: a) transductor, estructura para el cultivo celular y base de madera para estabilización, b) gel ultrasónico, c) microscopio con cámara conectado a una computadora y d) conexión integral del generador de señales, fuente de voltaje, circuito de control y transductor con el cultivo.

5.3.2 Parámetros de ultrasonido y cultivos celulares

En este estudio, se investigaron dos frecuencias ultrasónicas: 31.2 y 11.2 kHz. Para la frecuencia de 31.2 kHz, las células fueron expuestas durante 18 minutos, y se analizaron ambas líneas celulares en intervalos de 24, 48 y 72 horas, con un total de 12 cultivos. Adicionalmente, se expusieron las células a 31.2 kHz durante 35 minutos, analizados a las 24 y 48 horas; se empleó un total de 8 cultivos. En cuanto a la frecuencia de 11.2 kHz, el análisis se llevó a cabo a las 24 horas con 4 cultivos empleados. En total, el trabajo experimental de este proyecto incluyó 24 cultivos.

5.4 Análisis de viabilidad celular

Después de la exposición a US, las células se incubaron nuevamente y luego se extrajeron para analizar el porcentaje de células vivas y muertas. En este estudio se empleó el método MTT, cuya metodología se implementó de la siguiente manera:

Paso 1. Preparación de células: Las células de control y las expuestas al US se retiraron de la incubadora y se transfirieron a una campana de flujo laminar. Ahí, se procedió a la extracción del medio de cultivo con agujas y una bomba de succión, como se muestran los elementos representados en la Figura 5.6a y Figura 5.6b.

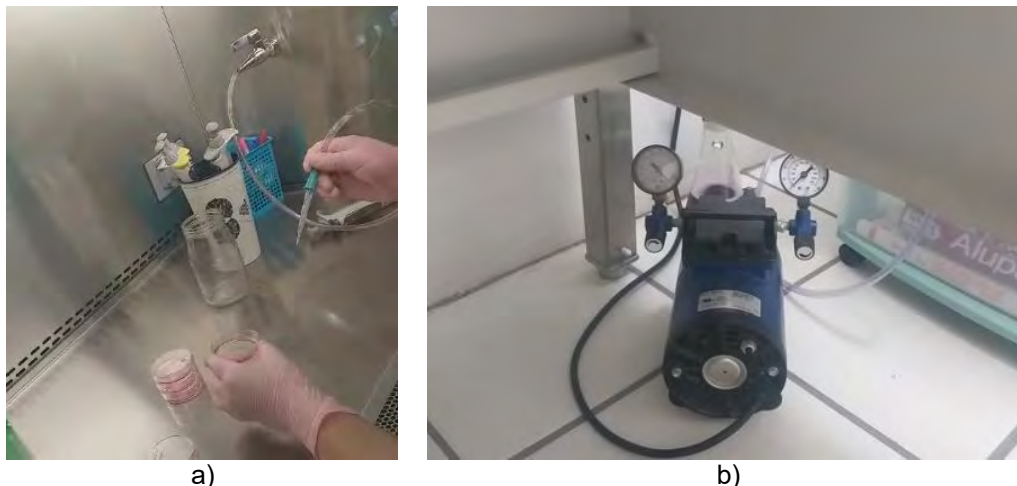


Figura 5.6. Extracción y eliminación del medio de cultivo: a) aguja utilizada para extraer el medio de cultivo celular y b) bomba de succión empleada para desechar el cultivo celular.

Paso 2. Preparación del compuesto MTT: El compuesto MTT, previamente almacenado en el refrigerador a -10°C , se retiró y se calentó a 37°C con un baño de agua destilada. La Figura 5.7 ilustra el compuesto MTT y el recipiente con agua destilada utilizados en este procedimiento.



Figura 5.7. Compuesto MTT y contenedor con agua destilada.

Paso 3. Mezcla del compuesto MTT: Se mezcló 2 ml del compuesto MTT con 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), ver Figura 5.8a, para facilitar la absorción del MTT a través de las membranas celulares. Esta manipulación se realizó en condiciones de oscuridad para prevenir cualquier alteración del compuesto MTT, como se muestra en la Figura 5.8b.

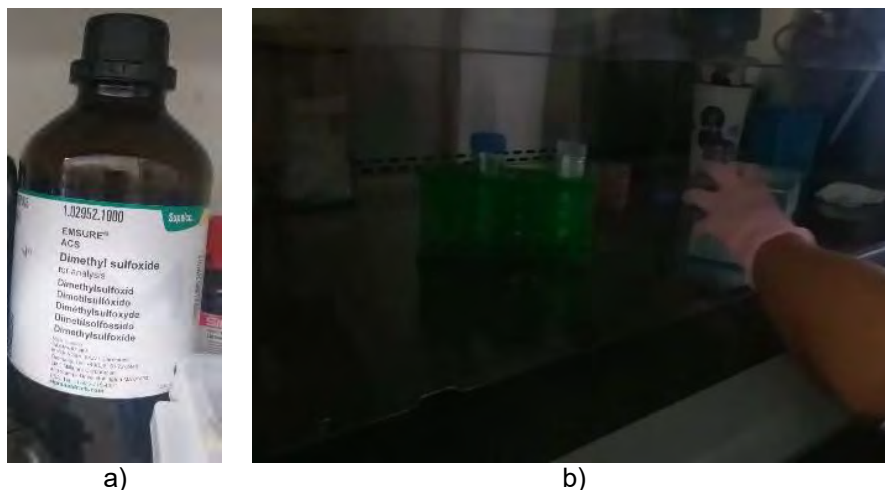


Figura 5.8. Preparación del compuesto: a) dimetilsulfóxido y b) mezcla de dimetilsulfóxido y compuesto MTT en una campana de flujo laminar en oscuridad para evitar posibles alteraciones en la mezcla.

Paso 4. Incubación con MTT: Se reemplazó el medio de cultivo celular por una solución de compuesto MTT y dimetilsulfóxido, con 3 ml de esta mezcla a cada cultivo celular. Posteriormente, se cubrieron las muestras con papel aluminio para resguardarlas de la luz y se incubaron nuevamente durante un periodo de 4 a 5 horas, ver Figura 5.9.



Figura 5.9. Proceso de aplicación del ensayo MTT: a) adición del compuesto MTT a las células en cultivo, y b) protección de los cultivos con papel aluminio post-aplicación para evitar la fotosensibilidad.

Paso 5. Absorción y cambio de color: El compuesto MTT fue absorbida por las células vivas a través de la membrana. Inicialmente de color amarillo, este compuesto experimentó un cambio hacia tonalidades moradas debido a su reacción con el dióxido de carbono presente en las células vivas; durante la reacción se generaron cristales de formazán. En la Figura 5.10 se observa el cambio de color de las células en un plato de cultivo.



Figura 5.10. Cambio de color de las células vivas debido al formazán formada en su interior.

Paso 6. Desprendimiento de células: Tras un período de incubación de 4.5 horas con formazán, las células fueron retiradas y se les añadió dimetilsulfóxido (DMSO) para desprenderlas de la placa de cultivo, como se ilustra en la Figura 5.11a. Posteriormente, las células fueron transferidas a una placa de 96 pocillos, tal como se muestra en la Figura 5.11b. En esta etapa, cada cultivo celular se distribuyó en 4 pocillos para su análisis mediante espectrofotometría, con el fin de determinar la viabilidad celular. La placa de 96 pocillos se cubrió con papel aluminio para prevenir la exposición de la sustancia MTT a la luz, procedimiento que se detalla en la Figura 5.11c.

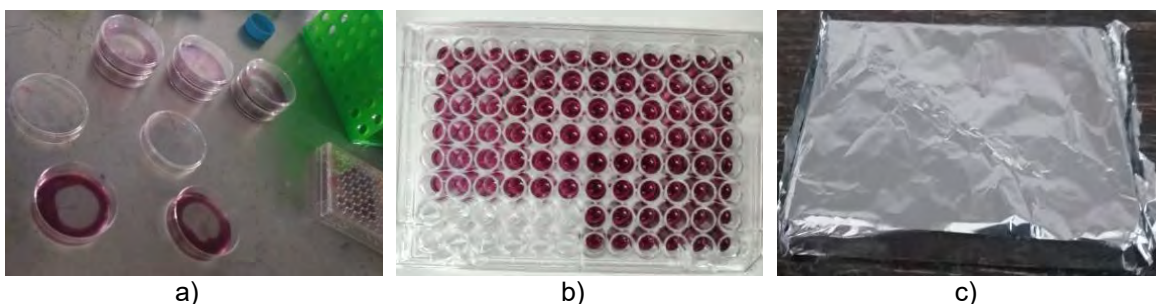


Figura 5.11. Traslado de células de la placa de cultivo a una placa con pocillos: a) se agregó dimetilsulfóxido al cultivo de células, b) se colocaron las células en una placa con pocillos y c) placa de 96 pocillos con papel aluminio.

Paso 7. Lectura de absorbancia de las células: Este procedimiento se realizó mediante un espectrofotómetro multipocillos modelo STAT 2100. La placa de pocillos se colocó en el espectrofotómetro, que emitió luz a las células. Después de

10 minutos, se obtuvo la lectura de la absorbancia del formazán. La Figura 5.12 muestra el espectrofotómetro y la placa de células con formazán.

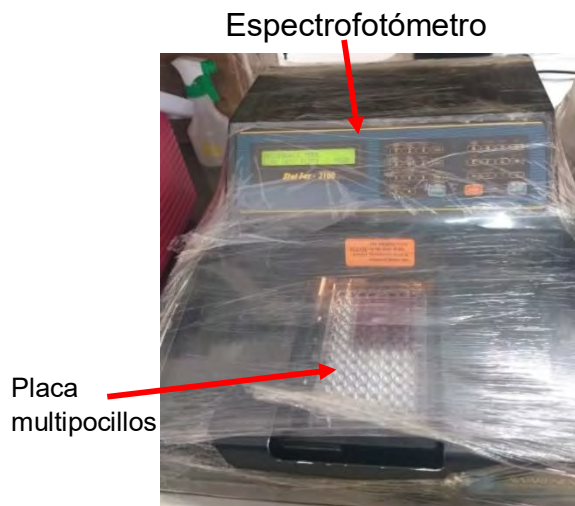


Figura 5.12. El espectrofotómetro con la placa que contiene células y formazán.

5.5 Análisis de los resultados del experimento

En esta sección se presenta el análisis de los resultados obtenidos de la exposición a ultrasonido de las células cancerosas y sanas.

5.5.1 Experimentos de ultrasonido con 31.2 kHz, 1.65 W/cm² y 18 minutos

El primer experimento *in vitro* realizado en células cancerosas y sanas se llevó a cabo con los parámetros de 31.2 kHz, 1.65 W/cm², y 18 minutos de exposición a ultrasonido. La intensidad de 1.65 W/cm² se seleccionó en referencia al trabajo de Geltmeier *et al.* [17]. Después de la exposición, las células fueron observadas a las 24, 48 y 72 horas, sin evidenciarse muerte celular en ninguna de las líneas estudiadas. A las 72 horas, los platos de cultivo se hallaron completamente llenos, lo que indicó una proliferación celular sin alteraciones.

Estos resultados se atribuyen principalmente a dos factores: primero, la adherencia de las células a la superficie del plato de cultivo y entre sí; segundo, la alta densidad celular en el cultivo, aproximadamente tres millones de células. Estos factores contrastan significativamente con el trabajo de Geltmeier *et al.* [17], donde se utilizó una densidad celular mucho menor, con 300 células en un volumen total de 300 µl. Además, las células en el estudio de Geltmeier *et al.* [17] estaban en suspensión, lo que resultó en condiciones de frontera libres durante su análisis modal. Estas diferencias metodológicas destacan la importancia del presente estudio en el contexto de la literatura existente.

A partir de los resultados obtenidos en este experimento, se destacó la importancia del análisis armónico de la variación de la intensidad de ultrasonido en el núcleo de la célula MCF7, como se describe en la sección 4.9 de este trabajo. Dicho análisis

fue fundamental para guiar experimentos posteriores con diferentes intensidades de ultrasonido.

5.5.2 Experimentos de ultrasonido con 31.2 kHz, 4.6 W/cm² y 18 minutos

Los experimentos realizados con US a 31.2 kHz, 4.6 W/cm² y 18 minutos de exposición evidenciaron muerte celular bajo observación microscópica, ya que se detuvo la proliferación de las células. Los resultados obtenidos, que corresponden a los valores de absorbancia calculados para cada pocillo de la placa de cultivo, fueron medidos con un espectrofotómetro bajo estos mismos parámetros de ultrasonido. Dichos valores se presentan en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Absorbancia de las muestras de control con 31.2 kHz de US durante 18 minutos.

Absorbancia de los cultivos celulares en diferentes horas						
	24 H		48 H		72 H	
	MCF-7	MCF10A	MCF-7	MCF10A	MCF-7	MCF10A
Ctrl	0.697	0.623	0.766	0.711	0.809	0.847
	0.591	0.655	0.697	0.730	0.919	0.794
	0.720	0.664	0.792	0.685	0.889	0.825
	0.634	0.647	0.651	0.720	0.755	0.835
Prom.	0.660	0.647	0.726	0.711	0.843	0.825
RUS	0.519	0.606	0.576	0.685	0.692	0.821
	0.515	0.603	0.58	0.68	0.693	0.817
	0.513	0.6	0.574	0.683	0.69	0.831
	0.518	0.6	0.583	0.693	0.689	0.822
Prom.	0.516	0.602	0.578	0.685	0.691	0.822

Ctrl: Cultivos de control, RUS: Cultivos radiados con US

Con base en la Tabla 5.1 y la ecuación 3.17 del capítulo 3 de este trabajo, se graficó en la Figura 5.13 la viabilidad de las células MCF-7 y MCF10A. En la gráfica, se observa que, a las 24 horas, la viabilidad de las células MCF-7 fue del 78%, mientras que la de las MCF10A fue del 93%. Esto indica que el 22% de las células cancerosas y el 7% de las células sanas murieron. Sin embargo, tras 48 horas, la viabilidad de las células MCF-7 aumentó al 79.5%, mientras que la de MCF10A alcanzó el 96.2%. Esto representó un incremento del 1.5% en la viabilidad de MCF-7 y del 3.2% en MCF10A. Por lo tanto, entre las 24 y 48 horas posteriores a la radiación con ultrasonido, el 20.5% de las células cancerosas permanecieron muertas debido al ultrasonido, mientras que las células sanas mostraron una rápida recuperación, con solo un 3.8% de estas células muertas en el mismo período.

A las 72 horas, la viabilidad de las células cancerosas fue del 81.9%, mientras que la de las células sanas alcanzó el 99.7%. Es decir, entre las 48 y 72 horas posteriores a la radiación, se observó un incremento del 2.4% en la viabilidad de MCF-7 y del 3.5% en MCF10A. Por lo tanto, a las 72 horas permanecieron muertas 18% y 0.3% las células de cáncer y sanas, respectivamente. Estos resultados indicaron menor afectación del ultrasonido en las células sanas.

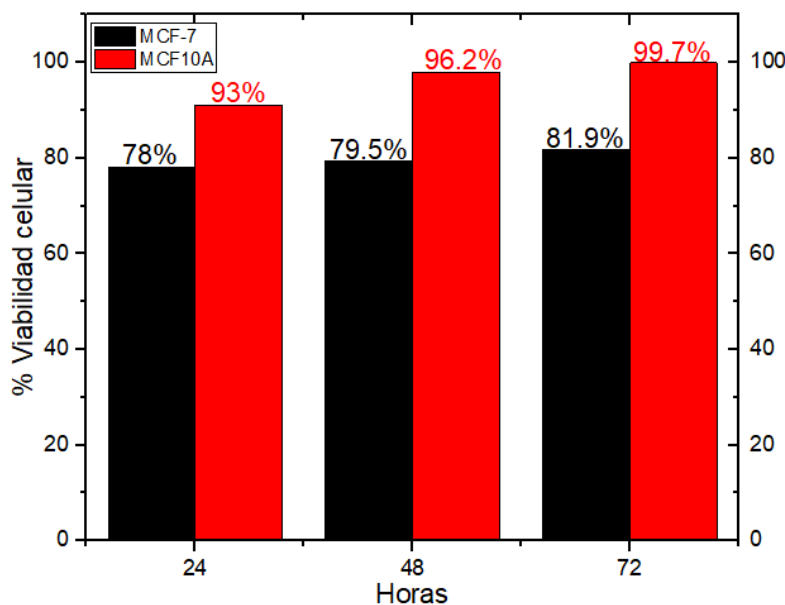


Figura 5.13. Análisis de viabilidad celular a 31.2 kHz, 4.6 W/cm² y 18 minutos de exposición a US en intervalos de 24, 48 y 72 horas para las células cancerosas (MCF-7) y las células sanas (MCF10A).

También se analizó la morfología de las células expuestas a radiación por ultrasonido. En la Figura 5.14 se presentan las comparaciones entre ambas líneas celulares con parámetros de ultrasonido de 31.2 kHz y 4.6 W/cm². En todos los escenarios experimentales y en ambas líneas celulares, no se detectaron rupturas en la membrana celular. Esto sugiere que la muerte celular está relacionada con factores internos, que no se evidencian en la membrana. Sin embargo, se observó que se detiene la proliferación de las células cancerosas. Específicamente, desde las 24 horas hasta las 72 horas después de la aplicación del ultrasonido, se constató que las células MCF-7 no lograron llenar por completo la base de la placa de cultivo. En contraste, las células MCF10A, en las primeras 24 horas post-exposición, no ocuparon toda la base de la placa, pero lograron hacerlo al cabo de 72 horas, lo que concuerda con el 99.7% de viabilidad celular mostrado en la Figura 5.13.

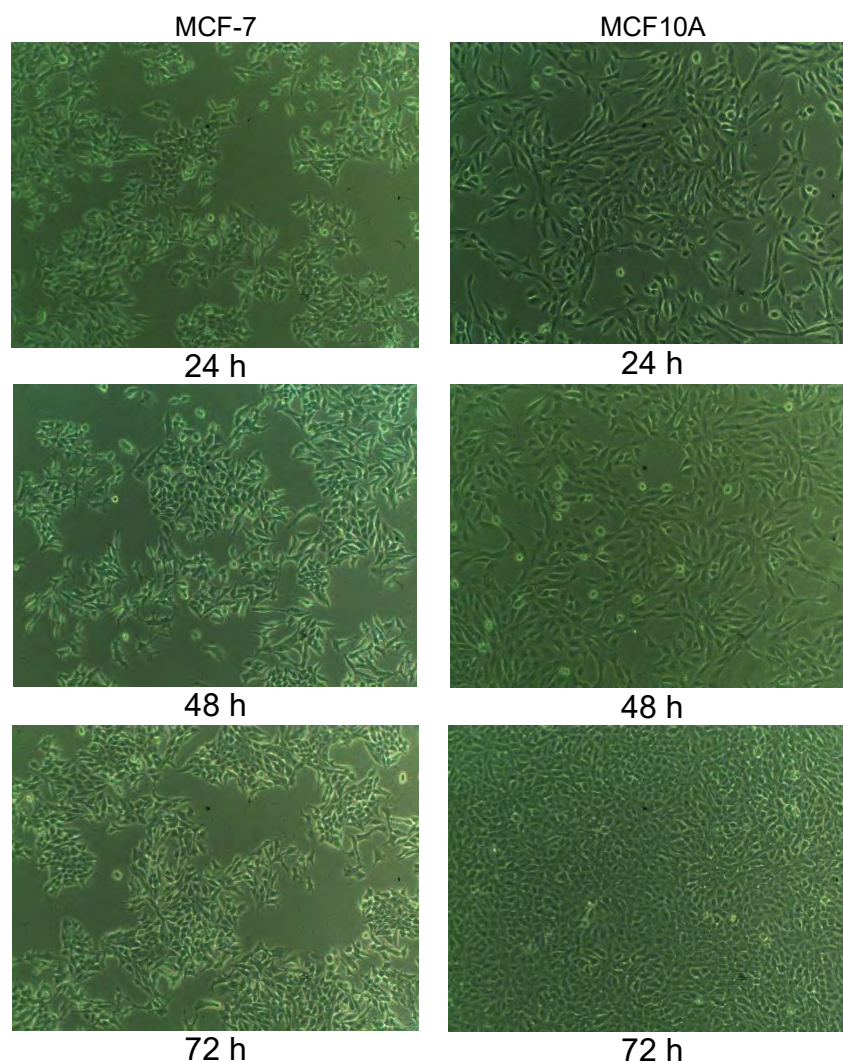


Figura 5.14. Morfología de células radiadas con ultrasonido a las 24, 48 y 72 horas.

5.5.3 Experimentos de ultrasonido con 31.2 kHz, 4.6 W/cm² y 35 minutos

La exposición de los cultivos celulares al US a 31.2 kHz se extendió a 35 minutos para evaluar la variación de la viabilidad celular en comparación con una exposición de 18 minutos. Se repitieron todos los pasos del análisis de viabilidad por el método MTT en las muestras de control y en las expuestas a ultrasonido. Los datos de absorbancia se detallan en la Tabla 5.2, mientras que la viabilidad de ambas líneas celulares se representa en la Figura 5.15.

Tabla 5.2. Absorbancia de las muestras de control y con 31.2 kHz de US con 35 minutos de exposición.

Absorbancia de los cultivos celulares				
	24 H		48 H	
	MCF-7	MCF10A	MCF-7	MCF10A
Ctrl	0.703	0.689	0.760	0.758
	0.660	0.646	0.740	0.738
	0.694	0.679	0.749	0.711
	0.685	0.671	0.713	0.747
Prom.	0.685	0.671	0.740	0.739
US	0.526	0.613	0.576	0.671
	0.517	0.612	0.571	0.681
	0.521	0.617	0.569	0.681
	0.523	0.606	0.567	0.690
Prom.	0.521	0.612	0.570	0.680

Ctrl: Cultivos de control, RUS: Cultivos radiados con US

En la Figura 5.15, se observa que, en las primeras 24 horas posteriores a la radiación con US, las células cancerosas presentaron una viabilidad del 76%, mientras que las células sanas mantuvieron una viabilidad del 91%. Esto indicó una mortalidad del 24% en las células cancerosas y del 9% en las células sanas. Por lo tanto, la exposición de 35 minutos contribuyó a un aumento del 2% en la muerte de ambas líneas celulares en comparación con la exposición de 18 minutos.

A las 48 horas después de la exposición de 35 minutos al US, la viabilidad celular fue del 77% para las células cancerosas y del 92% para las células sanas. Esto implicó un aumento del 1% en la viabilidad de ambas células de 24 a 48 horas después del US.

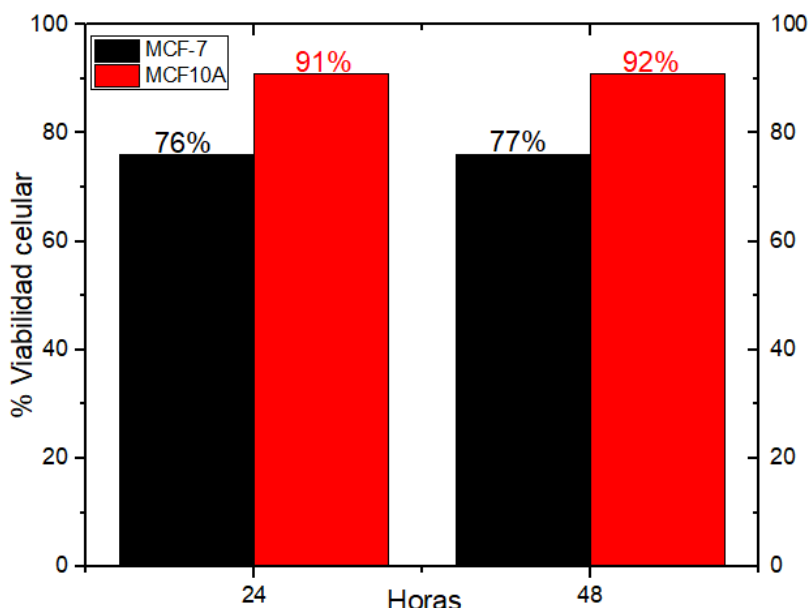


Figura 5.15. Análisis de viabilidad celular a 31.2 kHz, 4.6 W/cm² y 35 minutos de exposición a US en intervalos de 24 y 48 horas para las células cancerosas (MCF-7) y las células sanas (MCF10A).

5.5.4 Experimentos de ultrasonido con 11.2 kHz, 4.6 W/cm² y 18 minutos

Se exploró la exposición al US a 11.2 kHz, una frecuencia de resonancia según el análisis por el MEF con las propiedades descritas en el Anexo A. En este experimento, ambas líneas celulares fueron expuestas con ultrasonido a 11.2 kHz durante un periodo de 18 minutos. Los valores de absorbancia a las 24 horas para cada cultivo se encuentran en la Tabla 5.3, y la viabilidad celular se presenta en la Figura 5.16.

En la Figura 5.16, se observa que la viabilidad de las células MCF-7 a las 24 horas es del 97%, mientras que para las células MCF10A es del 97.3%. La viabilidad de las células MCF10A es solo superior en un 0.3%, lo que indica, aproximadamente, un 3% de muerte en ambas líneas celulares, lo cual no es significativo. Por consiguiente, se concluyó que la frecuencia de 11.2 kHz no causó daño específico a las células MCF-7. Esto lleva a descartar las propiedades mecánicas de las células que sugieren que 11.2 kHz representa resonancia solo para las células MCF-7.

Tabla 5.3. Absorbancia de las muestras de control y con 11.2 kHz de US.

	Absorbancia de los cultivos celulares	
	24 H	
	MCF-7	MCF10A
Ctrl	0.772	0.711
	0.655	0.671
	0.798	0.641
	0.702	0.695
Prom.	0.732	0.679
RUS	0.697	0.661
	0.723	0.672
	0.709	0.658
	0.711	0.653
Prom.	0.71	0.661

Ctrl: Cultivos de control, RUS: Cultivos radiados con US

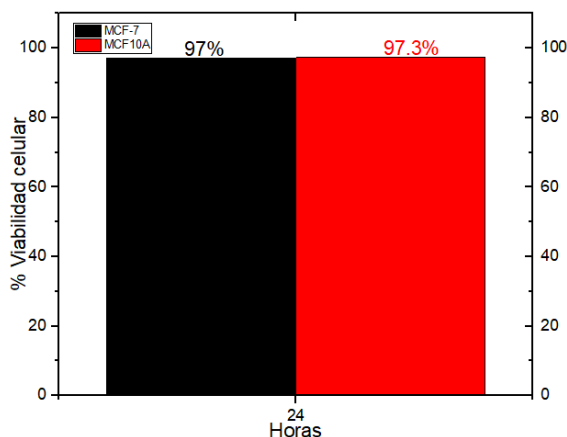


Figura 5.16. Análisis de viabilidad celular a 11.2 kHz, 4.6 W/cm² y 18 minutos de exposición a US en 24 horas para las células cancerosas (MCF-7) y las células sanas (MCF10A).

5.6 Discusión de los resultados

La exposición de 35 minutos a ultrasonido incrementó la mortalidad celular en las células cancerosas en un 24%. Sin embargo, esta exposición también afectó negativamente el crecimiento de ambos tipos celulares: se observó un aumento del 1% en la viabilidad de ambos tipos de células entre las 24 y 48 horas posteriores a la exposición. Este hallazgo fue contrario a la expectativa de una rápida recuperación de las células sanas. En contraste, una exposición de 18 minutos al ultrasonido resultó en la eliminación del 22% de las células cancerosas y del 7% de las células sanas. No obstante, las células sanas iniciaron una rápida reproducción y alcanzaron una viabilidad del 96.2% a las 48 horas; se recuperaron por completo a las 72 horas. La viabilidad de las células cancerosas alcanzó el 79.5% a las 48 horas.

Por otro lado, la frecuencia de 11.2 kHz no mostró un efecto diferencial significativo entre las células cancerosas y las células sanas, por ello, se descartó a esta frecuencia como un parámetro crítico para la mortalidad celular. El resultado fue consistente con el análisis realizado en el capítulo 4.5, que indicó que, para una frecuencia forzada de 11.2 kHz, las células exhiben amplitudes de movimiento de apenas 0 a 1 μm , lo que indica movimientos muy limitados en ambos tipos celulares. Esta limitación en el movimiento se tradujo en una baja tasa de muerte celular, coherente con los resultados de viabilidad presentados en la Figura 5.16. Este hallazgo demostró que ciertas frecuencias, como 31.2 kHz, tienen un efecto significativo sobre tipos celulares específicos, mientras que otras frecuencias, como 11.2 kHz, afectan de manera similar a ambos tipos celulares.

Capítulo 6

Conclusiones y recomendaciones futuras

6.1 Conclusiones

En este estudio se llevó a cabo el modelado mediante el MEF de dos líneas celulares: MCF-7, una línea de células de cáncer de mama, y MCF10A, su correspondiente célula sana. Los modelos de ambas líneas celulares se utilizaron para estudios dinámicos. Inicialmente, se realizó un análisis modal para identificar las frecuencias naturales de vibración de las células. Posteriormente, se efectuó un análisis armónico con el objetivo de corroborar los resultados del análisis modal y determinar las frecuencias específicas que inducen los máximos desplazamientos estructurales en la célula cancerosa. Finalmente, los resultados se validaron mediante la exposición de ultrasonido a cultivos celulares *in vitro* en un ambiente controlado, con aproximadamente tres millones de células en cada cultivo. Las conclusiones obtenidas son las siguientes:

1. El análisis modal demostró que las frecuencias naturales entre las células sanas y cancerosas presentan diferencias porcentuales superiores al 121%. El mismo análisis indicó distintas frecuencias de resonancia.
2. Dentro de las 45 frecuencias naturales de las células cancerosas se identificaron las frecuencias de 27, 28 y 31.2 kHz como generadoras de los máximos desplazamientos de masa. Para las células sanas, las frecuencias de máximos desplazamientos fueron 63.7, 67.3 y 72.8 kHz, con una diferencia del 150% en los valores que generaron mayor perturbación estructural entre ambas líneas celulares.
3. En el análisis modal los patrones de movimiento de las células cancerosas, los microtúbulos evitaron que el núcleo impactara contra la membrana. Los filamentos intermedios posicionaron el núcleo al centro de la célula durante los desplazamientos. Los filamentos de actina, aunque no interactuaron directamente con el núcleo, se flexionaron y, anclados por las adhesiones focales, actuaron como

una armadura que mantuvo la forma esférica de la membrana celular y proporcionaron estabilidad y resistencia a la deformación en ambas líneas celulares.

4. En el modo 45, las frecuencias naturales de ambas líneas celulares dejaron de incrementarse. En todos los modos no se encontró ninguna frecuencia natural idéntica entre las células sanas y cancerosas.

5. El citoesqueleto generó mayor de rigidez estructural: en primer lugar, los microtúbulos; en segundo lugar, los filamentos de actina; y por último, los filamentos intermedios. Por lo tanto, no se puede despreciar el citoesqueleto en el análisis por elementos finitos.

6. La frecuencia de 11.2 kHz no fue selectiva entre las líneas celulares estudiadas, ya que causó daño de forma proporcional tanto en células cancerosas como sanas.

7. La frecuencia de 31.2 kHz generó las máximas amplitudes de los componentes celulares. Sin embargo, esta frecuencia debe ir acompañada de una intensidad de US que provoque daño a la estructura celular; con base en el MEF, una intensidad de 4.6 W/cm² puede generar una amplitud de 14.6 μ m en el núcleo celular.

8. En el cultivo celular de más de 3 millones de células, la frecuencia forzada de 31.2 kHz con 4.6 W/cm² de intensidad de US durante 18 minutos provocó la muerte del 22% de las células cancerosas, mientras que solo mató al 7% de las células sanas. A las 48 horas, el 20.5% de las células cancerosas seguían muertas, y solo el 3.7% de las células sanas mostraron el mismo estado; a las 72 horas, el 18.1% de las células cancerosas y el 0.3% de las células sanas seguían muertas.

9. Un tiempo de exposición de 35 minutos provocó la muerte del 24% de las células cancerosas y del 9% de las células sanas. Sin embargo, después de 48 horas, solo el 1% de las células sanas mostraron viabilidad, lo que indica que no se recuperaron tras la exposición al US. Por lo tanto, se concluyó que una exposición de 18 minutos es adecuada para la radiación de US, ya que evita daños significativos en las células sanas.

10. En todas las muertes de ambas líneas celulares estudiadas no se observó ruptura de la membrana celular. Por lo tanto, se atribuyeron las muertes a efectos internos de las células generados por las grandes amplitudes del núcleo y del citoesqueleto celular inducidas por el US. Las amplitudes cuantitativas obtenidas del análisis armónico no pueden ser comprobadas por ninguna tecnología existente en la actualidad, sin embargo, se afirma la existencia de grandes amplitudes por las muertes obtenidas.

11. Los experimentos con frecuencias de US de 11.2 y 31.2 kHz e intensidades de 1.65 y 4.6 W/cm² demostraron que existen parámetros de US que no son selectivos en la muerte de las células. Este trabajo de tesis adquiere relevancia al proporcionar parámetros adecuados para provocar la muerte de las células cancerosas sin dañar significativamente a las células sanas.

6.2 Recomendaciones para trabajos futuros

En esta sección se presentan tres propuestas de trabajos futuros para dar continuidad a esta línea de investigación. Las propuestas están formuladas para abordar diferentes aspectos y expandir el conocimiento sobre el tema tratado en esta tesis:

Propuesta 1. Análisis en MEF de las diferentes capas del tejido mamario.

Se propone un análisis por elementos finitos que considere la epidermis, dermis y la hipodermis, elementos mostrados en la Figura 6.1, con el objetivo de determinar la intensidad de US necesaria para que las ondas de 31.2 kHz lleguen hasta el tumor. Este análisis es crucial porque, al atravesar un material, los parámetros del US, como la frecuencia e intensidad, cambian. Por lo tanto, en un tejido *in vivo*, es importante asegurarse de que las diferentes capas de tejido no impidan que las ondas de 31.2 kHz y 4.3 W/cm² alcancen el tumor.

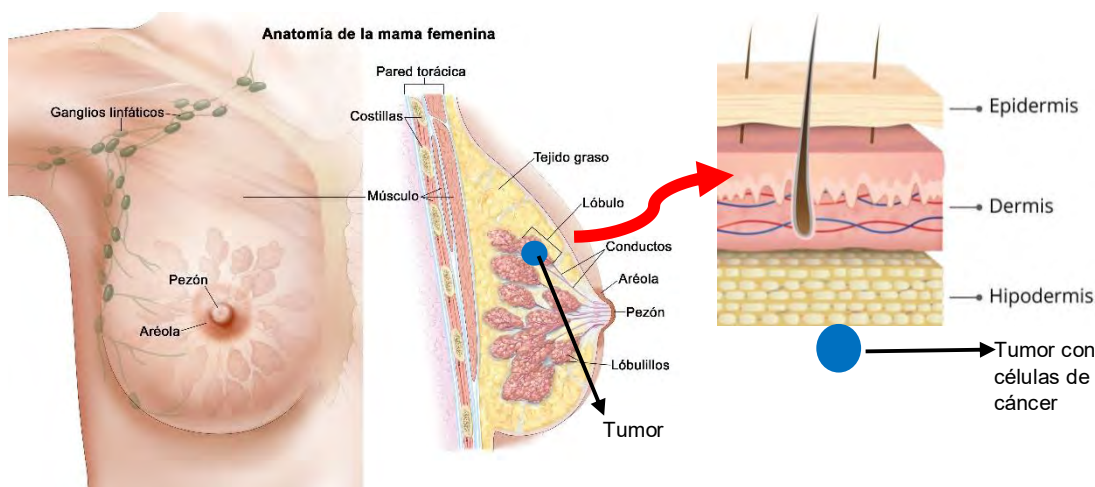


Figura 6.1. Anatomía de la mama femenina.

Propuesta 2. Estudio *in vivo*.

Se propone realizar un estudio *in vivo* con modelos animales, se propone ratas o conejos. El estudio debe considerar la implantación y cultivo de células tumorales MCF-7 en los animales, en espera de que el volumen del tumor alcance un rango de entre 200 y 300 mm³. Cuando el tumor alcance el tamaño determinado se procederá a radiar desde la epidermis la región donde se encuentre el tumor con las frecuencias e intensidades de US previamente calculadas en este estudio *in vitro* o utilizar los parámetros obtenidos de la Propuesta 1. En la Figura 6.2 se observa un ejemplo de la radiación de US en una rata.

El objetivo principal de este estudio sería evaluar la eficacia y seguridad del tratamiento con US en un entorno biológico complejo y dinámico. El estudio permitirá determinar la capacidad del US para inducir la muerte selectiva de células

tumorales en un modelo animal y verificar que las frecuencias e intensidades propuestas no dañen significativamente los tejidos sanos adyacentes.

Adicionalmente, se llevará a cabo una evaluación del bienestar animal durante el procedimiento y se reportará si el animal experimenta dolor o malestar. Esta evaluación se realizará mediante la observación de signos clínicos y su comportamiento, y se utilizarán escalas de dolor específicas para ratas o conejos, según corresponda. La incorporación de este componente será esencial para asegurar que el tratamiento propuesto no solo sea efectivo, sino también seguro y ético.

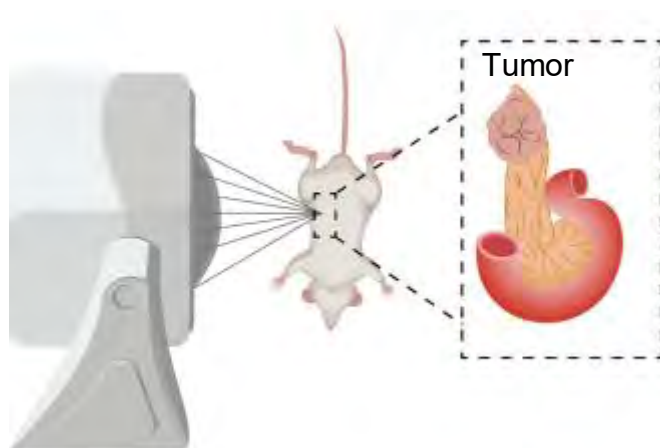


Figura 6.2. Exposición de US en el tumor de una rata [13].

Propuesta 3. Estudio *ex vivo*.

Se propone obtener un tumor de cáncer recién extraído de un paciente en un centro médico y someterlo a radiación con US. Es esencial mantener el tumor a la temperatura corporal, 37°C, para preservar la viabilidad celular. Posteriormente, se evaluará si las células cancerosas mueren en mayor proporción que las células sanas.

Esta propuesta de estudio difiere del estudio *in vitro* realizado en esta tesis, ya que en un tumor se consideran otras proteínas que mantienen firmemente unidas a las células. Entre estas proteínas se incluyen colágeno, cadherinas, integrinas y fibronectina, las cuales desempeñan un papel crucial en la estructura y cohesión del tejido tumoral, lo cual, afecta la respuesta del tumor a la radiación ultrasónica.

Para determinar la viabilidad celular en este tipo de estudios, se sugiere el uso de colorantes específicos que permitan diferenciar entre células vivas y muertas. Un método adecuado para este propósito es el ensayo de exclusión de Trypan Blue. Este colorante se absorbe únicamente por las células muertas, tiñéndolas de azul, mientras que las células vivas permanecen incoloras.

El procedimiento incluirá los siguientes pasos:

1. Mantenimiento del tumor:

El tumor deberá mantenerse a 37°C desde su extracción hasta el análisis para evitar la muerte celular por variaciones de temperatura.

2. Radiación con US:

Se aplicará la radiación con US al tumor con los parámetros definidos (frecuencia de 31.2 kHz y una intensidad de 4.3 W/cm²).

3. Disgregación del tumor:

Serán utilizadas enzimas como collagenasa o tripsina para disgregar el tumor en células individuales. De esta forma se obtendrá una suspensión celular.

4. Aplicación del ensayo de Trypan Blue:

Se añadirá el colorante Trypan Blue a la suspensión celular.

5. Análisis de resultados:

Se comparará la proporción de células muertas y vivas para determinar la eficacia del US en la destrucción de las células cancerosas en comparación con las células sanas.

Anexo A

A.1 Frecuencias naturales de célula MCF-7 con 0.15 kPa de módulo de elasticidad en el citoplasma y núcleo

En la Tabla A.1 se presentan las frecuencias naturales de la célula MCF-7. Se observa que las primeras cinco frecuencias naturales varían en magnitud dentro de un rango del 5 al 10%. En contraste, la sexta y séptima frecuencia natural muestran una mayor estabilidad, con una variación de solo el 1%.

Tabla A.1. Modos de vibración, frecuencias naturales y diferencias porcentuales en la célula MCF-7.

Modos	Frecuencias naturales (Hz)	% de incremento de frecuencia
1	11 293	
2	12 267	9
3	12 965	5
4	13 571	8
5	14 985	10
6	15 105	1
7	15 237	1

En la Tabla A.2 se presentan las masas efectivas asociadas a las primeras siete frecuencias naturales de la célula MCF-7. Se observa que la primera frecuencia es la que desplaza la mayor cantidad de masa, con un 32.79, 24.78 y 0.03% en los ejes x, y, z; respectivamente. Además, a partir de la cuarta frecuencia natural, la cantidad de masa movida en todos los ejes es inferior al 1%. Por lo tanto, la masa efectiva sugiere que la primera frecuencia es la más crítica para el sistema.

Tabla A.2. Masa efectiva y porcentaje de masa desplazada en los ejes x, y, z en función de las frecuencias naturales.

Modos	Frecuencias naturales (Hz)	Masa efectiva (Kg)			% de masa que se mueve		
		Eje x	Eje y	Eje z	Eje x	Eje y	Eje z
1	11 293	1.357e-12	1.0255e-12	1.3826e-15	32.79	24.783	0.033
2	12 267	7.879e-13	1.0228e-12	3.6019e-13	19.04	24.717	8.704
3	12 565	6.3454e-14	1.9148e-13	1.7043e-12	1.53	4.6276	41.18
4	13 571	7.031e-15	3.3402e-14	3.5531e-14	0.16	0.8072	0.858
5	14 985	8.5194e-15	3.1291e-17	1.5845e-15	0.20	0.0007	0.038
6	15 105	1.0619e-14	1.8359e-13	3.6123e-14	0.25	4.4367	0.872
7	15 237	3.9889e-14	2.2659e-14	4.4462e-16	0.96	0.5476	0.010

Anexo b

B.1 Frecuencias naturales de célula MCF10A con 0.25 kPa de módulo de elasticidad en el citoplasma y núcleo

En la Tabla B.1 se presentan las frecuencias naturales de la célula MCF10A y las diferencias porcentuales entre ellas. En los modos 3 a 5, las diferencias porcentuales oscilan entre el 6.6% y el 9.6%. En las dos últimas frecuencias, las diferencias se estabilizan en un 3.1%.

Tabla B.1. Modos de vibración, frecuencias naturales y diferencias porcentuales en la célula MCF10A.

Modos	Frecuencias naturales (Hz)	% de incremento de frecuencia
1	22 621	
2	22 944	1.40
3	24 585	6.67
4	27 219	9.67
5	30 109	9.59
6	30 549	1.44
7	31 528	3.10

En el análisis de las masas efectivas de las frecuencias naturales de la célula MCF10A, mostrado en la Tabla B.2, se observa que las primeras tres frecuencias naturales son críticas. En la primera frecuencia natural, se desplaza el 32% de la masa en el eje "y". En la segunda frecuencia natural, se desplaza el 34% de la masa en el eje "x" y el 18% en el eje "y". En el tercer modo, se desplaza el 30% de la masa en el eje "z".

Tabla B.2. Masa efectiva y porcentaje de masa desplazada en los ejes x, y, z en función de las frecuencias naturales.

Modos	Frecuencias naturales (Hz)	Masa efectiva (Kg)			% de masa que se mueve		
		Eje x	Eje y	Eje z	Eje x	Eje y	Eje z
1	22 621	5.0227e-014	2.7844e-013	1.0466e-013	5.77	32.02	12.03
2	22 944	2.9532e-013	1.5516e-013	5.2812e-014	34.1	18	6.07
3	24 585	1.0327e-013	3.5619e-014	2.568e-013	11.87	4.09	30
4	27 219	1.3938e-016	7.0956e-015	3.8394e-017	0.016	0.81	0.004
5	30 109	7.1242e-017	6.6844e-017	1.378e-016	0.008	0.007	0.015
6	30 549	2.1996e-015	1.5827e-015	1.9747e-015	0.25	0.182	0.22
7	31 528	1.0257e-014	1.2453e-014	1.3767e-014	1.17	1.43	1.58

Anexo c

C.1 Comparación de las frecuencias naturales de las células MCF-7 y MCF10A

En la Tabla C.1 se presentan las diferencias porcentuales de las primeras siete frecuencias naturales de la célula MCF-7 y MCF10A. se observa que a excepción de los modos 2 y 3, en todos los otros modos las frecuencias naturales de la célula MCF-7 está reducido a más del 50% lo cual es una diferencia significativa.

Tabla C.1. Comparación de las frecuencias naturales y la diferencia porcentual entre las células MCF7 y MCF10A.

Modos	Frecuencias naturales (Hz)		% diferencia porcentual
	MCF-7	MCF10a	
1	11 293	22 621	50.07
2	12 267	22 944	46.53
3	12 565	24 585	48.89
4	13 571	27 219	50.14
5	14 985	30 109	50.23
6	15 105	30 549	50.55
7	15 237	31 528	51.67

Anexo d

D.1 Componentes electrónicos, diseño del circuito de control de potencia, y simulación para verificar su funcionamiento

Los componentes electrónicos empleados en el circuito de control de potencia son:

1. **LM2596**: Circuito integrado regulador de voltaje, utilizado para reducir el voltaje de entrada.
2. **D1**: Diodo de recuperación rápida que manejó la corriente inversa generada por la bobina.
3. **C1, C2, C3**: Capacitores de 1000 μF , 0.1 μF y 220 μF que proporcionaron almacenamiento de energía al circuito cuando fuera apagado.
4. **L1**: Bobina de 33 μH que filtró y amortiguó la corriente de entrada.
5. **R1, R2**: Resistencias de 10 k Ω y 510 Ω configuradas para crear un divisor de voltaje.
6. **IRF640N**: Transistor MOSFET de conmutación utilizado para activar y desactivar el transductor ultrasónico.
7. **R3**: Resistencia de 10 k Ω que referencia el MOSFET a tierra.
8. **R4**: Resistencia de 1 k Ω que limitó la corriente de suministro de habilitación del MOSFET.
9. **Generador de funciones**: Dispositivo para controlar la frecuencia de activación del MOSFET.
10. **Buzzer o transductor**: Transductor de sonido y ultrasonido de 4 cm de diámetro y 250 W de potencia RMS con un rango de frecuencia de 2 a 35 kHz.
11. **L**: Bobina de 1 mH para atenuar el ruido generado por la conmutación de alta frecuencia.
12. **Ventilador de 12 V**: Dispositivo que prevenir el sobrecalentamiento de los componentes.

En la Figura D.1 se presenta el diagrama esquemático del circuito de control, donde se resalta las conexiones y la disposición de los componentes electrónicos. Este circuito se integra con el transductor ultrasónico, la fuente de voltaje y el generador de funciones, lo que permite una operación coherente y eficiente del sistema.

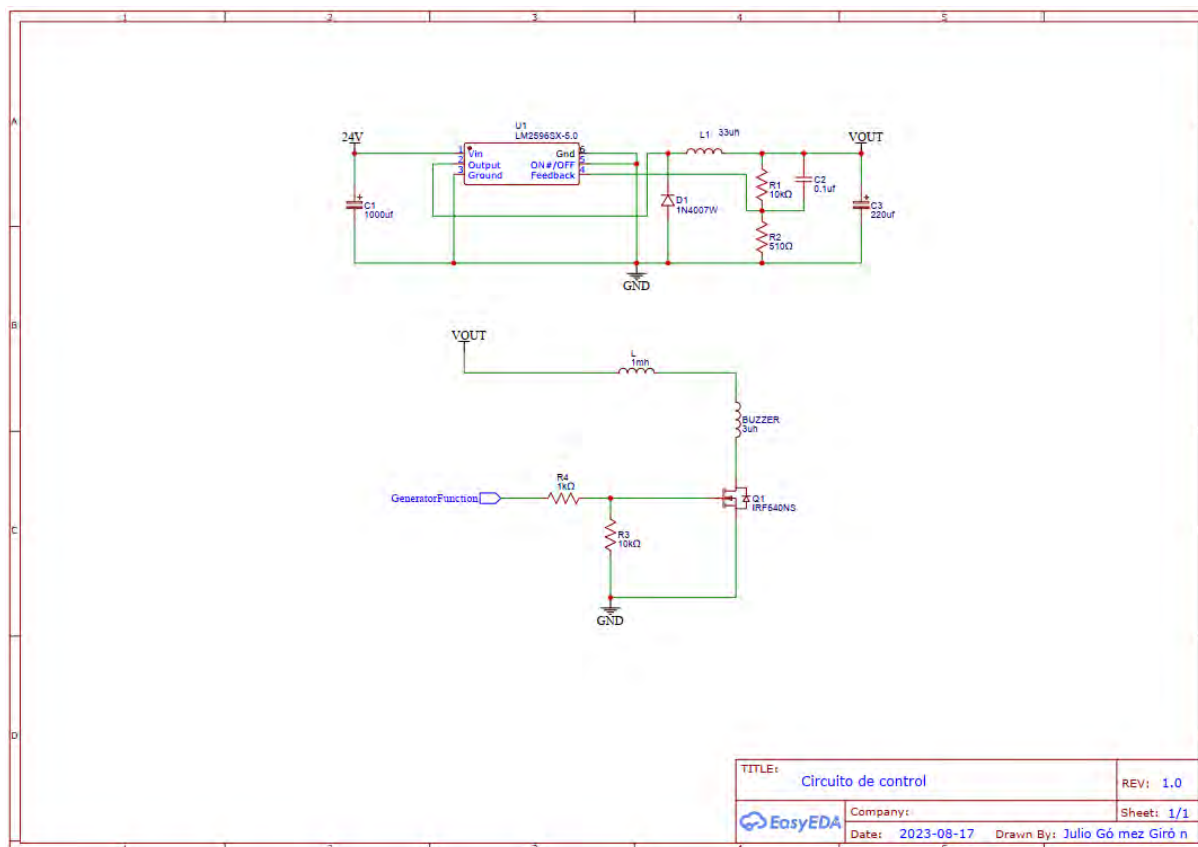


Figura D.1. Plano del circuito de control de potencia.

El circuito electrónico mostrado en la Figura D.1 fue diseñado con el software Proteus 8. Para alcanzar el diseño final, se realizaron simulaciones en el mismo programa con el fin de verificar el correcto funcionamiento del circuito de control. Estas simulaciones aseguraron que la frecuencia obtenida del generador de señales se mantuviera constante y libre de perturbaciones mientras variaba la potencia eléctrica. Uno de los resultados obtenidos de estas simulaciones se presenta en la Figura D.2. Durante este proceso, se constató que es posible variar y controlar la potencia eléctrica del US de manera precisa mientras se mantiene la frecuencia ultrasónica constante. Con base en estos resultados, el siguiente paso fue construir el dispositivo conforme a las especificaciones derivadas.

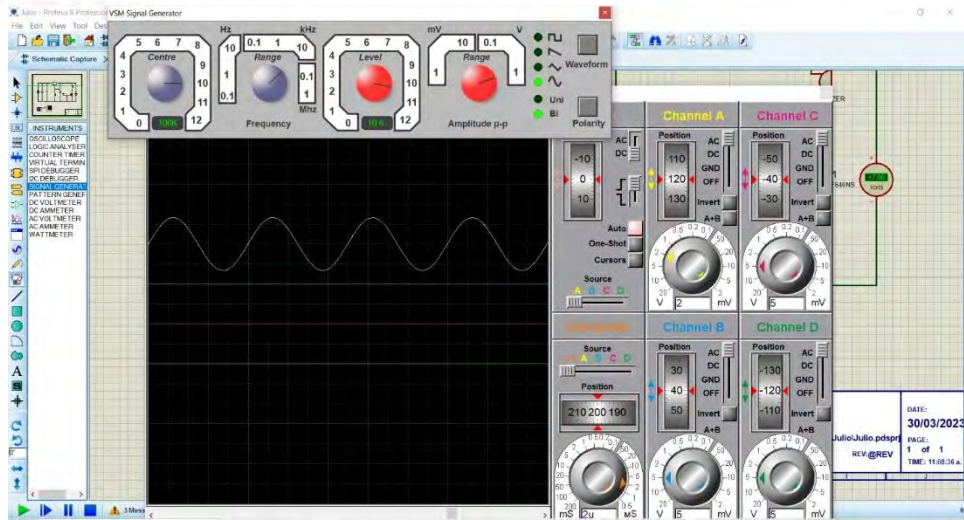


Figura D.2. Simulación del circuito de control para verificar su correcto funcionamiento.