

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACION EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN INGENIERÍAS Y CIENCIAS APLICADAS**

**“Caracterización óptica de la vejiga para  
detección temprana de cáncer mediante  
técnicas no lineales”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**Licenciado en Tecnología con Área Terminal en Electrónica**

**PRESENTA:**

**JOHN BRANDON CARDENAS RODRIGUEZ**

**Directores:**

**Dr. Omar Palillero Sandoval**

**Dr. Pablo Loza Alvarez**

**Dr. Gustavo Castro Olvera**

**Sinodales:**

**Dr. J Jesús Escobedo Alatorre**

**Dr. Edgar Eduardo Antúnez Cerón**

**Cuernavaca, Morelos**

**septiembre 2023**

# I. Índice General

I.	Índice General .....	2
II.	Resumen.....	3
III.	Abstract .....	4
IV.	Motivación .....	7
	Detección de cáncer de vejiga en estadios tempranos de manera no invasiva con óptica .....	7
V.	Marco Teórico .....	8
	Métodos de diagnóstico para el cáncer de vejiga.....	8
	Cistoscopia con luz blanca .....	9
	Cistoscopia con luz azul .....	10
	Imagen por resonancia magnética .....	10
	Tomografía Computarizada.....	11
	Técnicas ópticas avanzadas no invasivas para la detección del cáncer de vejiga. ....	13
	Ventanas biológicas.....	14
	Actividad metabólica en vejiga.....	15
	Componentes estructurales de la vejiga .....	21
VI.	Metodología .....	25
	Configuración de los microscopios.....	26
	Microscopio multimodal .....	26
	Microscopio confocal de barrido láser Leica TCS SP8 STED 3X .....	28
	Montaje de muestras .....	29
	Análisis de imágenes .....	29
VII.	Resultados y Discusiones.....	30
	Visualización de las fibras de colágeno en vejiga.....	30
	Distribución de las fibras de colágeno.....	34
	Visualización de los componentes metabólicos de la vejiga.....	36
VIII.	Conclusiones.....	41
IX.	Apéndices .....	42
	i. Interacción de la luz en tejidos biológicos.....	42
	ii. Preparación de muestras .....	43
	iii. Análisis y procesamiento de imágenes .....	46
X.	Bibliografías.....	48

## II. Resumen

En esta tesis se llevó a cabo una investigación que demuestra el potencial de las técnicas no lineales como herramientas de caracterización en tejidos, específicamente en el caso de la vejiga, con el propósito de detectar el cáncer de vejiga en etapas tempranas mediante métodos ópticos.

Se hace uso del láser Ti:Zaf @800nm y el láser de fibra Ytterbium @1030nm, los cuales se encuentran en el rango del espectro electromagnético del infrarrojo. Estos láseres cuentan con gran alcance en penetración debido a sus características, como su longitud de onda más larga que la luz visible; lo que se traduce en menor energía asociada a un fotón, y la baja interacción que existe entre la luz infrarroja y los componentes biológicos como los tejidos. Estos láseres generan pulsos en femtosegundos y son utilizados en diferentes técnicas para formación de imágenes no lineales, específicamente para este trabajo de tesis se emplearon para aprovechar el fenómeno de generación de segundo armónico (SHG, *second harmonic generation*) y el fenómeno de fluorescencia por excitación de dos fotones (TPEF, *two photon excitation fluorescence*), además se aprovecha la asistencia de un microscopio de barrido láser para efectuar un barrido espectral empleando la técnica de formación de imágenes hiperespectrales (HSI, *hyperspectral imaging*).

El desarrollo de esta tesis se realizó en los laboratorios del grupo de investigación en microscopía óptica de superresolución y nanoscopía (SLN, *Super-resolution Light Microscopy & Nanoscopy*) del instituto de ciencias fotónicas (ICFO).

En este estudio se aprecia la caracterización en profundidad de las fibras de colágeno y obtención de información estructural en tejido de vejiga de rata, empleando diferentes métodos de formación de imágenes y longitudes de onda, dando pie a un futuro método de detección óptico no invasivo y con alta capacidad en penetración para el estudio de cáncer de vejiga en estadios tempranos.

### **III. Abstract**

In this thesis we carried out an investigation that demonstrates the potential of nonlinear techniques as characterization tools in tissues, specifically in the case of the bladder, with the purpose of detecting bladder cancer in early stages by optical methods.

We make use of the Ti:Sapphire @800nm laser and the Ytterbium @1030nm fiber laser, both of which are in the infrared range of the electromagnetic spectrum. These lasers have great penetration range due to their characteristics, their longer wavelength than visible light, which translates into less energy associated with a photon, and the low interaction that exists between infrared light and biological components such as tissues. These lasers generate femtosecond pulses and are used in different techniques for nonlinear imaging, specifically for this thesis work were used to exploit the phenomenon of second harmonic generation (SHG) and the phenomenon of two photon excitation fluorescence (TPEF), in addition, the assistance of a laser scanning microscope is used to perform a spectral scan using the hyperspectral imaging (HSI) technique.

The development of this thesis was carried out in the laboratories of the Super-resolution Light Microscopy & Nanoscopy (SLN) research group of the Institute of Photonic Sciences (ICFO).

This study shows the in-depth characterization of collagen fibers and the obtaining of structural information in rat bladder tissue, using different imaging methods and wavelengths, giving rise to a future non-invasive optical detection method with high penetration capacity for the study of bladder cancer in early stages.

# Agradecimientos

*Este trabajo está dedicado a mi amado padre Armando Cárdenas Espinosa, quien siempre estará a mi lado en cada situación, me alentará a seguir creciendo como persona y me dará la motivación para llegar a ser un gran hombre, este señor ha sido y será mi ejemplo por seguir, gracias a su esfuerzo y dedicación me ha mostrado el camino correcto de lo que un hombre puede llegar a realizar para alcanzar sus sueños, sé que estas orgulloso de mi y yo lo estoy de ti por ser un gran padre.*

*A mi hermana Melanie, que estuvo conmigo en todas mis etapas y me brindo su cariño y apoyo incondicional, ha conocido y comprendido cada una de mis decisiones y siempre será mi pequeña hermanita, te llevo conmigo en mi mente y corazón.*

*A mi madre que me alentó a seguir adelante en mis metas, apoyó mis decisiones de vida y siempre me alentó con una gran sonrisa en su rostro, gracias por todo el cariño que me has brindado sé que te sientes orgullosa de lo que logrado.*

*A mis grandes amigos de México; Kevin, Carlos, Marcelo, Francisco, que nunca se olvidaron de alentarme en la distancia, hicieron de mi universidad una experiencia gratificante y más que haber sido mis amigos ustedes han sido una familia.*

*Como no dedicarle un agradecimiento al que fue como mi hermano por un año completo en Barcelona, Arturo Cabrera, un excelente amigo que estuvo conmigo en las situaciones complicadas y en la diversión por esta maravillosa ciudad, me ayudo a balancear mi vida entre el trabajo y la loquera y siempre nos apoyamos en seguir nuestros sueños, nuestro esfuerzo nos tiene algo preparado para el futuro y el objetivo es que sea juntos hermano.*

*Al Bombón salsa que fue el lugar en el que más me divertí por Barcelona en compañía de mi hermano Arturo, quedara marcado de por vida por nosotros.*

*A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y el Centro de Investigación en Ingeniería y Ciencias Aplicadas por darme una excelente formación académica, desarrollar mi pensamiento crítico analítico y presentarme a los mejores educadores apasionados a su vocación.*

*A cada uno de los integrantes del grupo SLN quienes me recibieron como uno más en la familia, me brindaron sus conocimientos y experiencias, como les dije siempre no se qué hubiera sido de mi sin ustedes, son parte de mi corazón y espero volver a coincidir con ustedes, siempre voy a estar agradecido por su apoyo y cariño.*

*Al Dr. Omar Palillero Sandoval que me alentó a crecer en el área académica y a superarme a mí mismo, gracias a él logre expandir mis conocimientos en un maravilloso grupo de investigación en el extranjero, mi familia siempre lo lleva en la mente y estamos muy agradecidos por su confianza, mi estancia en el CIICAp no habría sido igual sin sus platicas y conocimiento.*

*Al Dr. Pablo Loza Alvarez quien me abrió las puertas a su grupo de investigación y alentó a ir más allá en mi carrera profesional como investigador, me siento privilegiado por haber trabajado a su lado, es un gran jefe de grupo y recordare su sonrisa alentadora que desprende confianza, me esforzare por ganarme la oportunidad de volver a trabajar a su lado.*

*Al Dr. Gustavo Castro Olvera quien me llevo paso a paso al mundo de la investigación, me brindó su apoyo y su gran conocimiento tanto en academia como en la vida, más que un jefe gané un gran amigo y espero que la vida nos vuelva a juntar, eres lo que espero llegar a ser en un futuro no muy lejano como investigador y sé que nos esperan grandes éxitos.*

*"Aquel que se sumerge en la sabiduría interior descubre que los enemigos son meras ilusiones, pues su verdadero ser es un hombre superior al que se ha permitido revelar"*

## **IV. Motivación**

### **Detección de cáncer de vejiga en estadios tempranos de manera no invasiva con óptica**

El cáncer de vejiga es la cuarta malignidad más comúnmente diagnosticada en hombres y la octava más común en mujeres<sup>[1]</sup>. Como en todos los tipos de cáncer, la detección temprana del cáncer de vejiga es crucial para mejorar el pronóstico y la supervivencia de los pacientes.

Actualmente, el diagnóstico se realiza principalmente a través de pruebas como la cistoscopia, que es una exploración endoscópica donde se introduce un tubo delgado a través de la uretra para acceder a la vejiga. Otra de las pruebas es mediante biopsias, un procedimiento invasivo en el que se extraen pequeñas muestras de tejido de la vejiga, estas pruebas pueden llegar a ser dolorosas y generar malestar en el paciente. Sin embargo, la tecnología óptica ofrece una alternativa no invasiva y prometedora para la detección temprana del cáncer de vejiga.

La formación de imágenes mediante el uso de la señal de generación de segundo armónico (SHG, *second harmonic generation*), es una técnica de imagen no lineal que se puede utilizar para visualizar la organización y estructura del tejido extracelular, proporcionando información sobre la organización del colágeno y otros componentes. Esto nos puede permitir visualizar como se afecta la organización del colágeno tipo I en presencia del cáncer.

Por otro lado, existen otras técnicas de formación de imágenes que nos permiten obtener información sobre la composición bioquímica presente en los tejidos de la vejiga y el cáncer.

Una de las más prometedoras es aprovechar la autofluorescencia que existe en los tejidos biológicos con el propósito de visualizar estructuras y moléculas dentro de las células. Al utilizar la señal de fluorescencia por excitación de dos fotones (TPEF, *two photon excitation fluorescence*), empleamos esta propiedad para obtener información detallada sobre estructuras celulares y tejidos biológicos.

Esta técnica no lineal al llevarse a cabo con un haz de luz perteneciente a una longitud de onda en el espectro electromagnético del infrarrojo permite obtener dicha información a mayor profundidad de penetración que utilizando un haz de luz perteneciente a una longitud de onda en el espectro electromagnético de luz visible.

Específicamente, la información que sería de interés analizar está relacionada con la actividad metabólica, en las que se implican el dinucleótido de nicotinamida y adenina reducida (NADH, *nicotinamide adenine dinucleotide*) y el dinucleótido de flavina y adenina (FAD, *flavin adenine dinucleotide*), en vista de que la actividad metabólica tiene mayor presencia en el cáncer, esta herramienta podría proporcionar la información necesaria para poder identificar diferencias entre el tejido sano y el tejido enfermo.

La segunda técnica es la formación de imágenes hiperespectrales (HSI, *hyperspectral imaging*), esta nos ofrece la posibilidad de realizar un barrido espectral en detección de la autofluorescencia del tejido, en busca de información sobre los metabolitos NADH y FAD utilizando luz visible.

Las imágenes obtenidas con HSI y con la señal de TPEF, nos pueden ayudar a identificar estos metabolitos en el tejido y si hay diferencias entre ellas con respecto a la actividad metabólica existente en la vejiga.

Haciendo uso de estas tres técnicas ópticas para la formación de imágenes, dispondremos de información que nos asistirá en la identificación de la correlación entre los patrones de autofluorescencia con la actividad metabólica, así como la distribución en profundidad de las fibras de colágeno tipo I, abriendo camino a un futuro método de detección efectivo en profundidad y no invasivo para cáncer de vejiga.

## **V. Marco Teórico**

### **Métodos de diagnóstico para el cáncer de vejiga**

Para la detección de cáncer de vejiga, existen varios métodos de diagnóstico, es importante destacar que la detección temprana del cáncer es crucial para un mejor pronóstico y tratamiento. Los siguientes métodos de diagnóstico son de interés debido a que son los más utilizados hoy en día para la detección del cáncer de vejiga.



## Cistoscopia con luz blanca

La cistoscopia convencional o cistoscopia con luz blanca (WLC, *white light cystoscopy*) es la técnica estándar para la detección de cáncer de vejiga[2], ver ilustración 1. La tasa de detección de la WLC tiene un porcentaje del 60% [3].

En la cistoscopia con luz blanca puede existir una pobre visualización debido a la capacidad del instrumento para acceder a ubicaciones complicadas, el tamaño del tumor y la generación de sangrado durante la prueba que pueden complicar un buen diagnóstico. La inflamación en el tejido debido a infecciones urinarias o enfermedades inflamatorias del tracto urinario también pueden afectar y hacen difícil distinguir entre la inflamación y tumores.

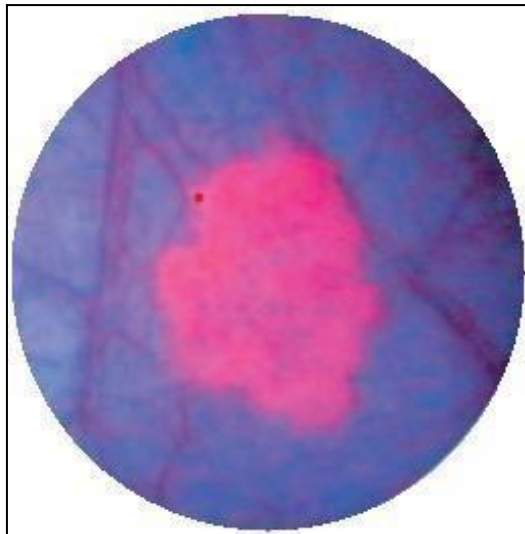
Estos factores que afectan la precisión del diagnóstico junto a la presencia de lesiones como displasias severas; las cuales son células anormales en el tejido no necesariamente cancerosas, hacen posible la generación de falsos positivos en las pruebas de WLC[4], incrementando la posibilidad de que pueda ocurrir una extirpación incompleta y mayores tasas de recurrencia.



*Ilustración 1.- Imagen de vejiga durante una cistoscopia con luz blanca, en el centro se encuentran células anormales las cuales son difíciles de identificar a simple vista[5].*

## Cistoscopia con luz azul

La cistoscopia con luz azul (BLC, *blue light cystoscopy*) es una técnica de diagnóstico que, en conjunto con el agente fluorescente hexaminolevulinato (HAL/Cysview/Hexvix), sirve para mejorar la detección de tumores en vejiga[6], ver ilustración 2, en comparación con la WLC. Esta técnica requiere colocar la solución fluorescente, haciendo uso de un catéter, que se introduce en la vejiga a través de la uretra, esta sustancia se adhiere a las células anormales. El hexaminolevulinato provoca que las células anormales se vuelvan fluorescentes, otorgando una tonalidad rosa brillante, ante la presencia de luz azul, esto permite al médico detectar lesiones planas y otros cambios en la mucosa de la vejiga, que podrían haber pasado desapercibidos en una cistoscopia de luz blanca[7].

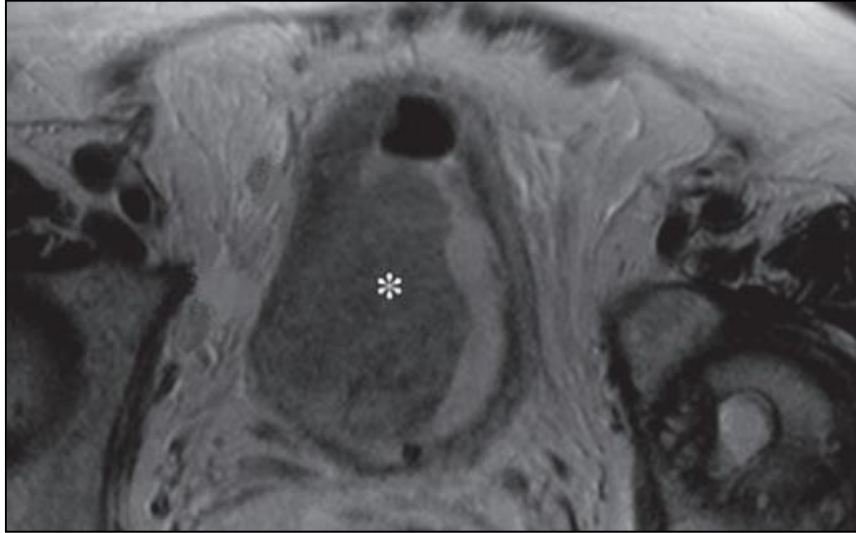


*Ilustración 2.- Imagen del cáncer de vejiga durante una cistoscopia con luz, en el centro se encuentran células anormales las cuales se identifican a simple vista debido al agente marcador [5].*

## Imagen por resonancia magnética

La obtención de imágenes por Resonancia Magnética (MRI) actualmente es un método prometedor el cual asiste en la localización y la evaluación del cáncer ya que proporciona información valiosa sobre la ubicación exacta del tumor y su extensión, ver ilustración 3. Además, debido a su alta resolución espacial de alto contraste, se puede identificar el cáncer en algún órgano adyacente detectando así la presencia de metástasis[8].

Sin embargo, la MRI hace uso de medios de contraste, lo que implica ser invasivo, eliminando la posibilidad del uso de esta técnica como método de seguimiento de la enfermedad, así como la posibilidad que el paciente pueda desarrollar una reacción alérgica a estos[9]. Además en el uso de la MRI, no siempre se puede distinguir entre tumores malignos o enfermedad benigna, lo que podría dar lugar falso positivo[9].



*Ilustración 3.- Imagen tomada con la técnica MRI aplicada a un hombre adulto de 74 años para identificar un carcinoma urotelial, el símbolo "\*" indica la ubicación del tumor en la vejiga[10].*

## **Tomografía Computarizada**

La tomografía computarizada (CT, *computed tomography*), en concreto la urografía por tomografía computarizada (CTU, *Computed tomography urography*), es un método de imagen utilizado para diagnosticar y estadificar tumores malignos uroteliales y la localización, estadificación y detección de metástasis a distancia[11] ver ilustración 4.

Debido a que la CT usa rayos X, la cual es radiación ionizante, esta técnica tiene el potencial de causar efectos biológicos no deseados en el tejido vivo. A pesar de que el riesgo de desarrollar cáncer por la exposición a la radiación de rayos X es generalmente pequeño, es un riesgo que aumenta con el número de exposiciones sumadas a lo largo de la vida del paciente.

Además, este método de diagnóstico tiene ciertas limitaciones relacionadas a falsos negativos, debidas a lesiones uroteliales, artefactos de imagen y el uso de agentes de contraste; convirtiéndolo en un método invasivo, cabe mencionar que estos agentes en algunos casos pueden causar alergias o insuficiencia renal temporal[12].



*Ilustración 4.- Imagen tomada con la técnica CT aplicada a un hombre adulto de 74 años para identificar un carcinoma urotelial, asistiéndose de una inyección de bolo dividido (Split-bolus injection) que es un agente de contraste utilizado para mejorar la visualización de estructuras en los órganos, el símbolo "\*" indica la ubicación del tumor en la vejiga[10].*

Estos son algunos de los métodos más utilizados para la identificación de cáncer de vejiga. Los métodos en los que se hace uso de agentes marcadores externos como la MRI y la CT, cuentan con la ventaja de penetrar en profundidad a través del tejido, sin embargo, son invasivos al igual que la BLC. Estos marcadores pueden implicar riesgos en la salud del paciente, para evitar los riesgos, se opta por un método como la cistoscopia de luz blanca, en la cual no es necesario el uso de estos marcadores, sin embargo, la profundidad de penetración al igual que la BLC se ve altamente limitada a una visualización superficial.

Estas limitaciones nos motivan a buscar un método no invasivo, que logre mejorar en profundidad de penetración y evite el uso de agentes marcadores, induciéndonos a reflexionar sobre el uso de métodos ópticos, así con este enfoque, podremos abordar adecuadamente estas limitaciones.

## **Técnicas ópticas avanzadas no invasivas para la detección del cáncer de vejiga.**

Aprovechando la característica de los tejidos biológicos para emitir luz autofluorescente, se pueden utilizar diversas técnicas ópticas para obtener imágenes de alta resolución y estudiar la estructura y organización de los tejidos, Apéndice i.

Gracias a las ventanas biológicas que existen con respecto a la absorción y el esparcimiento de la luz en los tejidos, podemos identificar ciertas regiones en el espectro infrarrojo donde los tejidos tienen una menor absorción y esparcimiento de la luz, lo que permite que la luz penetre más profundamente en el tejido.

La formación de imágenes mediante el uso de la señal de generación de segundo armónico es especialmente útil para visualizar la estructura de tejidos sin la necesidad de utilizar marcadores fluorescentes. Esta técnica permite estudiar la organización del colágeno presente en la vejiga, así como otros tejidos biológicos.

La formación de imágenes mediante el uso de la señal de TPEF y la técnica óptica de HSI, son las herramientas indicadas para adquirir imágenes con información sobre la actividad metabólica del tejido. Con la ventaja de que utilizando la señal de TPEF ganaremos profundidad de penetración. La diferencia en la profundidad entre estas técnicas ópticas para adquirir imágenes, es debido a que en la señal de TPEF la muestra es excitada por un láser con longitud de onda en región de luz infrarroja, a comparación de la técnica óptica de HSI en donde la muestra se excita con un haz de luz con longitud de onda en región de luz visible.

En conjunto, estas técnicas ópticas son herramientas poderosas que nos posibilitan el estudio de tejidos biológicos como la vejiga, otorgando información detallada estructural de la vejiga y la actividad metabólica existente.

## Ventanas biológicas

En general cuando un fotón interactúa con un tejido pueden ocurrir tres fenómenos los cuales son: reflexión, transmisión o absorción. En el caso en donde es absorbido, su energía se transfiere a una molécula o átomo.

Durante este proceso de absorción, en el caso en que este sea un fluoróforo, el fotón deja de existir y el fluoróforo se excita, lo que puede dar lugar a una reacción fotoquímica o a la disipación de la energía en forma de calor o emisión de luz[13].

Las ventanas biológicas se refieren a un conjunto de rangos del espectro electromagnético donde la absorción tiene mínimos locales: la primera ventana del infrarrojo cercano abarca entre @700 nm hasta @950 nm (NIR-I, primer infrarrojo cercano), la segunda ventana del infrarrojo cercano cubre desde @1000 hasta @1350 nm (NIR-II, segundo infrarrojo cercano), y la tercera ventana del infrarrojo cercano comprende de @1550 a @1870 nm (NIR-III, tercer infrarrojo cercano)[14] , En la ilustración siguiente se compara la absorción de las propiedades ópticas generales pertenecientes a los tejidos biológicos, ver ilustración 5.

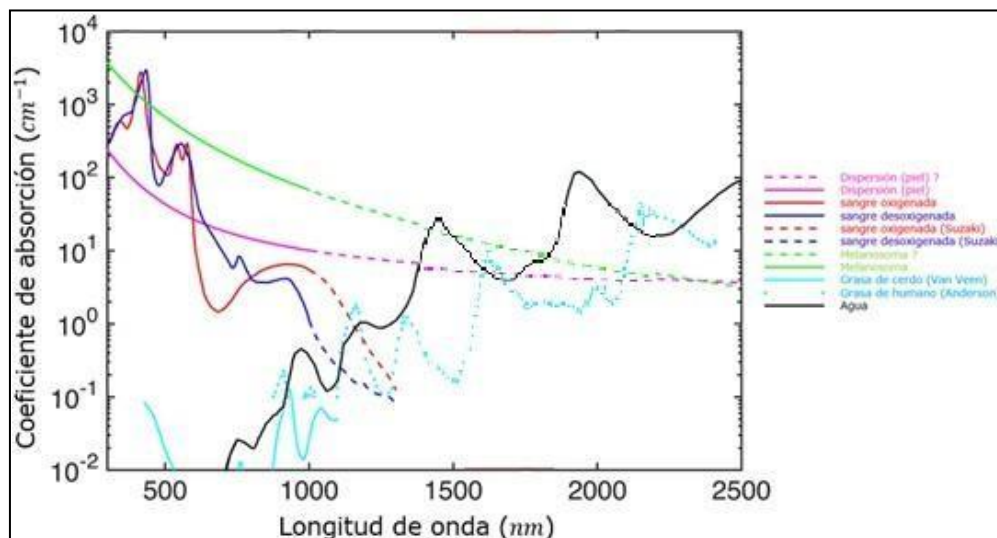


Ilustración 5.-Grafica tomada y modificada del sitio web <https://omlc.org/>, los autores originales de esta ilustración son un conjunto de científicos que llevaron a cabo esta recopilación de datos. La grafica compara la absorción de las propiedades ópticas generales pertenecientes a los tejidos biológicos (agua, oxihemoglobina, desoxihemoglobina, melanina, grasa y dispersión en piel)[15].

En las ventanas biológicas descritas NIR I, II y III, existe un decaimiento con respecto a las curvas de absorción de la luz por el agua y la hemoglobina en los tejidos biológicos. Esto se aprovecha a favor de obtener mejor adquisición de imagen debido a que existe mayor cantidad de luz para ser colectada por los detectores. Cabe mencionar que, de acuerdo con esta información, se puede pensar en trabajar con láseres a mayores longitudes de onda, pertenecientes por ejemplo a la III ventana biológica, que permitan penetrar a mayor profundidad en el tejido, perdiendo la menor cantidad posible de luz debido a la absorción biológica de los tejidos.

## Actividad metabólica en vejiga

Los fluoróforos endógenos más comunes utilizados para la caracterización de tejidos biológicos incluyen aminoácidos aromáticos (tirosina, triptófano y fenilalanina), proteínas estructurales (elastina, colágenos), componentes lipídicos, porfirinas, y cofactores metabólicos enzimáticos como el dinucleótido de nicotinamida adenina reducido (NADH, *nicotinamide adenine dinucleotide*) y el dinucleótido de flavina adenina (FAD, *flavin adenine dinucleotide*) [16], ver ilustración 6.

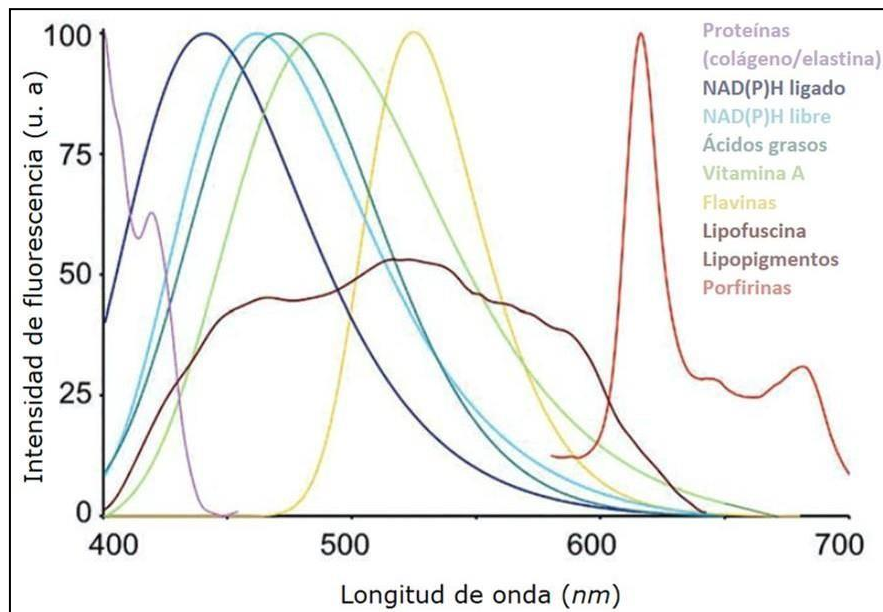
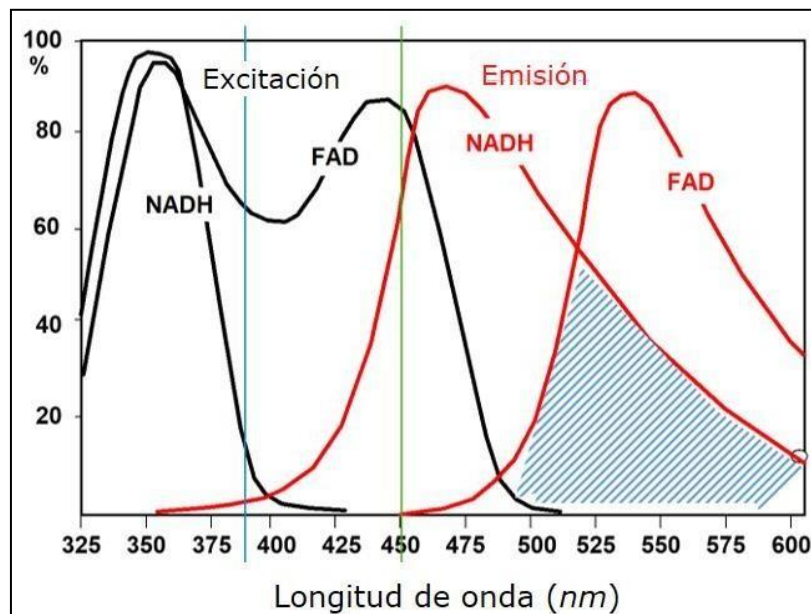


Ilustración 6.- Gráfica que compara la intensidad de la fluorescencia con respecto a la longitud de onda con la que se excita cada fluoróforo endógeno individual, se presentan los perfiles espectrales típicos de emisión de autofluorescencia [17].

El NADH y el FAD controlan las reacciones redox celulares, el metabolismo energético y las anomalías mitocondriales en diferentes condiciones fisiopatológicas[18], por lo que analizando estos metabolitos es posible realizar detección de los cambios en las propiedades funcionales de células y tejidos como la vejiga.

Una de las características que tienen estos metabolitos es que en las curvas de emisión se superponen. Lo que observamos en la ilustración 7 son las curvas de excitación y emisión, en las cuales, para poder realizar una detección independiente de estos metabolitos, se lleva a cabo una división en tres secciones en la curva de emisión, la primera ubicada en el rango de @430 nm hasta @470 nm, la segunda sección comprende un rango de @470 nm a @510 nm y la tercera sección desde @510 nm hasta @550 nm.



*Ilustración 7.- Espectros de excitación y emisión de los componentes metabólicos NADH y FAD la sección azul indica la superposición de estas curvas[19].*



## Metabolitos implicados en el cáncer (NADH y FAD)

La fosforilación oxidativa es un proceso metabólico importante que utiliza energía liberada por la oxidación de nutrientes para producir ATP. En este proceso, el NADH actúa como donante de electrones responsable de generar el gradiente de protones en la cadena de transporte de electrones (ETC, *electron transport chain*). Sin embargo, si hay interrupción en este proceso, se produce una acumulación de NADH dentro de las células. Afortunadamente, las propiedades fluorescentes del NADH y su cofactor metabólico FAD, que actúa como receptor de electrones en la ETC y se pueden aprovechar para medir la actividad del ETC en las células.

En general, se sabe que las células cancerosas tienen coeficientes redox más altos que las células sanas debido al aumento del NADH celular, ver ilustración 8. Medir la actividad del ETC y detectar cambios metabólicos drásticos en células y tejidos, proporciona información que puede ser importante para el diagnóstico de enfermedades como el cáncer[20].

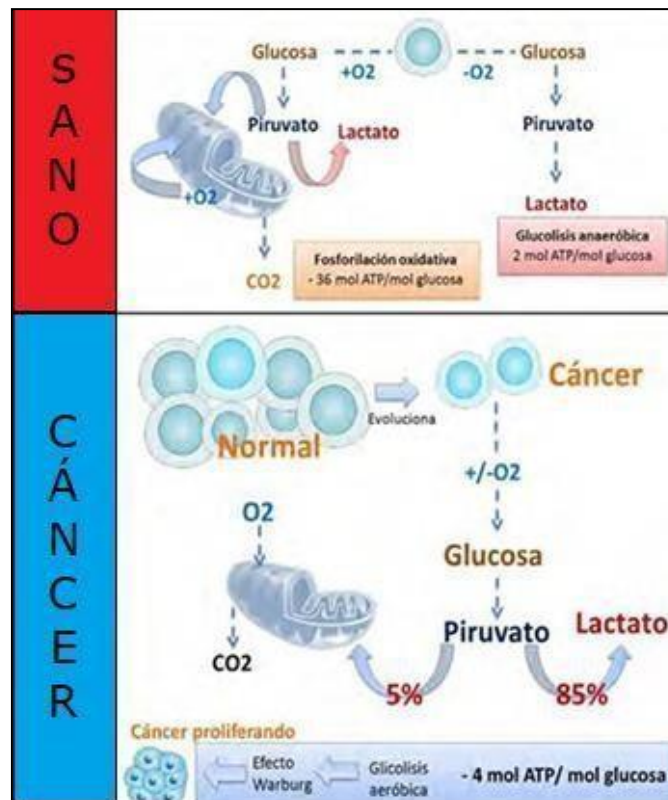
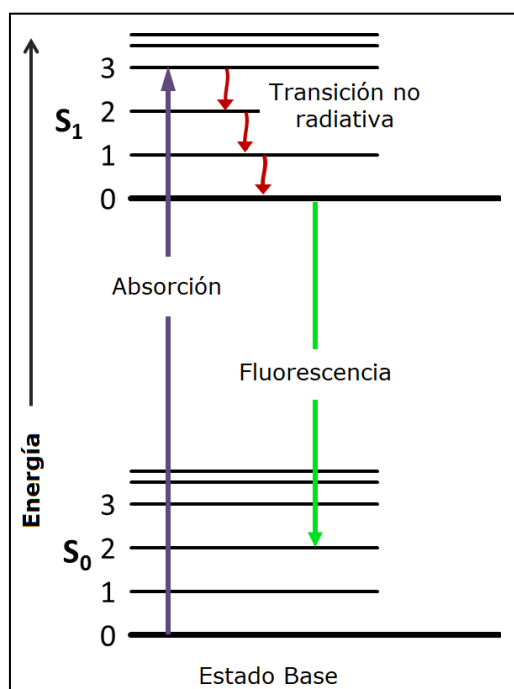


Ilustración 8.- Comparación de los procesos metabólicos en células sanas y en células con cáncer[21].

## Autofluorescencia

La autofluorescencia es un fenómeno físico, en el que una sustancia emite luz como resultado de haber sido excitada por la absorción de luz de cierta longitud de onda[22]. Este fenómeno ocurre porque la energía de la luz de excitación es absorbida por los electrones de las moléculas de la sustancia, lo que provoca su excitación a niveles de energía superiores. Cuando estos electrones vuelven a sus niveles de energía más bajos, emiten luz que puede ser detectada y utilizada para estudiar la sustancia. Una forma de representar este fenómeno es con un diagrama de Jablonski, ver Ilustración 9.



*Ilustración 9.- Fenómeno de fluorescencia representado por el diagrama de Jablonski. La absorción de la luz (azul) hace que un electrón pase a un nivel de mayor energía. Tras permanecer en este estado excitado, el electrón vuelve a su estado base y el fluoróforo disipa el exceso de energía emitiendo un fotón (verde)[23].*

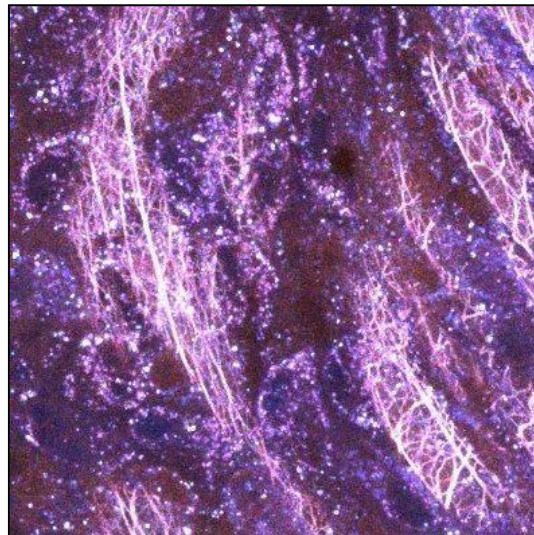
La autofluorescencia ha sido de especial interés en diversos estudios clínicos, ya que el uso de la fluorescencia endógena para la caracterización de tejidos no requiere la administración de un agente de contraste. Además, la autofluorescencia puede proporcionar información en tiempo real y permitir la visualización de tejidos en situaciones clínicas donde la obtención de una biopsia puede ser difícil o invasiva.

## Formación de imágenes hiperespectrales (HSI)

La formación de imágenes hiperespectrales es una técnica óptica en la que se captura la respuesta espectral de una muestra en diferentes longitudes de onda ver ilustración 10, lo que proporciona información detallada sobre la composición bioquímica y las características de la muestra en cuestión.

Las imágenes espectrales recogen información de tres dimensiones: dos espaciales ( $x$ ,  $y$ ) y una espectral ( $\lambda$ ), lo que da como resultado un conjunto de datos ( $x$ ,  $y$ ,  $\lambda$ ) que suele denominarse cubo de datos[24].

Un microscopio confocal hiperespectral es una variante del microscopio confocal que utiliza una técnica de espectroscopía para adquirir información sobre la respuesta espectral de una muestra. En lugar de recoger directamente la fluorescencia mediante un fotodetector, un microscopio confocal hiperespectral dispersa la luz de la muestra con un elemento de dispersión espectral, como un prisma o una rejilla, para separar la luz en sus diferentes longitudes de onda. Luego, el espectro dispersado se visualiza en una arreglo de detectores para adquirir una imagen hiperespectral de la muestra[24].

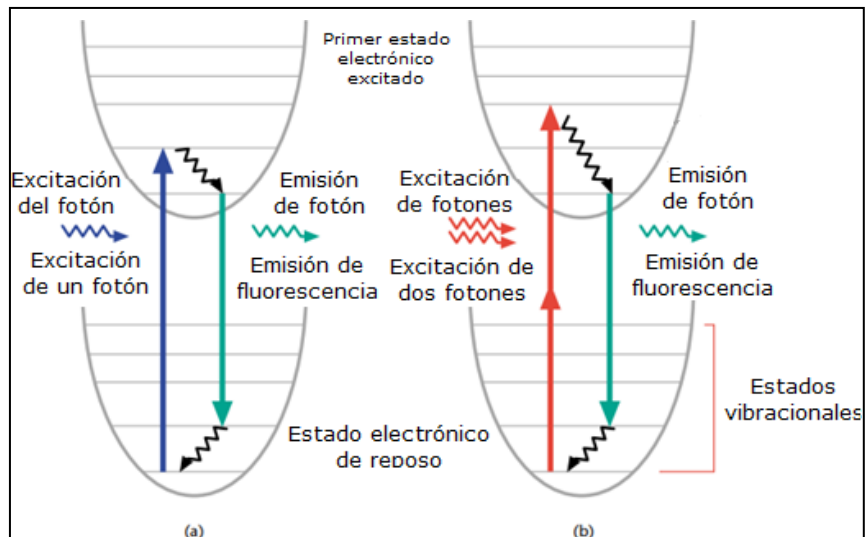


*Ilustración 10.- Imagen hiperespectral de vejiga de rata adquirida con el microscopio confocal de barrido láser Leica TCS SP8 STED 3X, esta imagen es una composición de tres canales en los colores rojo; donde la detección se hizo en el rango de @430 nm hasta @470 nm, verde; donde la detección se hizo en el rango de @470 nm hasta @510 nm, y azul; donde la detección se hizo en el rango de @510 nm hasta @550 nm.*

## Fluorescencia por excitación de dos fotones (TPEF)

La fluorescencia por excitación de dos fotones (TPEF, *two photon excitation fluorescence*) es una señal que se puede utilizar para la formación de imágenes tridimensionales de muestras biológicas con alta resolución espacial y foto daño reducido, debido a que solo excita la muestra en el punto focal del láser, permitiendo obtener imágenes precisas de regiones específicas de la muestra[25].

En la TPEF, dos fotones son absorbidos simultáneamente por un fluoróforo, dichos fotones no necesariamente tienen el mismo nivel de energía, pero cumplen con la condición de excitar al fluoróforo que los absorbe, ver ilustración 11. La fluorescencia resultante que se genera es la que se utiliza para obtener información detallada sobre estructuras celulares y tejidos biológicos.

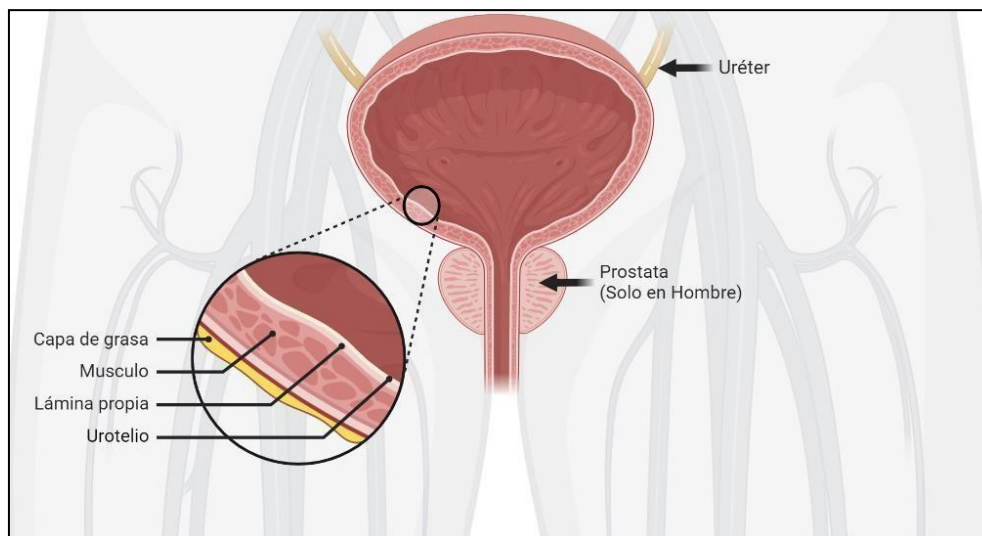


*Ilustración 11.- Diagrama de Jablonski de la excitación monofotónica (a) y bifotónica (b), que se produce cuando los fluoróforos se excitan desde el estado base hasta los primeros estados electrónicos. La excitación monofotónica se produce por la absorción de un solo fotón mientras que la excitación bifotónica se produce por la absorción de dos fotones. Tras cualquiera de los dos procesos de excitación, el fluoróforo se relaja hasta el nivel energético más bajo y el proceso de emisión de fluorescencia subsiguiente para ambos modos de relajación es el mismo[26].*

## Componentes estructurales de la vejiga

La vejiga es un órgano forma de saco hueco que se encuentra en la parte inferior del abdomen. Se mantiene en su lugar mediante ligamentos unidos a otros órganos y huesos pélvicos ver ilustración 12. Las paredes de la vejiga se relajan y expanden para almacenar orina, y se contraen y se aplanan para vaciar la orina a través de la uretra.

La vejiga tiene dos tubos estrechos llamados uréteres, estos tubos son los encargados de transportar la orina desde los riñones hasta la vejiga. Los músculos en las paredes del uréter se aprietan y relajan continuamente forzando la orina hacia abajo, lejos de los riñones y los nervios en la vejiga alertan al individuo cuando es momento de vaciar la vejiga para eliminar la orina del cuerpo[27].



*Ilustración 12.- Representación de la vejiga en donde se observan las capas de esta, los uréteres que conectan con los riñones y la próstata (solo en hombres).*

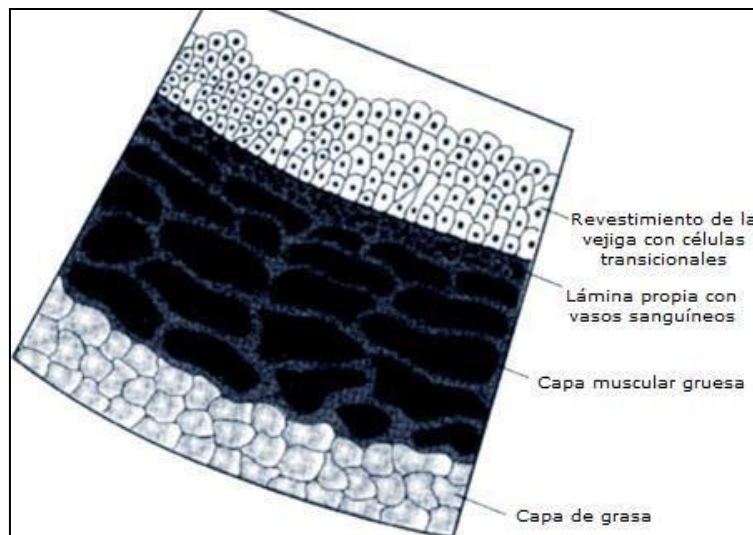
La vejiga está compuesta por varias capas, tomando de referencia la ilustración 13 estas capas tienen el siguiente orden:

Primero, en la parte más interna de la vejiga ubicamos a la capa urotelial, la cual está en contacto con la orina y pertenece a una sección llamada mucosa que es un recubrimiento conformado por células transicionales.

Seguido se encuentra la capa suburotelial o lámina propia formada por tejido conectivo y que contiene vasos sanguíneos y nervios.

En una capa consiguiente ubicamos a la capa muscular o también llamada capa *muscularis*, compuesta por musculo liso, la cual se encarga de la contracción y relajación de la vejiga permitiendo el almacenamiento y la eliminación de la orina, esta capa puede dividirse en dos secciones, el musculo longitudinal interno y el musculo longitudinal externo.

Por último, en la capa más externa de la vejiga se ubica el tejido adiposo o capa de grasa cuya función es proteger este órgano además de otros órganos pélvicos[28].



*Ilustración 13.- Representación de las capas interna de la vejiga en donde observando la imagen de arriba a abajo se encuentra: la capa urotelial, la capa de lámina propia, la capa muscular y la capa externa de grasa[27].*

## Estructura del colágeno y la relación con tejido canceroso

El colágeno es una proteína fibrosa presente en muchos tejidos, incluyendo la piel, los huesos, los tendones y los cartílagos ver ilustración 14. Es un componente importante de la matriz extracelular (MEC) que proporciona soporte estructural y resistencia a la tensión a los tejidos.

El colágeno de tipo I es uno de los principales componentes estructurales de la MEC dentro de la vejiga y forma parte de un grupo llamado colágenos fibrilares, en este grupo los colágenos contienen fibras y fibrillas altamente organizadas[29].

Es de gran importancia mencionar que la generación de tumores en el tejido epitelial suele ir acompañada de alteraciones y remodelación de la MEC [30]. Por lo que caracterizar el colágeno tipo I en el tejido puede proporcionar información para estudiar estas alteraciones.

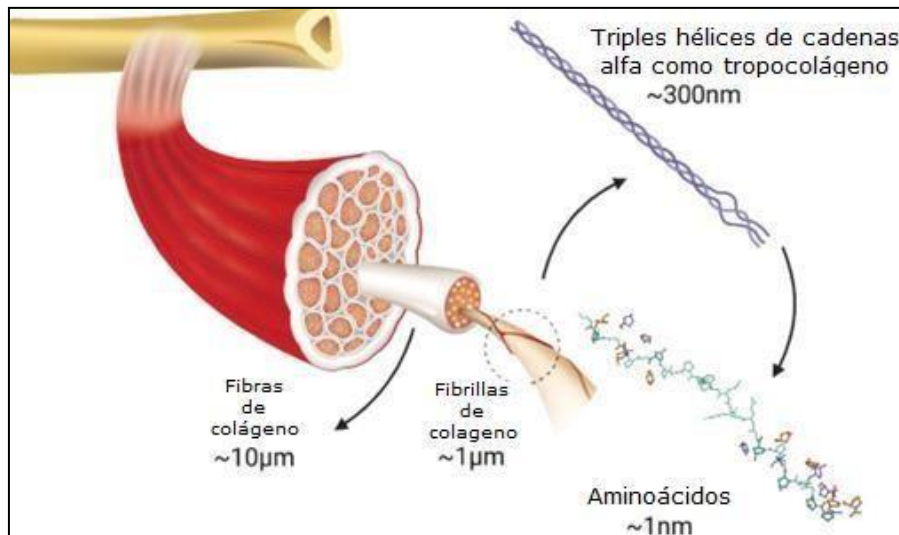


Ilustración 14.- Estructura de las fibras de colágeno [31].

## Generación de segundo armónico (SHG)

En el fenómeno óptico de SHG, una onda incidente con frecuencia  $\omega$  interactúa con un material no centro simétrico, provocando una polarización no lineal que produce una onda de segundo armónico de frecuencia  $2\omega$ , ver ilustración 15. En el proceso de la SHG, no hay dispersión de fotones incidentes, sino que los fotones interactúan con el material no lineal para producir un nuevo fotón. Además, como no hay absorción de energía, la energía total de los fotones incidentes se conserva y se transfiere al nuevo fotón emitido[32].

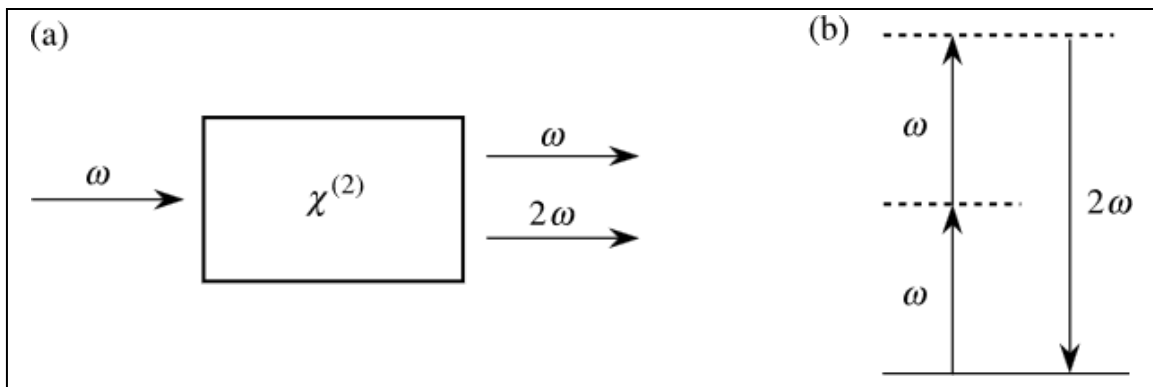


Ilustración 15.- (a) Geometría de la generación de segundos armónicos. (b) Diagrama de niveles de energía que describe la generación de segundo armónico[33].

El uso de esta señal es capaz de proporcionar información sobre la estructura de varios tejidos, tales como piel, huesos y músculos. Además, también se ha empleado para la investigación de enfermedades como el cáncer y la fibrosis, gracias a su capacidad para visualizar estructuras intracelulares sin la necesidad de marcadores fluorescentes.



## VI. Metodología

Para la caracterización óptica de la vejiga para detección temprana de cáncer mediante técnicas no lineales, se hará uso de las siguientes técnicas de microscopía:

**Formación de imágenes hiperespectrales (HSI):** El uso de esta técnica tiene como objetivo caracterizar la autofluorescencia de los principales los metabolitos presentes tanto en la vejiga como en el cáncer de vejiga.

**Fluorescencia por excitación de dos fotones (TPEF):** Al igual que la HSI se aplicará esta técnica para la identificación de los metabolitos presentes en los tejidos, con la particular diferencia de que esta técnica nos permitirá caracterizarlos en profundidad.

**Generación de segundo armónico (SHG):** Con el uso de esta técnica se identificará la distribución de las fibras de colágeno en la vejiga en las diferentes capas de la vejiga. Para adentrarnos en profundidad a través de la vejiga se utilizarán láseres infrarrojos en dos diferentes longitudes de onda, láser titanio-zafiro @800nm y láser de fibra Ytterbium @1030nm.

Las imágenes de esta tesis fueron realizadas en grupo de investigación en microscopía óptica de superresolución y nanoscopía (SLN, *Super-resolution Light Microscopy & Nanoscopy*) del instituto de ciencias fotónicas (ICFO), en Barcelona, España, en los microscopios:

**Microscopio confocal de barrido láser Leica TCS SP8 STED 3X:** Microscopio comercial con la capacidad de generar imágenes en diferentes longitudes de onda, los rangos espectrales de los detectores pueden ser sintonizados libremente lo que permite generar imágenes hiperespectrales.

**Microscopio multimodal:**

Sistema personalizado por el grupo SLN en el cual se ha adaptado un microscopio invertido (Eclipse Ti, Nikon) para realizar microscopía no lineal, al sistema se le aplican diferentes filtros y espejos para la formación de imágenes con las respectivas señales de SHG y TPEF.

## Configuración de los microscopios

A continuación, se describen las configuraciones de los microscopios con los que cuenta el grupo de investigación SLN, el microscopio multimodal y el microscopio confocal de barrido láser Leica TCS SP8 STED 3X.

### Microscopio multimodal

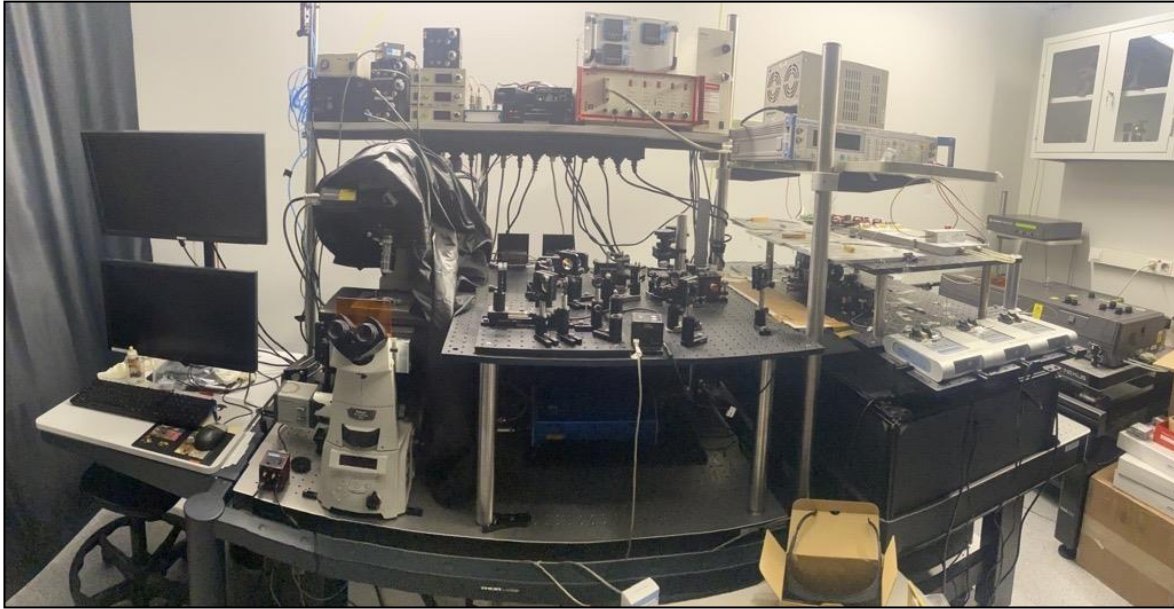
Este sistema óptico es una adaptación del microscopio invertido Eclipse Ti Nikon con la finalidad de realizar microscopía no lineal ver ilustración 16. Usa un láser pulsado de femtosegundos. El láser se escanea con dos espejos galvanométricos en configuración tándem, posteriormente se expande con dos lentes, la primera de ellas con longitud focal de 50cm y la segunda con 300 cm de longitud focal. El haz se dirige a dicho objetivo con el uso de un espejo dicróico divisor pasa bajas (DMS 900 nm, *dichroic mirror short pass*), utilizado para dejar pasar el haz de luz generado por el láser titanio-zafiro correspondiente a @800 nm y reflejar el haz de luz generado por el láser de fibra Ytterbium correspondiente a @1030nm, como se puede visualizar en la ilustración 17.

El objetivo del microscopio utilizado es un objetivo de aire de 20x de Nikon con una apertura numérica de 0.75, que se utiliza para enfocar el haz sobre la muestra. La señal SHG se detecta mediante un tubo fotomultiplicador (PMT, photo multiplier tube) modelo H7422-40 de Hamamatsu, junto con un espejo dicróico (FF665-Di01) y un filtro IR (FGB37-A).

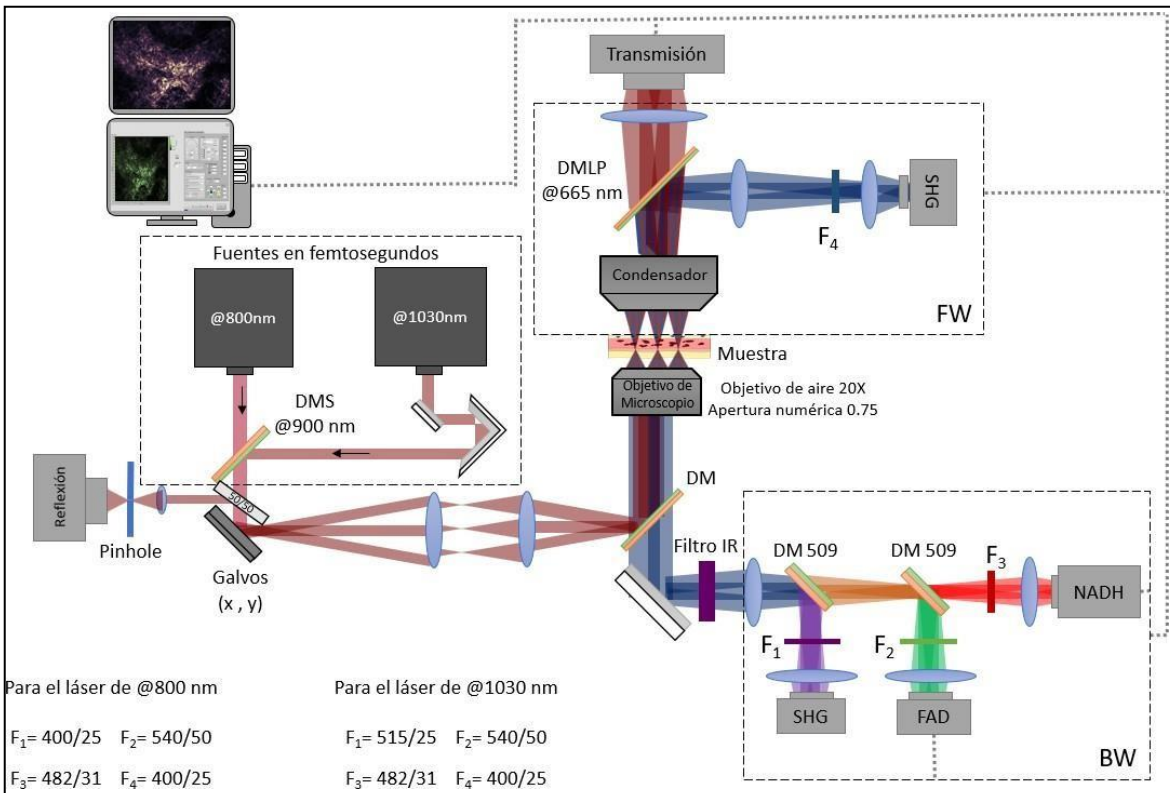
Para la detección de la señal SHG en el láser de @800 se hace uso de un filtro centrado en 800 nm (400/25, Thorlabs) y para el láser de @1030 se emplea un filtro centrado en 515 nm (515/25, Thorlabs).

En ambos casos para la detección de la señal TPEF, dividimos el haz de luz con un espejo dicróico (DM 509) y utilizamos filtros para separar la autofluorescencia de los metabolitos NADH con un filtro (482/31, Thorlabs) y FAD con un filtro (540/50, Thorlabs).

La adquisición de imágenes se realizó con un software propio basado en LabVIEW.



*Ilustración 16.- Microscopio invertido Eclipse Ti Nikon adaptado para microscopia no lineal y equipo de adquisición de imagen.*



*Ilustración 17.- Esquema del sistema óptico del microscopio multimodal en donde se puede visualizar el recorrido de los láseres infrarrojos al pasar por todo el sistema hasta llegar a los detectores.*

## Microscopio confocal de barrido láser Leica TCS SP8 STED 3X

La formación de imágenes con la técnica de HSI se tomaron haciendo uso del microscopio confocal de barrido láser Leica TCS SP8 STED 3X, ver ilustración 18. Este microscopio es comercial y se basa en el microscopio confocal TCS SP8. El sistema incluye una fuente de láser de luz blanca en longitudes de onda de excitación con el rango de @470 nm a @670 nm y un láser semiconductor de @405 nm.

El microscopio Leica TCS SP8 STED 3X, cuenta con 3 objetivos de microscopio, 10x, 63x, 100x. Está equipado con un PMT que detecta en dirección de la propagación de la luz en la muestra y 4 detectores en dirección contraria de la propagación de la luz en la muestra, 2 de ellos son detectores confocales híbridos Leica (HyD, *hybrid detector*) y los otros 2 son detectores PMTs.



*Ilustración 18.- Microscopio confocal de barrido láser Leica TCS SP8 STED 3X.*

## Montaje de muestras

El proceso de obtención de una muestra de vejiga de rata y su posterior seccionamiento en diferentes grosores para su análisis en microscopio es un procedimiento que requiere gran cuidado y atención a los detalles, después de la disección la vejiga, esta se limpia y divide en dos partes iguales, para posteriormente montarlas entre un portaobjetos y un cubreobjetos, una vez realizado lo anterior, se sella la muestra y se deja secar antes de visualizarla al microscopio. Este proceso se encuentra descrito en detalle en el Apéndice ii. Una vez la muestra está lista, se coloca en la platina del microscopio y se asegura con pinzas, asegurándose de que el cubreobjetos esté orientado hacia el objetivo, de esta manera, se garantiza una correcta visualización.

## Análisis de imágenes

Las imágenes obtenidas a diferentes profundidades de la vejiga de rata se analizan para identificar información relevante como las estructuras presentes y determinar que tanto se penetró en función de la longitud de onda del láser utilizado. Las imágenes adquiridas con las señales de SHG y TPEF son de imágenes de 512x512 píxeles, mientras que las imágenes de la técnica HSI son de 1048x1048 píxeles, todas las imágenes se procesaron con el software FIJI (ImageJ, versión 1.50i).

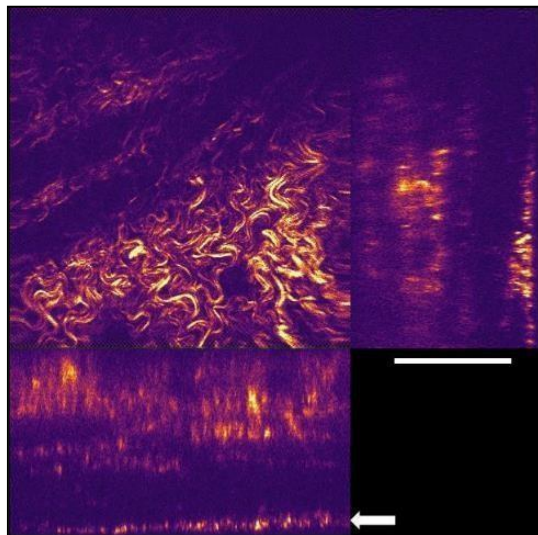
Las imágenes se corrigieron con respecto al tamaño del pixel dependiendo del zoom utilizado. Aplicamos una a proyección máxima de intensidad en donde logramos observar la estructura de las fibras de colágeno. Optimizamos el contraste de la imagen y aplicamos filtros los cuales se utilizan para diferenciar los canales entre SHG (Generación de segundo armónico, *second harmonic generation*), TPEF (fluorescencia de excitación de dos fotones, *two-photon excitation fluorescence*), RFL (Reflexión, *Reflection*) o TRN (Transmisión, *Transmission*).

El análisis y el procesamiento de las imágenes se encuentra detallado en el Apéndice iii.

## VII. Resultados y Discusiones

### Visualización de las fibras de colágeno en vejiga.

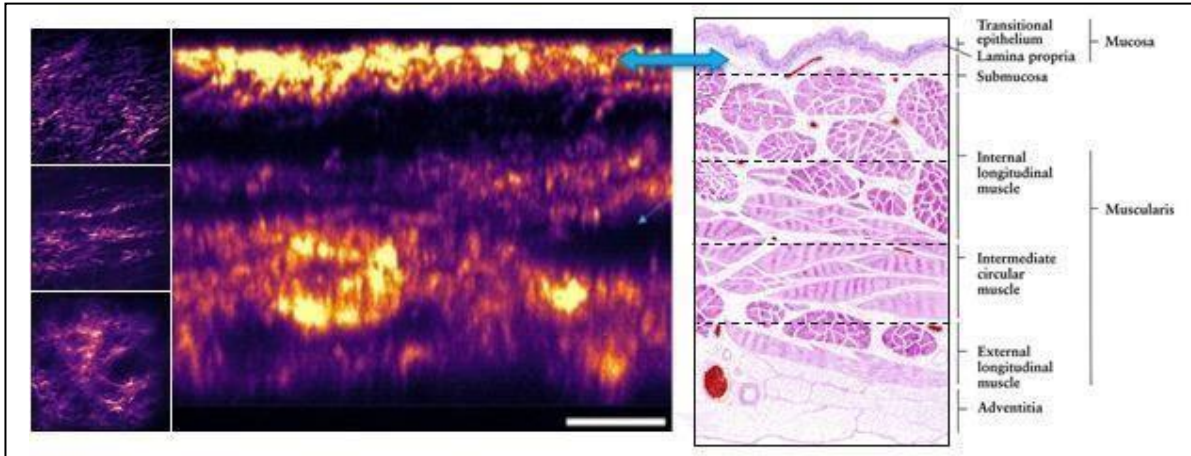
De las imágenes generadas mediante SHG se revela la distribución de las fibras de colágeno. Esto se aprecia en la ilustración 19, donde se muestra una vista ortogonal del stack de imágenes de SHG, estas imágenes fueron generadas con el láser de @1030 nm, el tamaño de pixel es de 512x512 por imagen y la profundidad de este stack de imágenes es de 150  $\mu\text{m}$ . Las fibras exhiben distintos patrones de distribución según la profundidad en la que se encuentran.



*Ilustración 19.- Vista ortogonal del SHG producido en una vejiga de rata, usando el láser @1030nm, la sección más externa marcada con una flecha representa la capa externa llamada la lámina propia. Imagen generada con profundidad de 150  $\mu\text{m}$  a través de toda la vejiga. El video está en el siguiente [link](#)*

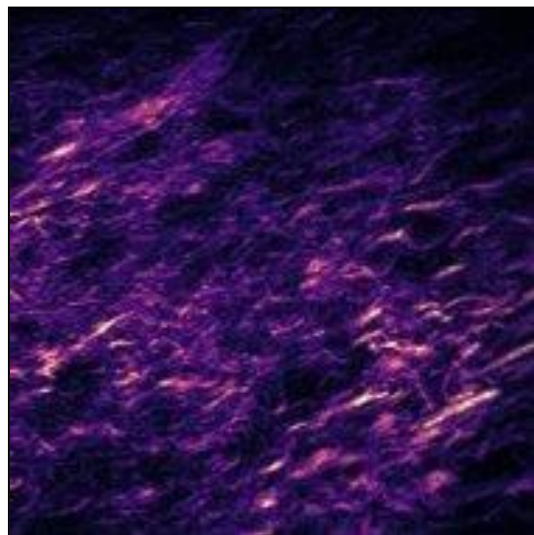
En el presente estudio, se adquirieron y recopilamos más de 100 imágenes de SHG. Estas imágenes adquiridas son muestras de vejigas de ratas y proporcionaron una amplia gama de información sobre la distribución de las fibras de colágeno y las estructuras celulares en este órgano.

En la ilustración 20, podemos identificar el colágeno perteneciente a las capas de la mucosa y las capas muscularis, estas secciones las relacionamos en función de la profundidad a la que penetramos en la vejiga.



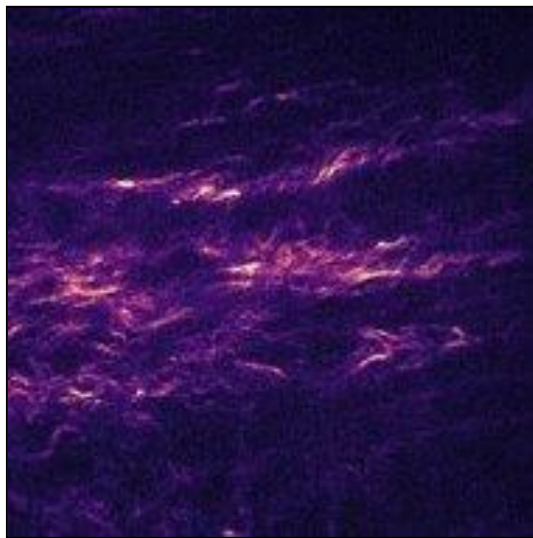
*Ilustración 20.- Comparación de la vista ortogonal del colágeno contra una ilustración que representa como están distribuidas las capas de la matriz extracelular y las capas muscularis, la flecha azul indica la capa de la lámina propia en donde se encuentra mayor cantidad de estas fibras, el stack de imágenes fue adquirido haciendo uso del láser de @1030 nm.*

Por debajo del epitelio, se encuentra una capa llamada lámina propia, en donde al realizar la adquisición de imágenes de la señal de SHG con el láser de @1030 nm observamos una abundante presencia de fibras de colágeno que se distribuyen de manera ordenada, como se puede apreciar en la ilustración 21. Esta disposición estructurada de las fibras otorga a la vejiga una mayor resistencia y capacidad de soporte en esta zona.



*Ilustración 21.- Colágeno de la sección donde se encuentra la lámina propia, esta imagen es de los primeros 3µm de una vejiga de rata completa, tomando en cuenta que la capa del epitelio se mira en dirección al objetivo de microscopio, para la generación del SHG se utilizó el láser de @1030 nm.*

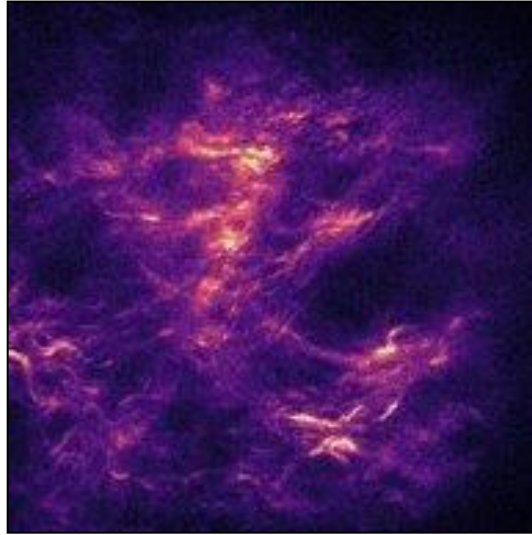
Subsecuente a la lámina propia, se encuentra la capa muscularis, esta se divide en dos regiones, el músculo longitudinal interno y el músculo longitudinal externo. De acuerdo con la profundidad a la que nos encontramos al observar esta distribución de fibras de colágeno, en la ilustración 22 se puede relacionar con el colágeno perteneciente al musculo longitudinal interno, en esta capa observamos que la distribución de las fibras sigue estando ordenada, aunque con menos cantidad de fibras en comparación con la capa lámina propia.



*Ilustración 22.- Fibras de colágeno relacionado con el musculo longitudinal interno, ubicadas a 100 $\mu$ m de profundidad en una vejiga de rata, tomando en cuenta que la capa del epitelio se mira en dirección al objetivo de microscopio, esta capa se relaciona con el musculo longitudinal interno debido a la profundidad a la que se encuentra.*

En marcado contraste con la capa anteriormente mencionada, al penetrar cerca de 140 $\mu$ m en esta muestra ubicamos una notable diferencia en cuanto a la distribución de las fibras de colágeno. En esta región, la organización de las fibras muestra un patrón caótico y desordenado, como se puede apreciar en la ilustración 23, aquí podemos relacionar esta sección con la capa músculo longitudinal externo de la vejiga debido a la profundidad en la que nos encontramos.

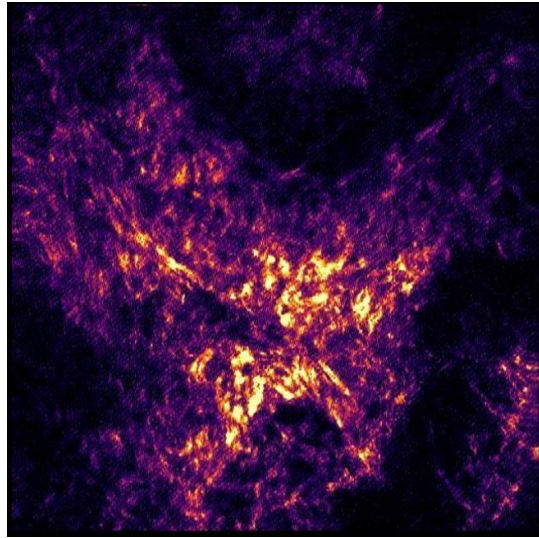




*Ilustración 23.- Fibras de colágeno relacionado con el musculo longitudinal externo ubicada a 145 $\mu$ m de profundidad en una vejiga de rata, tomando en cuenta que la capa del epitelio se mira en dirección al objetivo de microscopio, esta capa se relaciona con el musculo longitudinal externo debido a la profundidad a la que se encuentra*

La profundidad en la que penetra este láser de @1030 nm, es a través de toda la vejiga, permitiéndonos recolectar toda la información en profundidad sobre la distribución de las fibras de colágeno. Esta disposición caótica de las fibras en el músculo longitudinal externo puede atribuirse a su función contráctil y el continuo estiramiento y relajación que experimenta durante el llenado y vaciado de la vejiga. A pesar de su apariencia desorganizada, este entramado de fibras contribuye a la elasticidad y flexibilidad necesarias para el adecuado funcionamiento de la vejiga en su conjunto.

En la generación del SHG utilizando el láser de @800 nm la profundidad a la que penetramos fue menor a la del láser de @1030 nm como se aprecia en la ilustración 24. Pudiendo identificar únicamente la capa lamina propia.



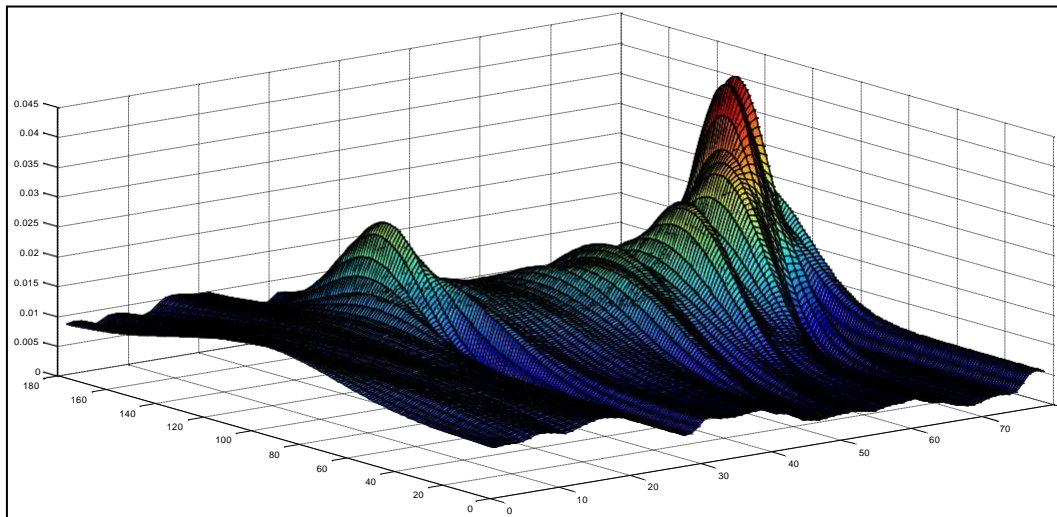
*Ilustración 24.- Colágeno en los primeros 3  $\mu\text{m}$  de una vejiga de rata, generada con el láser @800 nm, tomando en cuenta que la capa del epitelio se mira en dirección al objetivo de microscopio esta capa la podemos relacionar con la lámina propia debido a la profundidad a la que se encuentra.*

Con el objetivo de organizar y gestionar de manera eficiente esta gran cantidad de datos, se elaboró una base de datos en formato de tablas. Esta base de datos contiene una variedad en muestras y parámetros, como la técnica óptica utilizada, la longitud de onda del láser y región de la vejiga analizada. Cada imagen adquirida se asoció con su respectiva descripción y metadatos correspondientes. Esto permitió filtrar datos según diferentes criterios y realizar análisis comparativos entre las diferentes muestras.

## **Distribución de las fibras de colágeno**

Para visualizar la direccionalidad de las fibras de colágeno en las diferentes capas de la vejiga, aplicamos un complemento llamado "direccionalidad" del software ImageJ que se usa para inferir la orientación preferida de las estructuras presentes en la imagen, además, se empleó la herramienta "histograma" del mismo software, esta herramienta permite representar gráficamente los niveles de intensidad presentes en la imagen.

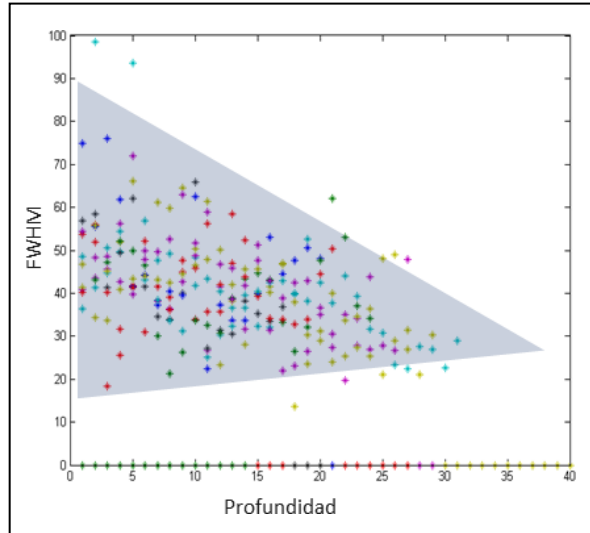
Posteriormente, usando el programa MATLAB, se generó una representación gráfica en 3D que nos permite visualizar en forma de superficie la dirección y distribución de las fibras de colágeno a diferentes profundidades. Cuanto más prominente es una región en la superficie, indica una mayor direccionalidad de las fibras de colágeno en esa capa de la vejiga, como se puede apreciar en la ilustración 26.



*Ilustración 25.- Histograma de superficie en donde se representa la direccionalidad y distribución de las fibras de colágeno en profundidad, la alta prominencia indica mayor tendencia de orden de las fibras de colágeno en esa profundidad.*

El resultado de todo el análisis de direccionalidad se agrupó en una grafica donde se midió el ancho de la curva asociado a la direccionalidad de cada fibra de colágeno, agrupándolas según su profundidad correspondiente.

Al realizar un análisis a los datos obtenidos, utilizando el concepto de Ancho Completo a la Mitad del Máximo (FWHM, *Full Width at Half Maximum*), se generó una gráfica que nos permite identificar la distribución de la dirección de las fibras de colágeno, como se muestra en la ilustración 27.



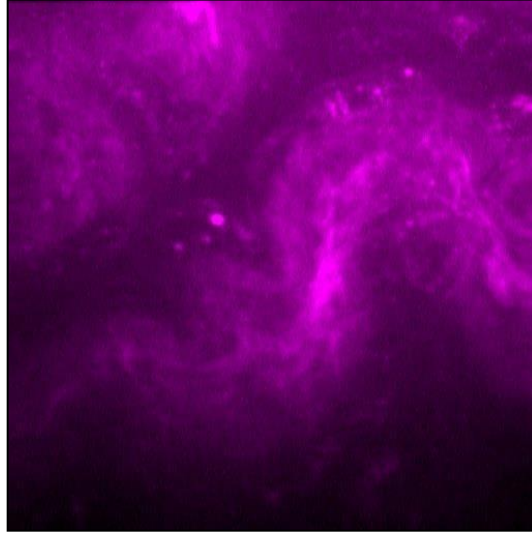
*Ilustración 26.- Gráfica de distribución de la dirección en las fibras de colágeno en función de la profundidad a la que se encuentran.*

## **Visualización de los componentes metabólicos de la vejiga.**

Las técnicas de imagen del HSI y la formación de imágenes con la señal de TPEF, nos ha permitido realizar observaciones detalladas de las estructuras celulares presentes en la vejiga de rata. La combinación de estas dos técnicas nos brinda una visión completa y enriquecida de las características morfológicas y una idea de la composición bioquímica de las células en la vejiga.

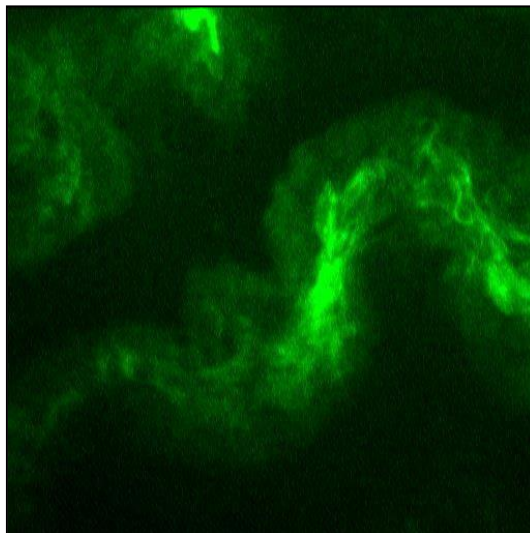
La adquisición de imágenes utilizando la señal de TPEF se llevó a cabo utilizando el microscopio multimodal adaptado con los láseres de @800 nm y @1030 nm.

Los resultados arrojados con el láser de @800nm nos demuestran la eficiencia en la que se encuentra esta longitud de onda para generar dicho fenómeno, tal como se muestra en la ilustración 28.

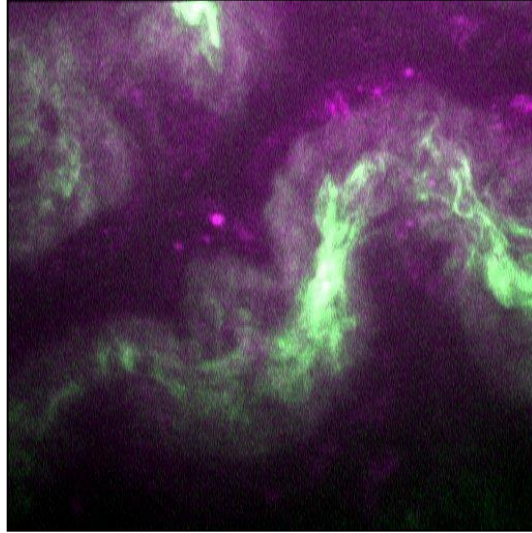


*Ilustración 27.- Proyección máxima del stack de imágenes adquiridas con la señal de TPEF usando el láser de @800 nm.*

Al mismo tiempo de adquirir el stack de imágenes para TPEF, se adquirió la señal de SHG como se aprecia en la ilustración 29. Comparando esas imágenes podemos verificar que existe autofluorescencia no solo en las regiones donde se encuentra colágeno como observamos en la ilustración 30.



*Ilustración 28.- Proyección máxima del stack de imágenes adquiridas con la señal de SHG usando el láser de @800 nm.*



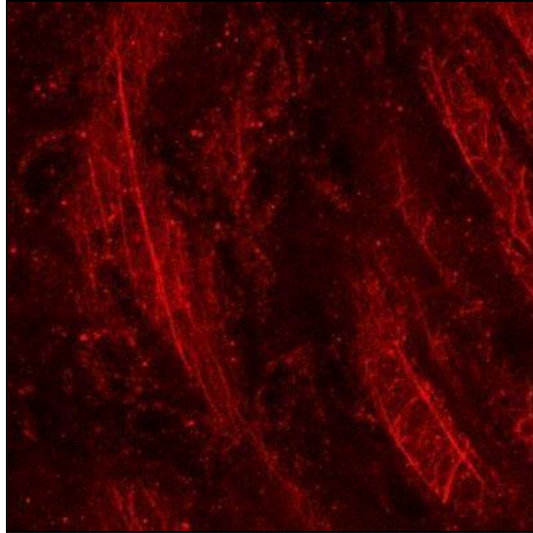
*Ilustración 29.- Comparación del stack de imágenes adquiridas con las señales de SHG y TPEF usando el láser de @800 nm en donde se observa la diferencia existente.*

No obtuvimos resultados en la detección de TPEF utilizando el láser halite @1030 nm.

Con el uso del microscopio confocal de barrido láser Leica TCS SP8 STED 3X, generamos imágenes de la autofluorescencia de toda la vejiga en profundidad. Idealmente la longitud de onda de excitación para identificar los metabolitos debería ser @375 nm, sin embargo, el microscopio Leica cuenta con solo dos láseres, uno de ellos con longitud de onda en @405 nm. Debido a que esta es la longitud de onda más corta con la que contamos en el laboratorio, todas fueron excitadas con este láser.

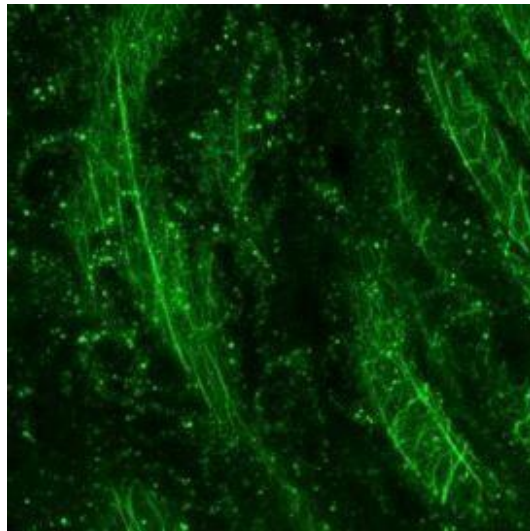
Los metabolitos NADH y FAT comparten un espectro de emisión bastante amplio. Por lo que para poder identificar por separado NADH, FAD y el colágeno entre cada canal de detección, separamos 3 rangos de longitudes de onda en los detectores al realizar las adquisiciones.

La primera región ubicada desde @430 nm hasta @470 nm, ver ilustración 31.



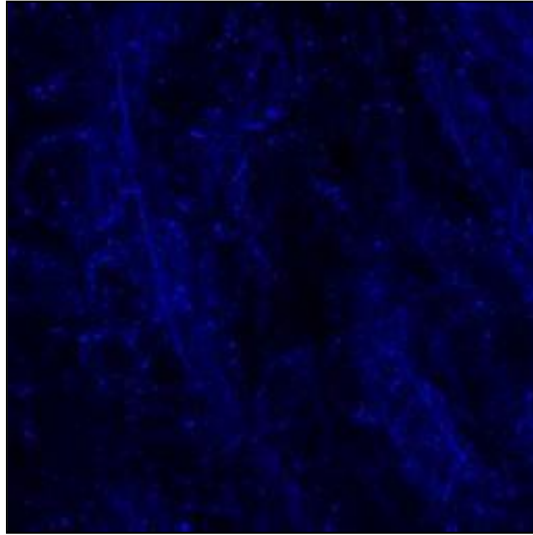
*Ilustración 30.- Canal 1 correspondiente a la intensidad máxima en las imágenes de la primera región de detección del barrido que comprende desde @430 nm hasta @470 nm, en esta región acorde a la literatura predomina la curva de excitación del NADH.*

La segunda región abarco desde @470 hasta @510 nm, ver ilustración 32.



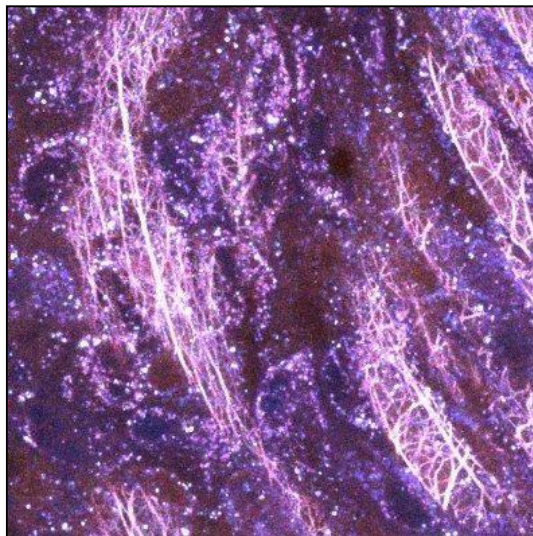
*Ilustración 31.- Canal 2 correspondiente a la intensidad máxima en las imágenes de la segunda región de detección del barrido que comprende desde @470 nm hasta @510 nm, en esta región acorde a la literatura predomina la curva de excitación del FAD.*

La tercera región comprendió desde @510 nm hasta @550 nm, ver ilustración 33.



*Ilustración 32.- Canal 3 correspondiente a la intensidad máxima en las imágenes de la tercera región de detección del barrido que comprende desde @510 nm hasta @550 nm, en esta región acorde a la literatura predomina la curva de excitación del colágeno.*

Por último, se realizó una composición de los tres canales para identificar las diferencias existentes, ver ilustración 34.



*Ilustración 33.- Imagen compuesta por los tres canales en donde se realizaron las detecciones, aquí podemos notar de manera más clara las diferencias que existe entre cada canal identificando presencia en el color correspondiente a cada estructura detectada y predominando la coloración blanca en estructuras donde se comparte información estructural en autofluorescencia.*



Cabe mencionar que también se realizaron pruebas en @515 nm que es el equivalente a TPEF en el láser halite @1030 nm para identificar alguna estructura o autofluorescencia de algún metabolito, en resultado de estas pruebas, no se observó nada de lo mencionado por lo que no tenía sentido probarlo en el sistema de microscopio multimodal.

## **VIII. Conclusiones**

A través de los experimentos presentados se realizó un análisis de la distribución de las fibras de colágeno en profundidad con dos láseres infrarrojos.

Los resultados de este estudio respaldan la hipótesis inicial de que las técnicas ópticas, utilizando longitudes de onda específicas, pueden proporcionar una detección de estructuras en profundidad de la vejiga con el propósito de un futuro método de detección temprana y precisa del cáncer de vejiga. Se encontró que la longitud de onda en el espectro del primer infrarrojo cercano como el láser @800nm tiene una menor profundidad de penetración debido a su corta longitud de onda, sin embargo, nos proporciona información en autofluorescencia del tejido debido a que es óptimo en absorción y emisión de la señal TPEF. El láser halite @1030 nm destacó en profundidad de penetración y demostró su alta capacidad para generar la señal de SHG, consiguiendo de esta manera imágenes con información estructural del colágeno en profundidad, permitiéndonos caracterizar el tejido.

Estos hallazgos sugieren que la detección óptica podría ser una alternativa prometedora a los métodos de diagnóstico invasivos actualmente utilizados. La relevancia de esta investigación radica en su contribución a la búsqueda de alternativas no invasivas y alta capacidad en profundidad de penetración para la detección temprana del cáncer de vejiga.

La aplicación clínica de estos resultados podría tener un impacto significativo en la práctica médica, al proporcionarnos una primera información de la caracterización del tejido en profundidad. Además, este estudio sienta las bases de futuras investigaciones en el desarrollo de técnicas ópticas avanzadas y personalizadas para la detección y el monitoreo del cáncer de vejiga en tiempo real.

En conclusión, este estudio proporciona evidencia sólida sobre la capacidad de los métodos ópticos y la selección de longitudes de onda para la detección en penetración de estructuras y elementos autofluorescentes implicados en tejido, como lo es la vejiga de rata, estos hallazgos respaldan la búsqueda de enfoques no invasivos y eficientes en profundidad para el diagnóstico temprano del cáncer de vejiga.

## **IX. Apéndices**

### **i. Interacción de la luz en tejidos biológicos**

La interacción de la luz con los tejidos biológicos es un fenómeno complejo y depende de varios factores, incluyendo la longitud de onda de la luz, la composición del tejido y su estructura. Los tejidos biológicos dan lugar a varios fenómenos, algunos de los más comunes y que estamos interesados en esta tesis son<sup>[34]</sup>:

- **Reflexión:** Cuando la luz interactúa con un material una cierta cantidad de luz se refleja, esta es dependiente de la diferencia en los índices de refracción entre los dos medios y del ángulo de incidencia de la luz<sup>[35]</sup>.
- **Absorción:** La absorción es el proceso por el cual un electrón de un átomo o molécula absorbe un fotón y aumenta su energía de manera que sube a un nivel electrónico superior<sup>[36]</sup>.
- **Autofluorescencia:** La autofluorescencia es un fenómeno físico, en el que una sustancia emite luz como resultado de haber sido excitada por la absorción de luz de cierta longitud de onda<sup>[22]</sup>.
- **Esparcimiento o Scattering:** Cuando los fotones interactúan con las partículas de un material, se producen cambios en la dirección de la luz y esto se conoce como esparcimiento o scattering. Este fenómeno ocurre en cualquier medio que esté formado por partículas, incluyendo el tejido biológico, donde las células e incluso los orgánulos que las componen pueden actuar como dispersores de la luz<sup>[35]</sup>.

## ii. Preparación de muestras

Nuestros colaboradores encargados, el Dr. Jesus Planaguma y la estudiante de doctorado Marina Cunquero, se encargaron de sacrificar a la rata de manera ética y siguiendo un debido protocolo. Luego, una vez extraída la vejiga de la rata se nos proporciona para eliminar los tejidos circundantes que no se requieran para el estudio. Una vez que la vejiga está limpia, dependiendo de si la muestra será estudiada en fresco o fijada aplicamos el debido procedimiento.

Para el estudio de la vejiga fresca primero se coloca sobre una superficie plana y se secciona cuidadosamente a lo largo de su eje longitudinal, dividiéndola en dos partes sin separarla, únicamente para expandir el área en la que se seccionaran en grosores ver ilustración 35 e ilustración 36.



*Ilustración 34.- Seccionamiento de la vejiga completa de rata a lo largo de su eje longitudinal.*



*Ilustración 35.- Estiramiento de la vejiga de rata después del corte longitudinal para posteriormente situarla en el portaobjetos.*

Posteriormente la vejiga se introduce en agarosa para poder hacer las divisiones pertinentes con la herramienta llamada vibratomo que se encuentra en las instalaciones del ICFO, este instrumento nos permite cortar secciones finas y precisas de tejido con una precisión de hasta 100  $\mu\text{m}$  ajustándolo a diferentes grosores de corte según lo requerido para el análisis.

Para mantener la vejiga de rata encapsulada sin que sufra deformación por la tensión superficial, debido a que la muestra se encuentra en una solución salina tamponada con fosfato (PBS), se ideó el uso de una barrera alrededor de la muestra entre el portaobjetos y el cubreobjetos con capas de cinta tape doble cara que cuenta con la característica de tener un grosor de 100  $\mu\text{m}$  ver ilustración 37, se proceden a recubrir los bordes con esmalte transparente, evitando así, el desbordamiento del PBS donde se encuentra inmersa la muestra.



*Ilustración 36.- Vejiga separada por cinta tape doble cara y recubierta con esmalte transparente.*

En el caso de las secciones de vejiga de rata que se fijaron, después de limpiar la vejiga, se envió a nuestros colaboradores del Instituto de investigación en biomedicina (IRB, *Institute for research in biomedicine*) los cuales realizaron las secciones con una precisión de hasta (25nm) obteniendo así las secciones de la vejiga con grosores de 25  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$  y 200  $\mu\text{m}$ .

Nuestra colaboradora la Dra. María Marsal se encargó de preparar las muestras para fijarlas, para ello procedió a aplicar formaldehído en un porcentaje de 10% por un tiempo de 6 horas.

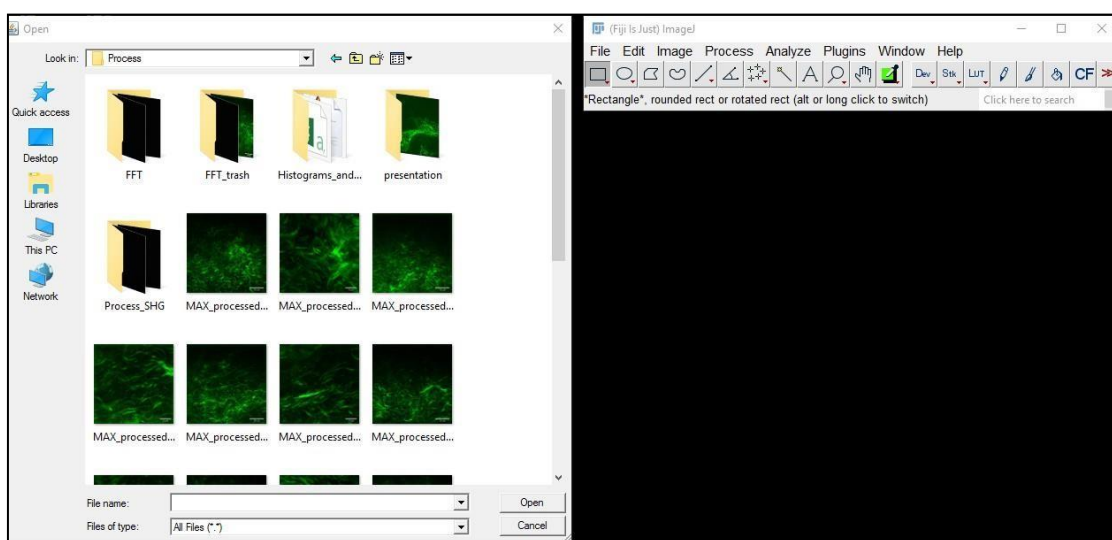
Además, la Dra. Marial Marsal se enfocó también en la tinción de las muestras de vejiga para identificar las siguientes características:

- Marcador de anticuerpos contra colágeno tipo I con reactivo AF568
- Marcador nuclear con DRAQ5
- Marcador de actina con faloidina

### iii. Análisis y procesamiento de imágenes

Para el procesamiento de las imágenes obtenidas mediante las señales de SHG, TPEF y HSI, se empleó el software ImageJ. Este software permite manipular, mejorar y analizar imágenes en diversos formatos. Además de contar con una interfaz intuitiva y cómoda.

Al ejecutar el programa ImageJ nos despliega una interfaz en la cual debemos cargar la imagen deseada, asegurándonos que la imagen tiene el formato compatible TIFF ver ilustración 38.



*Ilustración 37.- Interfaz de ImageJ en donde el stack de imágenes en formato FFT se abre arrastrándolo directamente o usando la opción de "open" en la sección "File".*

Una vez abierto el stack de imágenes que deseamos procesar, se realiza lo siguiente:

**Delimitación de secciones:** Debido a que en secciones del inicio y el final del stack no hay información relevante, se eliminan por completo ya que no tienen información para procesar. Cabe destacar que dichas secciones eliminadas se tenían contempladas ya que en la adquisición del stack queríamos obtener toda la información posible.

**Tamaño de pixel:** Este depende del zoom cuando adquirimos la imagen, para el alto y ancho de la imagen en un zoom 1 se calibra a 0.547 y si es de zoom 4 se calibra a 0.136.

**Corrección del desplazamiento de pixel:** Cuando se adquiere una imagen en el sistema del microscopio multimodal ocurre un desplazamiento de pixel debido al escaneo, este se corrige cuando procesamos la imagen en ImageJ usando la librería "Deinterlace".

**Proyección en Z y Contraste:** Como último paso se hace una a proyección de máxima intensidad que crea una imagen de salida cuyos píxeles corresponden al valor máximo de cada posición de píxel (x, y) en todas las imágenes de la pila (z). Además, se optimiza el contraste de la imagen resultante para que se pueda visualizar mejor y aplicamos filtros, los cuales solo utilizamos para diferenciar los canales entre SHG (Generación de segundo armónico, *second harmonic generation*), TPEF (fluorescencia de excitación de dos fotones, *two-photon excitation fluorescence*), RFL (Reflexión, *Reflection*) o TRN (Transmisión, *Transmission*).

Con la finalidad de optimizar tiempo de procesamiento, se elaboró un código en la herramienta llamada "Macro" del software ImageJ que realiza lo mencionado con anterioridad de manera automatizada como se observa en la ilustración 39.

```
process_all.ijm.ijm
1 path="E:/Gus/Amplitude/20221212/"
2 name="Slide_42_10_01_10stp"
3 rename(name);
4
5 c=3;
6 s=24;
7 //px=0.136; //zoom 4
8 px=0.547; //zoom 1
9
10 run("Properties...", "channels="+c+" slices="+s+" frames=1 unit=um pixel_width="+px+" pixel_height="+px+" voxel_depth=1");
11
12 //save RAW
13 saveAs("Tiff", ""+path+"RAW/"+name+".tif");
14
15 //
16
17 run("Deinterlace ", "method=[Evan field only]");
18 run("Deinterlace ", "method=[Odd field only]");
19
20 //save process
21 saveAs("Tiff", ""+path+"Process/"+name+".tif");
22
23 // cuando es uno no usar el gruped y quitar un close
24 run("Grouped Z Project...", "projection=[Max Intensity] group=56");
25 run("mpl-inferno");
26 run("Enhance Contrast", "saturated=0.35");
27
28
29 saveAs("Tiff", ""+path+"/Process/MAX_"+name+".tif");
30
31 run("Scale Bar...", "width=10 height=4 font=14 color=white background=None location=[Lower Right] overlay");
32 saveAs("Jpeg", ""+path+"/Process/MAX_"+name+".jpg");
33
34
35 close();
36 close();
```

Ilustración 38.- Macro del procesamiento del stack de imágenes adquiridas.

## X. Bibliografías

- [1] M. C. Metts, J. C. Metts, S. J. Milito, y C. R. Thomas, «Bladder cancer: a review of diagnosis and management», *J Natl Med Assoc*, vol. 92, n.º 6, pp. 285-294, jun. 2000.
- [2] B. L. Jacobs, C. T. Lee, y J. E. Montie, «Bladder Cancer in 2010: How Far have We Come?», *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 60, n.º 4, pp. 244-272, jul. 2010, doi: 10.3322/caac.20077.
- [3] A. M. Kamat, M. Bagcioglu, y E. Huri, «What is new in non-muscle-invasive bladder cancer in 2016?», *Turkish Journal of Urology*, vol. 43, n.º 1, pp. 9-13, feb. 2017, doi: 10.5152/tud.2017.60376.
- [4] C. Aguilera Tubet *et al.*, «Estudio comparativo entre cistoscopia, citología urinaria, NMP-22 y un nuevo método, bladder chek, en el seguimiento del cáncer vesical superficial», *Actas Urológicas Españolas*, vol. 29, n.º 3, pp. 252-256, mar. 2005.
- [5] «KARL STORZ - BLUE LIGHT CYSTOSCOPY WITH CYSVIEW® SYSTEM». Accedido: 20 de abril de 2023. [En línea]. Disponible en: [https://www.karlstorz.com/cps/rde/xbcr/karlstorz\\_assets/ASSETS/3557592.pdf](https://www.karlstorz.com/cps/rde/xbcr/karlstorz_assets/ASSETS/3557592.pdf)
- [6] S. Daneshmand *et al.*, «Blue light cystoscopy for the diagnosis of bladder cancer: Results from the US prospective multicenter registry», *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, vol. 36, n.º 8, p. 361.e1-361.e6, ago. 2018, doi: 10.1016/j.urolonc.2018.04.013.
- [7] A. Yore, «¿Qué es la cistoscopia de luz azul?», *Urology Group of FL*, 8 de diciembre de 2021. <https://www.urologygroupfl.com/es/post/qué-es-la-cistoscopia-de-luz-azul> (accedido 17 de febrero de 2023).
- [8] K. Bouchelouche, «PET/CT and MRI in Bladder Cancer», *JCST*, vol. s14, 2012, doi: 10.4172/1948-5956.S14-001.
- [9] G. Katti, S. A. Ara, y A. Shireen, «Magnetic Resonance Imaging (MRI) – A Review», vol. 3, n.º 1, 2011.
- [10] S. Verma *et al.*, «Urinary Bladder Cancer: Role of MR Imaging», *RadioGraphics*, vol. 32, n.º 2, pp. 371-387, mar. 2012, doi: 10.1148/rg.322115125.
- [11] S. J. Galgano, K. K. Porter, C. Burgan, y S. Rais-Bahrami, «The Role of Imaging in Bladder Cancer Diagnosis and Staging», *Diagnostics*, vol. 10, n.º 9, p. 703, sep. 2020, doi: 10.3390/diagnostics10090703.
- [12] «Computed Tomography (CT)», *National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering*. <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/computed-tomography-ct> (accedido 20 de abril de 2023).
- [13] J.-L. Boulnois, «Photophysical processes in recent medical laser developments: A review», *Laser Med Sci*, vol. 1, n.º 1, pp. 47-66, ene. 1986, doi: 10.1007/BF02030737.
- [14] S. Golovynskyi *et al.*, «Optical windows for head tissues in near-infrared and short-wave infrared regions: Approaching transcranial light applications», *J. Biophotonics*, vol. 11, n.º 12, p. e201800141, dic. 2018, doi: 10.1002/jbio.201800141.
- [15] «News and articles on Biomedical Optics and Medical Lasers». <https://omlc.org/news/index.html> (accedido 25 de abril de 2023).



- [16] L. Marcu, «Fluorescence Lifetime Techniques in Medical Applications», *Ann Biomed Eng*, vol. 40, n.º 2, pp. 304-331, feb. 2012, doi: 10.1007/s10439-011-0495-y.
- [17] A. C. Croce y G. Bottioli, «Autofluorescence spectroscopy and imaging: a tool for biomedical research and diagnosis», *Eur J Histochem*, dic. 2014, doi: 10.4081/ejh.2014.2461.
- [18] R. Datta, T. M. Heaster, J. T. Sharick, A. A. Gillette, y M. C. Skala, «Fluorescence lifetime imaging microscopy: fundamentals and advances in instrumentation, analysis, and applications», *J. Biomed. Opt.*, vol. 25, n.º 07, p. 1, may 2020, doi: 10.1117/1.JBO.25.7.071203.
- [19] «Can I excite NADH/FAD simultaneously for metabolic imaging?», *Becker & Hickl GmbH*. <https://www.becker-hickl.com/faq/can-i-excite-nadh-fad-simultaneously-for-metabolic-imaging/> (accedido 15 de junio de 2023).
- [20] S. Palmer, K. Litvinova, E. U. Rafailov, y G. Nabi, «Detection of urinary bladder cancer cells using redox ratio and double excitation wavelengths autofluorescence», *Biomed. Opt. Express*, vol. 6, n.º 3, p. 977, mar. 2015, doi: 10.1364/BOE.6.000977.
- [21] Sofía Isabel Freyre-Bernal, Jhan Sebastián Saavedra-Torres, Luisa Fernanda Zúñiga-Cerón, Andrés Felipe Olaya-Castañeda, y Carolina Salguero, «Cáncer y mitocondria: un aspecto central para el desarrollo y crecimiento tumoral». [En línea]. Disponible en: <https://revistamedicina.net/index.php/Medicina/article/download/116-3/1436?inline=1>
- [22] J. Blackwell, K. M. Katika, L. Pilon, K. M. Dipple, S. R. Levin, y A. Nouvong, «In vivo time-resolved autofluorescence measurements to test for glycation of human skin», *J. Biomed. Opt.*, vol. 13, n.º 1, p. 014004, 2008, doi: 10.1117/1.2830658.
- [23] H. C. Ishikawa-Ankerhold, R. Ankerhold, y G. P. C. Drummen, «Advanced Fluorescence Microscopy Techniques—FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM», *Molecules*, vol. 17, n.º 4, pp. 4047-4132, abr. 2012, doi: 10.3390/molecules17044047.
- [24] Liang. Gao y R. T. Smith, «Optical hyperspectral imaging in microscopy and spectroscopy - a review of data acquisition», *J. Biophoton*, vol. 8, n.º 6, pp. 441-456, jun. 2015, doi: 10.1002/jbio.201400051.
- [25] C. Xu, W. Zipfel, J. B. Shear, R. M. Williams, y W. W. Webb, «Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear microscopy.», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 93, n.º 20, pp. 10763-10768, oct. 1996, doi: 10.1073/pnas.93.20.10763.
- [26] P. T. C. So, C. Y. Dong, B. R. Masters, y K. M. Berland, «Two-Photon Excitation Fluorescence Microscopy», *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 2, n.º 1, pp. 399-429, ago. 2000, doi: 10.1146/annurev.bioeng.2.1.399.
- [27] «Anatomy of the Urinary System», 19 de noviembre de 2019. <https://www.hopkinsmedicine.org/health/wellness-and-prevention/anatomy-of-the-urinary-system> (accedido 2 de mayo de 2023).
- [28] «Layers of the Bladder Wall | SEER Training». <https://training.seer.cancer.gov/bladder/anatomy/layers.html> (accedido 2 de mayo de 2023).

- [29] M. G. Patino, M. E. Neiders, S. Andreana, B. Noble, y R. E. Cohen, «Collagen: An Overview», *Implant Dentistry*, vol. 11, n.º 3, p. 280, sep. 2002.
- [30] M. Brooks *et al.*, «Positive association of collagen type I with non-muscle invasive bladder cancer progression», *Oncotarget*, vol. 7, n.º 50, pp. 82609-82619, dic. 2016, doi: 10.18632/oncotarget.12089.
- [31] I. N. Amirrah, Y. Lokanathan, I. Zulkiflee, M. F. M. R. Wee, A. Motta, y M. B. Fauzi, «A Comprehensive Review on Collagen Type I Development of Biomaterials for Tissue Engineering: From Biosynthesis to Bioscaffold», *Biomedicines*, vol. 10, n.º 9, p. 2307, sep. 2022, doi: 10.3390/biomedicines10092307.
- [32] P. Obeidy, P. L. Tong, y W. Weninger, «Research Techniques Made Simple: Two-Photon Intravital Imaging of the Skin», *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 138, n.º 4, pp. 720-725, abr. 2018, doi: 10.1016/j.jid.2018.01.017.
- [33] R. W. Boyd, *Nonlinear optics*, 4.ª ed. San Diego: Academic Press is an imprint of Elsevier, 2019.
- [34] S. L. Jacques, «Optical properties of biological tissues: a review», *Phys. Med. Biol.*, vol. 58, n.º 11, pp. R37-R61, jun. 2013, doi: 10.1088/0031-9155/58/11/R37.
- [35] E. Real Peña, «Identificación de la composición de tejidos biológicos a partir de medidas de reflectancia difusa».
- [36] M. Figueras Atienza, *Óptica y fotónica La ciencia de la luz*, 1.ª ed. UOC, 2011.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS**

Control Escolar de Licenciatura



## VOTOS DE APROBATORIOS

**SECRETARIA EJECUTIVA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS APLICADAS  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

**P R E S E N T E**

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó el **C. CARDENAS RODRIGUEZ JOHN BRANDON** con número de matrícula **10018822** cuyo título es:

**“Caracterización óptica de la vejiga para detección temprana de cáncer mediante técnicas no lineales.”**

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **Licenciado en Tecnología con Área Terminal en Electrónica.**

Cuernavaca, Mor a 2 de octubre de 2023

Atentamente  
Por una universidad culta  
*Una universidad de excelencia*

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

**DR. J. JESÚS ESCOBEDO ALATORRE  
DR. EDGAR EDUARDO ANTÚNEZ CERÓN  
DR. OMAR PALILLERO SANDOVAL  
DR. GUSTAVO CASTRO OLVERA  
DR. PABLO LOZA ALVAREZ**

**PRESIDENTE  
SECRETARIO  
VOCAL  
PRIMER SUPLENTE  
SEGUNDO SUPLENTE**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**EDGAR EDUARDO ANTUNEZ CERON | Fecha:2023-10-02 13:46:18 | Firmante**

j2eLHgeAEvsydj0c+T9VIQYNLrpoRgCsd1jL39514HX03kQVEtq+85m7ylEKW7yH0POoan+HFZ8L85q+cudEF1AdkTg4blzOws./9BqGH/DZca4K04XYR1nh1khicAKHaw8i7l  
Q1E8L4wfr0dLJpkjWwzi27SaNyOntQgX5uw2z5fMPybls5veGkiRXCxJUC+SyyT1LvokSzz8VINmT8JfQSc8O2TeP2WD0ml4uHqsxaybHU0ZsFaCN5Y2hbhaZFAxFTWl1eLgQE  
4LWFHc2zcQYkto6l91e4pgjLDAF62/0QGsj43A+x4lGrpQ/XuK5n4egiHvpbN82X4Qpg==

**OMAR PALILLERO SANDOVAL | Fecha:2023-10-02 13:51:57 | Firmante**

YPmpXz71WDSFJAWCfTZ516Ea+X3v7Kss6JNh3ZwD0qM1nPFzZSw3XcWDFer7Rw0MNXk4uQ0k0NcoSwdqvuGG/+DkN21k+NQSI7f7jnCGv1o5ggv9ilXSx3ZNfj/24FB1SrZURu  
3rtWazv2SVKwDlbpjCig3lXtj+XO2lrlV3EQwjF0vhtvgtctQ3YefibWMDLGB8tzxOZawSNsZ/2cj8YuT/12OCiwUZvxO5QEKA04carMixlsXLPeujH+jGstnXAYabUmCHcS0DluFmBr  
Aylv3X8PZQNDc9XC6B+k3F8SfSNZVwqF2aHcV/GF6nhhv0MUpgU94O3TRuQKYA/uw==

**PABLO LOZA ÁLVAREZ | Fecha:2023-10-03 04:40:02 | Firmante**

VwyiFAHKIwIwOsjL5/H4oc3M+8XQDsgQ+oFCD+F7jAV2OyoEEhPcasLVUjFysZYXtb9WGH0WNI/rXrA9gyLQDMRYEr1hvSZE+RMr3TZAu5aVWVGrB2Muh7laSgGhwQVGSi6W  
TxphC0199PWQhtSILBgg+74WwzHaFIX+7F5/8nNh0ZaNzyM2zBGkjmLU9QwIGXyMDQG XsiYG/g4reUsFYkr6T+FOAnmQ7rdPhrEwGfM3AkKcbYq+MHtF3umsVHR uqb7FtgQ  
58yGNGPCKxj5X5rxcwDQSKAhrB5ly8Gbmcd8luxT63n9F4BR8aA/uLeqSqmTmt++dUjVUoX2uTlSg==

**GUSTAVO CASTRO OLVERA | Fecha:2023-10-04 07:30:02 | Firmante**

wch2QnClrzlNhbNxyq4D8HB9lNwT2egGhOx0y+HQT5BUwjouLjG6gDdrfOz0QHghRcZuEmveWOqGh1/Oor3c33LoEemC6kBFgkemGmbTjRAnKNK1zRwo5wGc5T5INR/HLH/  
L0lvKUHFF3T5eb5WzZWBdGrAw17uTKxW0h2TtdQjcT6bAWAjoAfMXTUiGGT4wxCo5zbvpxXhexsyhFE52UNr0Gjtqs5YUmuq0NjHlcpN6fbiaRIAfr3avDowil8X EgwLlkeHsjk  
T6jXPB+0Ygi0siZjWdeq+plwUhp/BqlH+xk0r03YtnDS1qP/MKAEojXabEviVosKn6MEbWEQ==

**J JESUS ESCOBEDO ALATORRE | Fecha:2023-10-05 11:52:22 | Firmante**

ZSREGEQtX/Sdi0V5or5O/CSHqfm0V17/RH+vKH5YwVma3zRhPuQzx5PqwX41tyaMAYGvm063T+5P9L5O69/t+rdLoLBMVw/+Ewa17VN6gJYMjpwMzms4be186+Nf honkVTw  
k19wzNcOnohrTWLj3PR6tx5F1/Uprijrtli2pYNC5EafkoTDIULh2/pY5WeakdYJtm8J/oez4JDa3dDKJmOsiB0kUjn7CjQgH/NeBR+1HAnrMY31LXHeJhqLBAeM7/oGAGOJL67CGS  
DslLHk02PwSbq6jdsLWEzo8AFQIEA9ipNGx9tcXU0BxTCQ6eZQUB2SQ+3AiC3LsSt0RIGZjQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



**BDmJfIPQA**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/F1kVIHKIAVniny2s8eF0NvKEEuC5ln4L>

