

EFFECTO DE NANOCOMPUESTOS DE TiO_2 COMBINADO CON CAMPO
MAGNÉTICO Y RADIACIÓN UV SOBRE CÉLULAS DE CÁNCER DE CUELLO
UTERINO

JULIANA MARÍA GIRALDO JUNCO

Química

Tesis de Maestría

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI

2013

EFFECTO DE NANOCOMPUESTOS DE TiO_2 COMBINADO CON CAMPO
MAGNÉTICO Y RADIACIÓN UV SOBRE CÉLULAS DE CÁNCER DE CUELLO
UTERINO

JULIANA MARÍA GIRALDO JUNCO

Química

Director

Prof. Rubén Jesús Camargo Amado, Ph.D.

Tesis de Maestría presentada como requisito parcial para optar el título de
Magister en Ingeniería, Área de énfasis Ingeniería Química

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI

2013

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA	4
2. ANTECEDENTES	10
3. MARCO TEÓRICO	17
3.1. Cáncer de útero	17
3.2. Tratamientos para el cáncer	19
3.3. Fotocatálisis heterogénea con TiO_2	23
3.4. Campos magnéticos	27
3.5. Campos eléctricos y materiales biológicos	30
3.6. Campos electromagnéticos en cáncer	31
4. METODOLOGÍA	33
4.1. Calibración del magnetoreactor	33
4.2. Determinación de condiciones de campo magnético	35
4.3. Aplicaciones repetitivas de campos magnéticos	38
4.4. Interacción entre campo magnético y radiación UV	38
5. RESULTADOS	41
5.1. Aplicación de campos magnéticos en células HeLa y CHO	41
5.2. Aplicación repetitiva de campos magnéticos en células HeLa y CHO	43
5.3. Aplicación de campos magnéticos y tratamiento fotocatalítico.	47
6. DISCUSIÓN	51

6.1. Aplicación de campos magnéticos en células HeLa y CHO.	51
6.2. Efecto de la aplicación repetitiva de campos magnéticos en las células HeLa y CHO.	52
6.3. Efecto de la radiación ultravioleta y campos magnéticos en viabilidad de células HeLa y CHO.	55
CONCLUSIONES	57
BIBLIOGRAFÍA	58
ANEXOS	73

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de campo magnético	35
Tabla 2. Condiciones de mayor viabilidad encontradas	42
Tabla 3. Valores de F calculados para los tratamientos	48
Tabla 4. Porcentajes de citotoxicidad para las células HeLa y CHO para los diferentes tratamientos.	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Proceso fotocatalítico en partícula de TiO_2	26
Figura 2. Curva de calibración del magnetoreactor TRAUMATOR	34
Figura 3. Montaje del magnetoreactor TRAUMATOR y teslámetro digital	34
Figura 4. Ensamblaje de las células en las placas de 6 pozos	36
Figura 5. Montaje de las placas dentro del magnetoreactor	37
Figura 6. Ensamblaje de las células en las placas de 24 pozos	39
Figura 7. Porcentaje de proliferación celular	41
Figura 8. Células CHO antes de la exposición al campo magnético.	44
Figura 9. Células CHO después de cuatro días de exposición al campo magnético.	44
Figura 10. Células HeLa antes de la exposición al campo magnético.	45
Figura 11. Células HeLa después de cuatro días de exposición al campo magnético.	45
Figura 12. Cantidad de células luego de tratamientos repetitivos	46
Figura 13. Comparativo de crecimiento porcentual de células HeLa	46
Figura 14. Comparativo de crecimiento porcentual de células CHO	47

Figura 15. Citotoxicidad porcentual celular luego de los tratamientos	49
Figura 16. Efecto del tiempo de exposición a radiación UV	50
Figura 17. Mecanismo de la actividad de la enzima LDH	82

RESUMEN

Se estudió el efecto que tiene la aplicación de campos magnéticos, radiación UV y nanomateriales de TiO₂-modificado, sobre la proliferación de células de cáncer cervicouterino de la línea celular HeLa comparadas con la línea celular CHO.

Durante la primera fase se determinó la intensidad y dirección de campo que tuvo mayor efecto sobre el crecimiento de las células cancerígenas, y el efecto de la aplicación repetitiva de campos magnéticos. Posteriormente se aplicó la combinatoria de fotocatálisis con nanocompuestos base TiO₂-modificado y del campo magnético sobre las líneas celulares mencionadas.

INTRODUCCIÓN

Actualmente se considera el cáncer como un problema de salud pública que merece atención prioritaria. Es la enfermedad con la más alta tasa de mortalidad en Colombia luego de las enfermedades cardiovasculares; Colombia también tiene el índice más alto de incidencia en cáncer de cuello uterino comparada con los países de la región andina.

Algunos tipos de cánceres tienen tratamiento pero el éxito de éste dependerá del grado de avance de la enfermedad y del tipo de cáncer que se trate. Los tratamientos más comunes son cirugía, quimioterapia y radioterapia; la utilización de alguno u otro método dependerá del criterio del médico tratante. Infortunadamente, algunos cánceres son incurables y cobran la vida del paciente.

Debido a que los tratamientos anteriormente mencionados producen efectos colaterales en otros órganos del paciente es de gran interés desarrollar alternativas que permitan combatir la enfermedad y sin detrimento de la calidad de vida del paciente.

Los campos magnéticos han sido utilizados como tratamiento para diferentes tipos de líneas celulares cancerígenas, mostrando efectos citotóxicos e inhibitorios de la proliferación celular [1].

Igualmente la fotocatálisis con TiO_2 ha sido ampliamente utilizada ya que mediante las especies fuertemente oxidantes que se forman en el seno del fotocatalizador se produce daño del ADN vía reacciones de óxido-reducción [2].

Sin embargo, hay muy pocos estudios en donde se evidencie el efecto concomitante de ambas tecnologías. Es por ello que en éste proyecto se estudia el efecto que tiene la aplicación de campos magnéticos, radiación UV y nanomateriales de TiO_2 -modificado, para degradar células de cáncer cervicouterino de la línea celular HeLa.

1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

En el mundo occidental se presentan más de 11 millones de casos de cáncer anualmente; siendo ésta enfermedad, la primera causa de muerte, representa el 25% de las muertes en países de éste hemisferio. En los Estados Unidos y en Europa es la segunda causa de muerte después de enfermedades cardiovasculares que más vidas cobran a personas menores de 85 años [3]. En Colombia, es la tercera causa de muerte luego de la violencia y enfermedades cardiovasculares, haciendo al cáncer, un problema de salud pública creciente [4].

El 80% de los casos nuevos de cáncer ocurren en países en vías de desarrollo. En Colombia, en el año 2002 se presentaron 70,750 nuevos casos de cáncer, sin incluir cáncer de piel que es el más frecuente. En el año 2005 hubo 30,693 defunciones por cáncer que representa 16,3% del total de las muertes [5].

La gran mortalidad a causa de los principales cánceres se debe a los estados avanzados en el momento de diagnóstico y los tratamientos poco efectivos. Al comparar Colombia con otros países los cánceres que principalmente se desarrollan son: cáncer de estómago, cáncer de cuello uterino y leucemia en hombres adultos, mujeres y niños respectivamente [6, 7].

Colombia es el país con mayor incidencia de cáncer de cuello uterino. Las ciudades más afectadas en Sur América con cáncer de cuello de útero son Cali (Colombia), Recife (Brasil) y La Paz (Bolivia), concentrándose principalmente en

mujeres de edad productiva [8]. El registro poblacional de cáncer de Cali, Colombia, muestra tasas de incidencia y tasas de mortalidad de cáncer de cuerpo uterino específicas por edad, con mayor incidencia en mujeres mayores de 30 años y no representa disminución a lo largo del tiempo [9].

Los tratamientos para el cáncer varían de acuerdo al tipo y su estadio, los métodos más comunes para tratarlo son: la cirugía (cuando el cáncer está confinado y no se ha diseminado), la radioterapia (que utiliza rayos X de alta potencia para la destrucción de las células cancerígenas) y quimioterapia (que es la administración de medicamentos para destruirlas), o bien, la combinación de métodos [10]. El pronóstico dependerá del tipo de cáncer y su nivel de evolución, algunos cánceres son curables con los tratamientos anteriormente mencionados, pero con efectos secundarios adversos para la salud. Otros cánceres se pueden propagar, o simplemente son incurables [11].

El cáncer de cuello uterino se presenta con mayor incidencia en países en vías de desarrollo, cobrando 30.000 vidas anuales en América Latina [12]. En Colombia, según cifras del INC (Instituto Nacional de Cancerología) durante el año 2001, se diagnosticaron 4,389 casos nuevos de cáncer, 8.2% más que en el año 2000 y 4.5% más comparado con el año 1999. Para el año 2002 el incremento fué de un 13% comparado con el 2001 [13].

De los 4,990 casos nuevos de cáncer del año 2002, 3,071 (61.5%) fueron mujeres y 358 (7.2%) mujeres menores de 17 años. Las cinco localizaciones más

frecuentes de cáncer en su orden son: cuello uterino, mama, piel, estómago y sistema hematopoyético [7].

El cáncer de cuello uterino se detecta en mujeres entre 25 y 40 años, etapa productiva de la mujer, afectando así su entorno familiar y social. Por otro lado las mujeres con ésta enfermedad tienen como alternativas de tratamiento la cirugía, la quimioterapia (utilización de fármacos), la radioterapia (utilización de fuentes radiactivas) o bien, la combinación de métodos, todos ellos con efectos secundarios que detrimentan su calidad de vida y la de sus familias.

La quimioterapia y la radioterapia atacan el cáncer, pero si el tratamiento es prolongado las células sanas del cuerpo inevitablemente se dañan, existe posibilidad de que el tratamiento por sí mismo induzca al cáncer [14, 15]. Se deben tener estrategias que permitan desarrollar y profundizar en tratamientos alternativos que ataquen efectivamente la enfermedad sin afectar la salud y calidad de vida de los pacientes.

Entre los muchos candidatos para la fotocatalisis, probablemente el TiO_2 sea el de mayor uso ahora y en el futuro, debido a su adecuado valor de banda prohibida (3.2 eV), su bajo costo y alta estabilidad. Además de la posibilidad de mejorar la fotoactividad del TiO_2 con dopantes aniónicos o catiónicos no compensados [16].

El TiO_2 se ha utilizado desde la antigüedad como pigmento blanco, se utiliza también en la industria cosmética lo que ha demostrado que puede ser seguro

para los humanos y el medio ambiente, aunque hay evidencia de que puede causar cáncer según su clasificación en el grupo 2B de carcinogénicos de la International Agency for Research on Cancer [17]. Se han realizado muchos estudios para la fotodescomposición de contaminantes orgánicos [18,19], pero infortunadamente muy pocos que investiguen su acción en las ciencias de la vida, especialmente como tratamiento contra el cáncer. La fototerapia en células tumorales, utilizando TiO_2 , ha mostrado que éste es un agente fotosensibilizante en la terapia fotodinámica (PDT, por sus siglas en ingles); ya que causa peroxidación de lípidos y escisiones en el ADN, produciendo así, inactivación de los canales de la membrana mitocondrial, desorganización en las membranas lisosómicas y plasmáticas, conllevando a la muerte celular [20-22].

En éste proyecto se estudia el efecto que tiene la aplicación de campos magnéticos, radiación UV y nanomateriales de TiO_2 -modificado, para degradar células de cáncer cervicouterino de la línea celular HeLa. Éste cáncer es originado por la infección del virus de papiloma humano (VPH). Los grupos de investigación involucrados en el proyecto tienen experiencia y han logrado la síntesis del nanocompuesto de TiO_2 -modificado y su aplicación in-vitro en células de cáncer de cuello uterino logrando citotoxicidades cercanas al 99% en 40 minutos de tratamiento sobre las células HeLa (en proceso de patente), igualmente se tiene experiencia en la fabricación de reactores y aplicación in-vitro de campos magnéticos de baja intensidad sobre células de osteoblastos, osteoclastos y fibroblastos humanos, donde se ha observado la posibilidad de aumentar o

disminuir la proliferación, dependiendo de las condiciones de campo magnético y del tipo de células a utilizar.

En la Universidad del Valle los grupos de investigación “Fisicoquímica de Bío y Nanomateriales” y “Farmacología Univalle”, terminaron en el año 2012 el proyecto financiado por Colciencias: “Muerte fotocatalítica de células cancerígenas de útero por efecto del Óxido de Titanio (TiO_2) y radiación ultravioleta”. Son prometedores los resultados obtenidos en la investigación IN VITRO, ya que se logró un 98.6% de citotoxicidad en las células HeLa en 40 minutos de tratamiento (HeLa, línea celular de cáncer cervicouterino provocado por el virus de papiloma humano VPH 18), mientras que en las células CHO no hay citotoxicidad (CHO, línea celular de células sanas de ovario de hámster chino), se plantea en principio, un futuro y posible método para curar el cáncer de cuello uterino. Igualmente se demostró la no genotoxicidad, ni mutagenidad de los compuestos sintetizados.

Por otro lado los grupos de investigación Farmacología Univalle, Grupo de Investigación en Percepción y Sistemas Inteligentes PSI, Grupo de Investigación en Alta Tensión GRALTA, Grupo de Investigación TRAUMATOR, todos de la Universidad del Valle, han desarrollado el proyecto “Efecto de la estimulación con campos magnéticos en la proliferación y crecimiento de fibroblastos de piel humana y osteoblastos humanos normales, estandarización de procedimientos de radiación”, proyecto financiado por Univalle convocatoria interna 2008, estudios en los que encontraron que los campos electromagnéticos de baja intensidad y baja frecuencia, potencializan el crecimiento de fibroblastos humanos. Sin embargo en

la experimentación igualmente se mostró que algunas combinaciones de intensidad y dirección de campo electromagnético generaron el efecto contrario, una disminución en la tasa de crecimiento celular comparado con un blanco.

La presente investigación busca establecer el efecto de campo electromagnético sobre la línea celular de cáncer de cuello uterino HeLa, comparado con el efecto sobre la línea celular CHO. Una vez hecho esto, se entrará a estudiar el efecto sobre las mismas líneas celulares, la acción combinada de la radiación ultravioleta y campo electromagnético en presencia de TiO_2 -modificado.

2. ANTECEDENTES

La fotocatálisis con TiO_2 ha atraído gran atención por su desempeño en la fotodegradación y mineralización de contaminantes orgánicos en agua y aire, debido a su gran poder oxidante cuando es irradiado con luz UV [18]. Así mismo las aplicaciones a microorganismos e incluso a células de cáncer, ha ganado un número creciente de investigadores con el transcurso de los años [23].

El efecto citotóxico del TiO_2 cuando es irradiado con luz UV busca complementar, o bien reemplazar las terapias tradicionales para combatir el cáncer, superando los efectos adversos que tienen en los pacientes.

Debido a la poca selectividad de las partículas de TiO_2 para atacar células sanas o células enfermas y a la poca acumulación de TiO_2 dentro de las células cancerígenas se ha recurrido a la modificación de las nanopartículas de TiO_2 , para lograr incrementar su concentración dentro de las células cancerígenas de manera selectiva y eficiente [24]. Sin embargo la terapia fotodinámica con TiO_2 en presencia de un campo magnético permitirá la localización del tratamiento en un lugar y momento específico ya que el proceso será posible sólo cuando estén en el lugar adecuado las nanopartículas en presencia de la luz [25, 26].

El efecto de las nanopartículas de TiO_2 en células de cáncer de próstata PC-3M ha sido estudiado y ha mostrado que dependiendo de la temperatura, tiempo y

concentración, estas nanopartículas permean la membrana celular y entran a casi todos los sitios activos de la célula a través de una variedad de mecanismos biológicos lo que abre una ventana a la utilización de radiación UV para atacar fotocatalíticamente las células cancerígenas desde el interior de éstas [27].

Por otra parte, ha sido estudiado el efecto de la concentración de TiO_2 en células de cáncer de colon cuando son sometidas a radiación ultravioleta-A (UV-A), mostrando que a concentraciones por encima de 200 $\mu\text{g/ml}$ la tasa de supervivencia disminuye rápidamente después de 30 minutos de exposición a la radiación. Igualmente al utilizar concentraciones de 1000 $\mu\text{g/ml}$ en un lapso de 30 minutos, en ausencia de radiación, la tasa de supervivencia de las células es superior al 90%, mostrando así que el TiO_2 no es tóxico para las células sanas; sin embargo cuando son sometidas a 10 minutos de radiación la mortalidad de las células es del 44%, y a los 30 minutos de radiación asciende a un 80%. Lo que corrobora que las nanopartículas de TiO_2 fotoexcitadas son tóxicas en las células de cáncer [28].

La irradiación de las células HeLa con luz UV, causa la muerte más efectivamente en aquellas que han sido tratadas con el TiO_2 modificado que aquellas con nanopartículas de TiO_2 . La fotocatalisis con TiO_2 modificado con folato causa necrosis a las células HeLa e igualmente las conlleva a apoptosis celular [29].

En la *Universidad del Valle*, se han llevado a cabo estudios en el grupo de *Fisicoquímica de Bio y Nanomateriales* y con el *Grupo de Farmacología* en la línea

de investigación “Materiales y Procesos para Tratamientos en Salud”, en el cual se obtuvo por diferentes métodos el TiO_2 , siendo el proceso sol-gel el que permitió controlar la pureza del óxido para luego hacer estudios fotocatalíticos en diversas líneas celulares. Se utilizó el óxido para evaluar la muerte de fibroblastos sanos y células de cáncer de tipo melanoma Hs 668(A).T CRL-7425TM. Se observó que los fibroblastos sanos no presentaron efecto citotóxico en presencia del TiO_2 y ausencia de radiación. En presencia de radiación y TiO_2 se evidenció disminución de la actividad metabólica pero no efecto citotóxico. Comportamiento similar con las células de melanoma, ya que estas al exponerse durante 45 minutos a radiación produjo la disminución de la actividad metabólica e igualmente no hubo efecto citotóxico. En ninguno de los cultivos anteriormente descritos se pudo obtener una dosis letal.

Por otro lado los campos magnéticos han tenido con el transcurrir de los años un gran impacto en tratamientos médicos. Entre las muchas aplicaciones en el campo de la salud se ha utilizado como tratamiento de enfermedades como el Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), artritis, diabetes, alopecia, migraña, hepatitis, epilepsia, osteoartritis, osteoporosis, neuropatías, lesiones musculares, pancreatitis, úlceras, fracturas óseas y cáncer [30, 31].

Por ejemplo la aplicación de campos magnéticos de moderada intensidad (6 mT), inducen en las células cambios en su forma y membrana celular. Después de

exposición prolongada de 24 horas en algunos tipos de células disminuye la apoptosis celular, mientras que en otras aumenta en un 20% [30].

Inicialmente los estudios para observar el efecto de campos magnéticos en células de origen animal, en su mayoría diversos tejidos de ratón, han mostrado diversos resultados que dependerán del tipo de célula, frecuencia, intensidad del campo aplicado, dirección y tiempo de exposición.

La aplicación de un campo magnético homogéneo de 7 T durante 3 hasta 24 horas en células P388 y V79 (células de leucemia de ratón y fibroblasto de hamster chino respectivamente) no mostraron cambios en la distribución del ADN [32]. Igualmente no se obtuvo ningún cambio en la velocidad de crecimiento de células de ovario de hamster chino CHO-K1 al ser expuestas a un campo magnético estable de 10 T por más de 4 días, igualmente no hubo diferencias en la frecuencia de formación de micronúcleos cuando éstas mismas células eran expuestas a diferentes condiciones de campos magnéticos de alta frecuencia [33, 34].

Cuando células astrogiales de ratas se sometieron a campo magnético estático, senoidal o combinación de ambos de 1 mT de intensidad durante 1 hora no se observó ningún cambio en las proteínas del estrés, ni en el citoesqueleto, ni en la

proliferación [35]. Al utilizar osteoblastos de ratón para medir su proliferación luego de aplicarles campo magnético senoidal con una frecuencia de 50 Hz, e intensidades entre 0.9 y 4.8 mT, por 30 minutos cada 24 horas por 3 días mostraron una inhibición significativa en la proliferación [36].

En los estudios experimentales realizados en ratas se observa que la aplicación de campos electromagnéticos de frecuencia extremadamente baja (4.5 mT) con una frecuencia de 1120 Hz inhibe las lesiones preneoplásticas que son inducidas químicamente en el hígado de estos animales ya que se reduce la proliferación celular [37]. Las ratas y ratones no sufren de anomalías esqueléticas cuando se les aplican campos magnéticos con una frecuencia de 50-60 Hz e intensidades de 0,6 a 30.000 μ T. Además a diferentes mamíferos *in vivo* es poco probable que se les induzcan cambios teratológicos al utilizar la misma frecuencia y una intensidad de más de 30 mT [38].

Así mismo se han hecho experimentos donde se exponen diferentes líneas celulares humanas tanto malignas como normales de diferentes tejidos a campos magnéticos, cuyos resultados dependen de las características del campo aplicado.

Se han realizado investigaciones sobre el efecto de los campos magnéticos de 7 T durante un lapso de 64 horas en diferentes líneas celulares malignas humanas

como HTB 63 (melanoma), HTB 77 IP3 (carcinoma de ovario) y CCL 86 (linfoma), mostrando reducciones del $19.04 \pm 7.32\%$, $22.06 \pm 6.19\%$, y $40.68 \pm 8.31\%$ respectivamente [39].

La aplicación de campos magnéticos pulsados de extremadamente baja frecuencia de 0.65 mT de intensidad y 4 Hz durante 45 minutos a células MG-63 de osteosarcoma humano no afecta la síntesis de proteínas, la estructura nuclear o el número de células, sin embargo se inducen cambios en la distribución de las proteínas del citoesqueleto [39].

En otro experimento llevado a cabo igualmente en osteoblastos y el efecto en éstas células de la aplicación de campos magnéticos pulsados de 0.65 mT y estáticos de 0.5 mT mostraron una alteración en el patrón de distribución normal de las redes de microtúbulos, los cuales formaron agregados fluorescentes en la región cortical de la membrana celular permitiendo ésto la formación rápida de células óseas [40].

A células de carcinoma cervical humano (HeLa) y de fibroblasto de pulmón humano (IMR 90) se les aplicaron campos magnéticos de 6 mT y 60 Hz durante 30 y 60 minutos, los cuales no mostraron cambios en la proliferación celular. Sin embargo al someter a las células a exposiciones repetitivas de 3 y 6 mT, por 30

minutos cada 24 horas durante 3 días; obteniéndose que durante las primeras 24 horas aumentaba la viabilidad celular de la línea HeLa, pero ésta decaía a las 48 horas. Para el caso de las IMR 90 la viabilidad celular decae notoriamente en las primeras 24 horas. Según esto el estrés celular aumenta con las aplicaciones repetitivas de campos magnéticos, lo cual aumenta las vías de señalización que ocasionan la apoptosis en las células [41].

En la *Universidad del Valle*, se han llevado a cabo estudios en el grupo de investigación en Alta Tensión (GRALTA) junto al grupo de Ortopedia y Traumatología (TRAUMATOR), Grupo Percepción y Sistemas Inteligentes (PSI) y farmacología-INVITRO realizaron estudios sobre el efecto del campo magnético en la proliferación de fibroblastos de piel humana y en osteoblastos humanos, con estandarización de procedimiento de radiación.

3. MARCO TEÓRICO

Cáncer es el crecimiento anormal de células causado por múltiples cambios en la expresión genética llevando a un desequilibrio entre la proliferación y muerte celular lo que conlleva a que un gran número de células invadan tejidos a través del torrente sanguíneo y del sistema linfático haciendo metástasis en sitios distantes. Ésta es una enfermedad crónica que produce la muerte del huésped cuando no se recibe tratamiento médico oportuno. El cáncer se produce por daños en el material genético de las células. Estos daños pueden ser producto de la radiación, productos químicos o agentes infecciosos. El riesgo de desarrollar cáncer es multifactorial, depende de factores genéticos, exposición a sustancias cancerígenas, edad, sexo, raza y alimentación [42].

3.1 Cáncer de útero

El útero tiene dos partes: el cuerpo del útero, localizado en la parte superior, que es donde se desarrollan los bebés, y el cuello uterino (también conocido como cérvix), localizado en la parte inferior que conecta el cuerpo del útero con la vagina.

El cáncer de cuello uterino, o bien cáncer cervical, es el que se manifiesta en la parte baja del útero dentro de la vagina, éste no se forma repentinamente. Inicialmente las células normales empiezan a sufrir cambios en su ADN y se

transforman a células precancerosas mediante varios procesos llamados: neoplasia intraepitelial cervical, lesión intraepitelial escamosa y displasia. Luego éstas células defectuosas se convierten en cancerosas, crecen descontroladamente y se riegan a las áreas cercanas.

Éste proceso de cambio puede tomar varios años, aunque a veces sucede con mayor rapidez. Para algunas mujeres, los cambios precancerosos pueden desaparecer sin tratamiento alguno. Sin embargo, lo más común es que se requiera tratamiento para impedir que se conviertan en un verdadero cáncer.

En el cuello uterino existen dos tipos de células, las células escamosas que están ubicadas en la exocérnix (parte que dá hacia la vagina) y las células glandulares en la endocérnix (parte que dá hacia el cuerpo del útero). En la región donde se encuentran estos dos tipos de células es en donde se originan la mayoría de los cánceres [43]. Existen dos tipos principales de cáncer del cuello uterino: entre el 85% y el 90% de los casos son carcinoma de células escamosas que se originan en la exocérnix y entre el 10% y 15% son adenocarcinoma que se origina a partir de las células de las glándulas que producen el moco en la endocérnix.

El 99% de los casos de cáncer de cuello uterino son causados por el virus del papiloma humano VPH. Éste virus se adquiere por contacto sexual, el riesgo aumenta a mayor cantidad de compañeros sexuales y mayor número de relaciones [44]. Otros factores de riesgo son los múltiples embarazos, relaciones

sexuales a edad temprana, usar píldoras anticonceptivas orales por periodos prolongados, el cigarrillo entre otros. En Colombia ocupa el segundo lugar de incidencia, después del cáncer de mama, con 4,736 casos estimados para el año 2008, y una mortalidad de 2,154 casos, la tasa más alta en el mismo año [45].

3.2 Tratamientos para el cáncer

El tratamiento para el cáncer cervical depende del estado de avance de la enfermedad y su localización. Igualmente dependerá de la edad del paciente y su estado de salud. Los tratamientos para el cáncer más utilizados son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, algunas veces es la combinación de dos o más métodos pero todos con efectos secundarios como daños en células normales, alteraciones por la permanencia de sustancias radioactivas en el cuerpo, entre otras. En el caso de que no haya cura, el objetivo principal es prolongar la vida del paciente y ayudarlo a sentirse mejor destruyendo o removiendo la mayor cantidad de células cancerosas posibles.

- **Cirugía**

Este es el método más utilizado cuando el cáncer está localizado en un lugar concreto, no ha habido invasión a tejidos vecinos, microinvasión y el tumor es pequeño. Hay varios tipos de cirugías, por ejemplo en las etapas tempranas de cáncer se utilizan los siguientes: la criocirugía en donde se congela mediante un metal enfriado con nitrógeno líquido la porción afectada, matando así las células anormales; la cirugía laser en donde lo que se busca es evaporar las células

afectadas y la conización que es un método en donde se utiliza una pieza en forma de cono para remover el tejido afectado.

En etapas más avanzadas se utiliza la histerectomía que es la remoción del útero y la vagina, los ovarios se dejan en su lugar, a no ser que existan razones para removerlos. También se utiliza la extracción pélvica donde se remueven los tejidos antes mencionados, las trompas de Falopio, los ovarios y nódulos linfáticos.

- **Quimioterapia**

La quimioterapia es ideal para cánceres que se han esparcido a órganos distantes, se utilizan medicamentos orales o endovenosos que ingresan al sistema sanguíneo y recorren todas las áreas del cuerpo. La quimioterapia ataca las células que se dividen rápidamente, como las células cancerosas y también las células sanas de tejidos como el cabello, el revestimiento del tracto gastrointestinal y las que se encuentran en la sangre; conllevando a efectos secundarios que van a depender del tipo de droga, la dosis y el lapso en que han sido suministradas. Los efectos secundarios son la pérdida de apetito, vómito, pérdida del cabello, llagas en la boca y pérdida de glóbulos rojos y blancos, causando dificultad para respirar y riesgo de infección respectivamente. Las células tumorales pueden generar resistencia a las drogas con las que han sido comúnmente tratadas debido a la disminución en la absorción de éstas, el aumento de su flujo, el aumento en su tasa del metabolismo, o alteraciones en las propiedades de éstas. Se observó en diferentes líneas de células, que los

mecanismos de resistencia a las drogas son principalmente debidos a la sobreexposición de las células a éstas sustancias.

- **Radioterapia**

La radioterapia ataca más a las células que se reproducen rápidamente que a las células normales. Se utilizan rayos-X para matar células cancerosas, buscando dañar el ADN de las células impidiendo que sigan creciendo y multiplicándose, infortunadamente células sanas también se ven afectadas. Los efectos secundarios de la radioterapia son: cansancio, dolor de estomago, vómito, disminución de los glóbulos rojos y blancos, hay mayor riesgo a infección, resequedad vaginal entre otros. A menudo, se utiliza para reducir el tamaño de un tumor lo más que se pueda antes de una cirugía o también se puede administrar después de la cirugía para prevenir la reaparición del cáncer.

- **PDT**

Debido a la gran cantidad de reacciones químicas que pueden ser inducidas con radiación ultravioleta, se han desarrollado líneas de investigación en fotoquímica y fotobiología, las cuales emplean la Terapia Fotodinámica (Photodynamic Therapy: PDT), como modalidad de tratamiento contra numerosas enfermedades.

La terapia fotodinámica es un tratamiento que utiliza una droga fotosensibilizante y una luz con determinada intensidad y longitud de onda, que al entrar en

contacto con oxígeno, genera radicales libres, lo que mata las células cancerosas fotodinámicamente mediante un proceso oxidativo.

Este tratamiento es letal y altamente selectivo con las células tumorales, puede ser repetido y causa poco daño a los tejidos normales, no hay riesgo de fármaco-toxicidad acumulativa, además de que tiene pocos efectos secundarios, debido a que el fotosensibilizante se concentra en el sitio del tumor lo cual evitaría efectos mutagénicos por daño del ADN. Por lo tanto, se puede repetir la terapia las veces que se crea necesaria y se puede aplicar sobre un tejido previamente irradiado [46-48].

La reacción fotodinámica inicia por la activación del fotosensibilizante con la luz apropiada, brindándole a éste energía. El fotosensibilizante activado va a perder energía mediante una serie de procesos que lo van a llevar hasta un estado basal. Ésta energía liberada va a romper los enlaces del oxígeno, generando radicales libres que son los encargados de destruir las células y membranas vasculares conduciendo así a las células cancerígenas a necrosis o apoptosis [49].

La PDT se rige por la técnica de oxidación en la cual por medios fotoquímicos se generan especies transitorias como el radical hidroxilo. Éstos procesos fisicoquímicos producen cambios profundos en la estructura química de diversas sustancias. La oxidación de materia orgánica es altamente efectiva ya que los procesos involucrados poseen mayor factibilidad termodinámica y una muy alta

velocidad de oxidación debido a la participación de radicales libres. La especie hidroxilo posee propiedades adecuadas para atacar casi a todos los compuestos orgánicos y reaccionar de 106 a 1,012 veces más rápido que oxidantes alternativos como el O_3 [50].

3.3 Fotocatálisis heterogénea con TiO_2

Entre las técnicas avanzadas de oxidación más utilizadas se encuentra la fotocatálisis heterogénea, procedimiento muy común debido a su gran potencial para degradar materia orgánica y su bajo costo de energía. El proceso se basa en la absorción directa o indirecta de energía radiante (visible o UV) por un sólido que juega el papel de fotocatalizador, siendo normalmente un semiconductor. En la región interfacial entre el sólido semiconductor y la materia orgánica a degradar tienen lugar las reacciones de óxido-reducción, proceso durante el cual, el catalizador no sufre cambio alguno.

El fotocatalizador más utilizado es el dióxido de titanio (TiO_2), éste material es el semiconductor que ha alcanzado un mayor grado de madurez tecnológica entre los procesos fotocatalíticos, es económicamente asequible, presenta una elevada estabilidad química, haciéndolo apto para trabajar en un amplio rango de pH, ha demostrado ser el semiconductor más resistente a la corrosión química, a la fotocorrosión y no es tóxico [50].

No obstante, experimentos in vitro demuestran que cuando está en forma de nanopartícula o partícula de hasta unos pocos cientos de nanómetros de tamaño el TiO_2 tiene efectos nocivos sobre el ADN, afecta la función celular, interfiere con la actividad de defensa de las células del sistema inmunitario y puede producir inflamación. Una sola dosis oral de nanopartículas de dióxido de titanio causó importantes lesiones en los riñones e hígados de ratones hembras. Esto resulta altamente preocupante al considerar que los científicos aún no saben qué niveles de exposición a nanomateriales serían nocivos para la salud de los trabajadores y si realmente existe un nivel inocuo de exposición laboral a nanomateriales.

Los campos de estudio sobre la toxicidad de nano- TiO_2 aún se encuentran en proceso. Interesa conocer que niveles de exposición podrían tener efectos nocivos para la salud humana, o si existe un nivel inocuo de exposición. Según el tamaño y descripción física; si el TiO_2 presenta un tamaño de 3-20 nm puede destruir el ADN. Si el TiO_2 presenta tamaño de 25 nm, 85 nm y 155 nm provoca lesiones hepáticas y renales en ratones hembra. Una mezcla de las formas anatasa y rutilo producen radicales libres en las células inmunitarias, en el cerebro, pueden interferir con la función de las células epidérmicas y pulmonares. Las partículas de anatasa son 100 veces más tóxicas que las rutilo [51].

El TiO_2 se utiliza como pigmento blanco, por sus propiedades de dispersión, recubrimiento anticorrosivo, sensor de gases, absorbente de rayos UV en

productos cosméticos y de manera general en la industria cerámica, se utiliza como degradante de moléculas orgánicas en el proceso de purificación del agua, tiene aplicaciones en el tratamiento de cáncer.

Las fases cristalinas del TiO_2 que presentan actividad fotocatalítica son: la anatasa y rutilo. La fase anatasa tiene un "gap" de energía de 3.2 eV y el rutilo es de 3.0 eV, siendo la anatasa la que presenta mayor actividad, son capaces de producir transiciones electrónicas por absorción de luz en el ultravioleta cercano.

El proceso fotocatalítico con TiO_2 se basa en la generación de especies fuertemente oxidantes como: radicales hidroxilo, peróxido de hidrógeno, superóxidos, electrones en la banda de conducción y huecos en la banda de valencia, que llevan a cabo, bajo la incidencia de radiación UV, la mineralización de material orgánico. Éstas especies harán reacciones de oxidación y reducción en la doble capa bilípidica de las células de microorganismos, conduciéndolas a la muerte [51].

El mecanismo de fotorreacción dará inicio cuando el semiconductor sea iluminado con fotones de energía igual o mayor a la separación energética existente entre la banda de valencia y la de conducción, (ver figura 1 [52]),

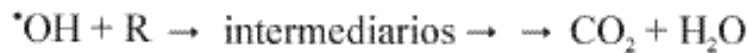
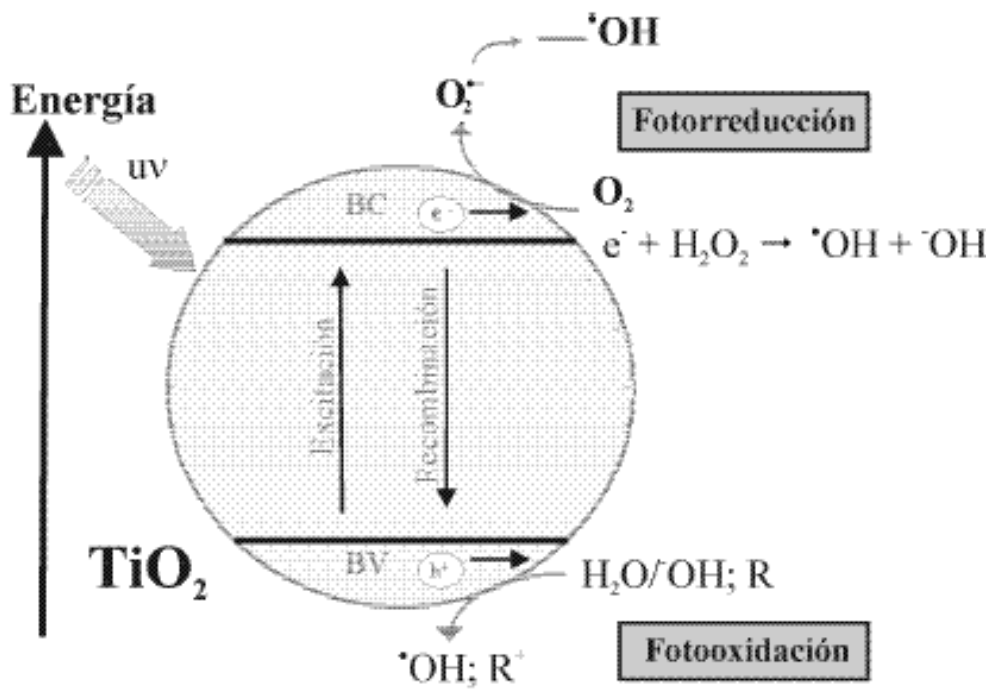
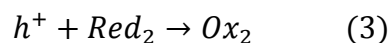
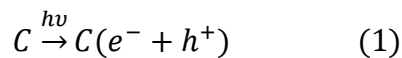


Figura 1. Esquema del proceso fotocatalítico sobre una partícula semiconductor de TiO_2 .

creándose en el seno del fotocatalizador pares electrón-hueco (e^- y h^+) (Ecuación 1), de los cuales un electrón es transferido hacia una molécula aceptora (Ox_1), produciendo una reacción de reducción de la misma (Ecuación 2); y el foto-hueco es transferido hacia una molécula donadora (Red_2), que se oxida (Ecuación 3) [53].



En los procesos de oxidación avanzada POAs, se producen radicales libres que oxidan compuestos orgánicos por abstracción de hidrógeno, por adición electrofílica a los dobles enlaces y por transferencia de electrones.

3.4 Campos magnéticos

La magnetita es un mineral magnético natural de fórmula de óxido de hierro, se encuentra en rocas metamórficas e ígneas. Puede atraer el hierro, el cobalto, el níquel y ciertas aleaciones de estos metales, esta propiedad se define como magnetismo. El magnetismo es una propiedad de los materiales que responden a los campos magnéticos aplicados. Los imanes son materiales que producen un campo magnético a su alrededor y son capaces de atraer el hierro, el cobalto y el níquel.

Los imanes pueden ser naturales como la magnetita (Fe_3O_4) o bien, artificiales, obtenidos a partir de aleaciones de diferentes metales. Los hay permanentes, causado por el ferromagnetismo, que son aquellos que conservan sus propiedades magnéticas luego de haber sido imantados, y temporales, que no conservan su magnetismo después de una imantación. El magnetismo se puede producir con imanes naturales o artificiales.

Un campo magnético es el volumen de influencia de un imán, y se representa por líneas de fuerza, que son líneas imaginarias que salen de un extremo del imán, se curvan y regresan al extremo opuesto del mismo. El espacio entre

estas líneas indica la intensidad del campo, a mayor espacio, menor intensidad tendrá.

Los imanes tienen mayor capacidad de atracción en los polos, debido a que las líneas de fuerza que representan los campos magnéticos, se encuentran a una menor distancia. A su vez estos extremos tienden a orientarse en la misma dirección de los polos geográficos de la tierra.

Al interior de la materia, los electrones en movimiento producen corrientes cerradas, originando así un dipolo. Cuando estos dipolos se encuentran en un ordenamiento aleatorio, sus fuerzas se anulan mutuamente y por lo tanto el material no muestra propiedades magnéticas. Sin embargo cuando los dipolos están orientados en la misma dirección, se produce un campo magnético y se dice que la sustancia es magnética.

Los campos magnéticos se generan a partir de cargas eléctricas en movimiento, debido a la distorsión que sufre el campo eléctrico al moverse la partícula. Una corriente eléctrica circulante a un conductor genera un campo magnético el cual tiene una intensidad que depende directamente de la carga eléctrica y a la distancia al conductor.

Igualmente los imanes generan corrientes eléctricas en las proximidades de bobinas o cables eléctricos, siempre y cuando alguno de los anteriores esté en movimiento. Un campo magnético variable crea corrientes eléctricas, que son

denominadas corrientes inducidas, estas corrientes van a existir mientras dure el campo magnético variable. La corriente eléctrica tendrá una intensidad mayor cuanto más intenso sea el campo magnético o mayor velocidad tenga el imán que la produce.

Los dispositivos de estimulación magnética han sido usados para la consolidación de fracturas debido a su efecto osteogénico en modelos animales In vivo e In vitro [36, 38, 54], en tratamientos de osteoartritis [55], osteoporosis [56], osteonecrosis de cabeza femoral, osteocondritis, tendinitis refractaria crónica y aumento de la fusión de columna [57-59]. Los resultados de los estudios In vitro muestran una dependencia entre las diferentes características de estimulación: frecuencias, intensidad de CEM y tiempos de exposición, cada uno de los cuales puede representar un efecto en la confluencia y velocidad de división celular [60]. Igualmente la respuesta varía al variar la madurez celular o concentración inicial de células cultivadas a ser expuestas al estímulo [61].

Así, al evaluar el efecto de estimulación por CEM en condiciones bien definidas de señal, tiempo y densidad celular, se contribuirá a la respuesta del crecimiento de células óseas ante esta estimulación.

3.5 Campos eléctricos y materiales biológicos

Los sistemas biológicos consisten de subsistemas físicos complejos; definidos por un gran número de componentes, como: iones, moléculas de agua, proteínas, lípidos, hormonas y partículas coloidales. El flujo de corriente en éstos fluidos está compuesto por las corrientes de difusión y las corrientes fluctuantes de cada componente. Cuando éstas densidades de corriente son bajas, el sistema se comporta como lineal, cuando éstas densidades de corriente son moderadamente altas, el sistema se convierte en no lineal [61].

El siguiente nivel de complejidad es el comportamiento de la membrana celular, la cual actúa como un sólido poroso cuando los campos son aplicados perpendicularmente a su superficie y como un líquido viscoso cuando los campos son aplicados en el plano de la membrana [62, 63]. La heterogeneidad de las membranas lleva a que a diferentes posiciones de ellas con respecto a un campo magnético aplicado, estas se ven afectadas de forma diferente.

Las membranas además, cambian su porosidad selectivamente, de donde los potenciales eléctricos y las señales químicas pueden transmitir señales y cambiar su conductividad. Adicionalmente, los campos pueden cambiar la orientación de moléculas, ya que inducen dipolos en las órbitas de los electrones y modifican la posición relativa de algunos de los átomos entre las moléculas, esto consecuentemente, lleva a cambios en las constantes eléctricas de las membranas celulares.

Los campos eléctricos afectan el transporte selectivo de iones o moléculas a través de la membrana, cambian el aumento de capas de iones cargados en la superficie y modifican el camino de nuevas moléculas a ser incorporadas dentro de la membrana o dirigidas a la superficie. El resultado de cambios en el transporte de moléculas o iones a través de la membrana celular, modifica el rendimiento de las células y consecuentemente del órgano del cual ella es parte [57].

3.6 Campos electromagnéticos en cáncer

Un estudio de 1979 señaló la posible relación entre vivir cerca de líneas de poder eléctricas y la leucemia en niños [64], actualmente las investigaciones señalan que no hay relación existente entre estos campos electromagnéticos y otros tipos de cáncer en ésta misma población [65].

Estudios llevados a cabo en adultos con trabajos donde se encuentran expuestos a campos electromagnéticos arrojaron los mismos resultados, no han encontrado un incremento del riesgo de sufrir leucemia, tumores cerebrales o cáncer de mama [66-68].

Sin embargo, los campos electromagnéticos de baja intensidad han mostrado ser efectivos para el tratamiento de tumores cancerígenos según recientes estudios [69]. Algunos tumores se han encogido y otros han parado de crecer, mientras que las células alrededor se han mostrado inafectadas. Estos tratamientos

podrían ser tolerados por largos periodos de tiempo e incluso combinados con otros tipos de terapias. Los diferentes tipos de cáncer responden diferente a distintos tipos de frecuencia. Los campos electromagnéticos actuarían entonces sobre la actividad de los genes de las células cancerígenas.

Una reducción en la tasa de crecimiento se observó en células tumorales de hígado y seno expuestas a campos electromagnéticos de amplitud modulada, (AM)-FEM, por sus siglas en inglés, pero no se observó ningún cambio en la tasa de crecimiento de las células normales del mismo tipo de tejido, o en el tumor, o células normales de otro tipo de tejido. La inhibición de la tasa de crecimiento depende del tiempo de exposición y la fuerza del campo aplicado [70].

La creciente colección de estudios demostrando los efectos biológicos inducidos por los (AM)-FEM debería llevar a una reevaluación de los potenciales efectos en el tratamiento del cáncer. La correspondencia entre los efectos inducidos por los (AM)-FEM en la proliferación celular, expresión génica, disfunciones mitóticas, podrían dar pistas sobre el mecanismo biológico de acción [71].

4. METODOLOGÍA

4.1. Calibración del Magnetoreactor

Se procede a realizar la calibración del magnetoreactor TRAUMATOR, que se encuentra en la escuela de Ingeniería Electrónica y pertenece al grupo de investigación de Alta Tensión (GRALTA) con el fin de medir la intensidad del campo magnético a una frecuencia de 50 Hz y a diferentes porcentajes de velocidad máxima con una onda de forma senoidal. Se eligió dicha frecuencia y forma de onda debido a que es la que comúnmente utilizaron estudios realizados anteriormente en el grupo de investigación del profesor Carlos Pinedo y en varios artículos referenciados [35-37].

Para medir la intensidad de campo magnético se utilizó un Teslámetro Digital referencia PHYWE, el cual fue facilitado por el Laboratorio de Física de la Universidad del Valle. La medición se hizo a intervalos de 5% de porcentajes de velocidad máxima.

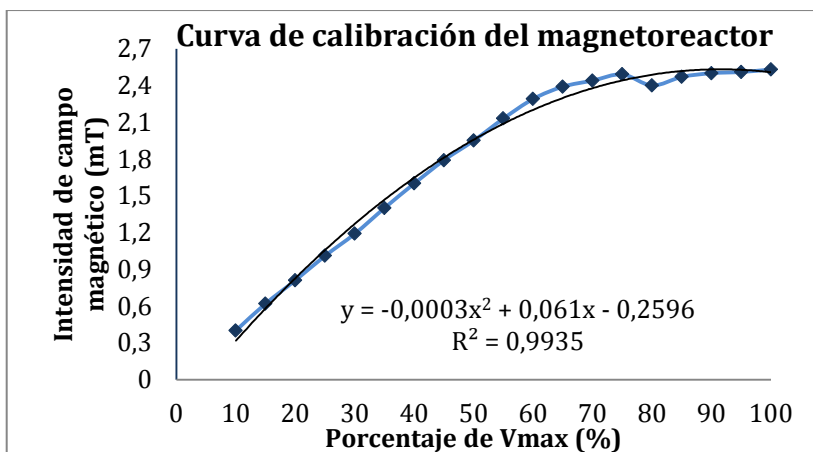


Figura 2. Curva de calibración del magnetoreactor TRAUMATOR.

A continuación se presenta el montaje del magnetoreactor TRAUMATOR y el Teslámetro Digital.



Figura 3. Montaje del magnetoreactor TRAUMATOR y el Teslámetro Digital.

4.2. Determinación de Condiciones de Campo Magnético

Se emplearán las líneas celulares HeLa 229 [CCL 2.1], que es un epitelio de carcinoma de cuello uterino y la línea celular CHO- K1 (ATCC CCL-61) que son células de ovario de hámster chino. Ver anexo 1 para procedimientos de mantenimiento de cultivos.

El objetivo de esta sección es determinar una intensidad de campo magnético y dirección que permita una mayor inhibición celular para las células HeLa exclusivamente y que estas condiciones no sean citotóxicas para las células CHO. Para lograr esto se hacen exposiciones a las condiciones mostradas en la siguiente tabla.

Tabla 1. Condiciones de campo magnético a las cuales fueron expuestas las células HeLa y CHO.

Condiciones	
Intensidades (mT)	0.4, 1.4, 2.13, 2.49 y 2.53
Dirección del campo	Paralelo
	Perpendicular
Frecuencia (Hz)	50
Forma de onda	Senoidal
Tiempo de exposición (min)	40

Para realizar las pruebas se utilizaron 12 placas de 6 pozos cada una. De las cuales 3 de los pozos eran para células HeLa y los otros para células CHO. Ver figura 4.

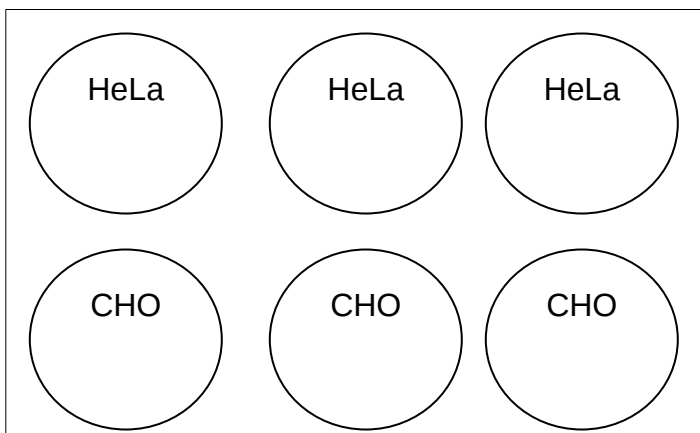


Figura 4. Ensamble de las placas con las células HeLa y CHO.

Una vez teniendo este ensamble se acomodan de a 2 placas, una perpendicular al campo y la otra en sentido paralelo, en el centro del magnetoreactor, lugar en el cual el campo magnético es uniforme. Se ajustaban las condiciones de intensidad, 50 Hz de frecuencia y tipo de onda senoidal y se sometían al campo durante 40 minutos. Ver figura 5.



Figura 5. Montaje de las placas dentro del magnetoreactor.

La determinación de proliferación y viabilidad celular se hace a las 24 horas de haberse realizado el tratamiento, por el método azul de tripán en el cual se cuentan las células vivas con una cámara de Neubauer. Estos resultados se comparan con la cantidad de células vivas antes del inicio del tratamiento magnético y también con los blancos, células que no fueron expuestas a los campos electromagnéticos. Ver Anexo 2 para los procedimientos de viabilidad celular.

4.3. Aplicaciones Repetitivas de Campos Magnéticos

Con base en las mejores condiciones de campo magnético y dirección obtenidas en la parte anterior que mejores resultados de inhibición arrojaron para las células HeLa se realizó la segunda etapa de la experimentación. En la cual las células se sometieron a exposiciones de campo magnético de 40 minutos cada 12 horas durante 4 días, con el fin de observar el comportamiento de las células luego de una aplicación repetitiva de campos magnéticos.

Para realizar las pruebas se utilizaron 10 placas de 6 pozos cada una. De las cuales 3 de los pozos eran para células HeLa y los otros para células CHO. Ver figura 4. La aplicación de los 40 minutos de tratamiento electromagnético se hizo cada 12 horas durante 4 días.

4.4. Interacción entre Campo Magnético y Radiación UV

Tomando en cuenta los resultados obtenidos anteriormente en el grupo de investigación en donde se encontró una formulación de nanofotocatalizador de TiO_2 -modificado y unas concentraciones y condiciones óptimas de reacción, se realiza la siguiente experimentación en donde lo que se pretende es observar la interacción del campo magnético con el tratamiento fotocatalítico. Buscando de

ésta forma determinar si el tratamiento magnético permite o no modificar el tratamiento con radiación ultravioleta.

Para ello se utilizan 6 placas de 24 pozos, de las cuales, en cada placa, 12 pozos son para células HeLa y 12 para células CHO. De estos 12 pozos de células HeLa, 3 son únicamente con medio de cultivo, otros 3 son con 200 ppm de nanocompuesto modificado de TiO_2 (A), 3 con una solución de Triton X-100 (T) y los últimos 3 con una mezcla de nanocompuesto y solución de Triton X-100 (T A). Lo mismo para células CHO. Ver figura 6.

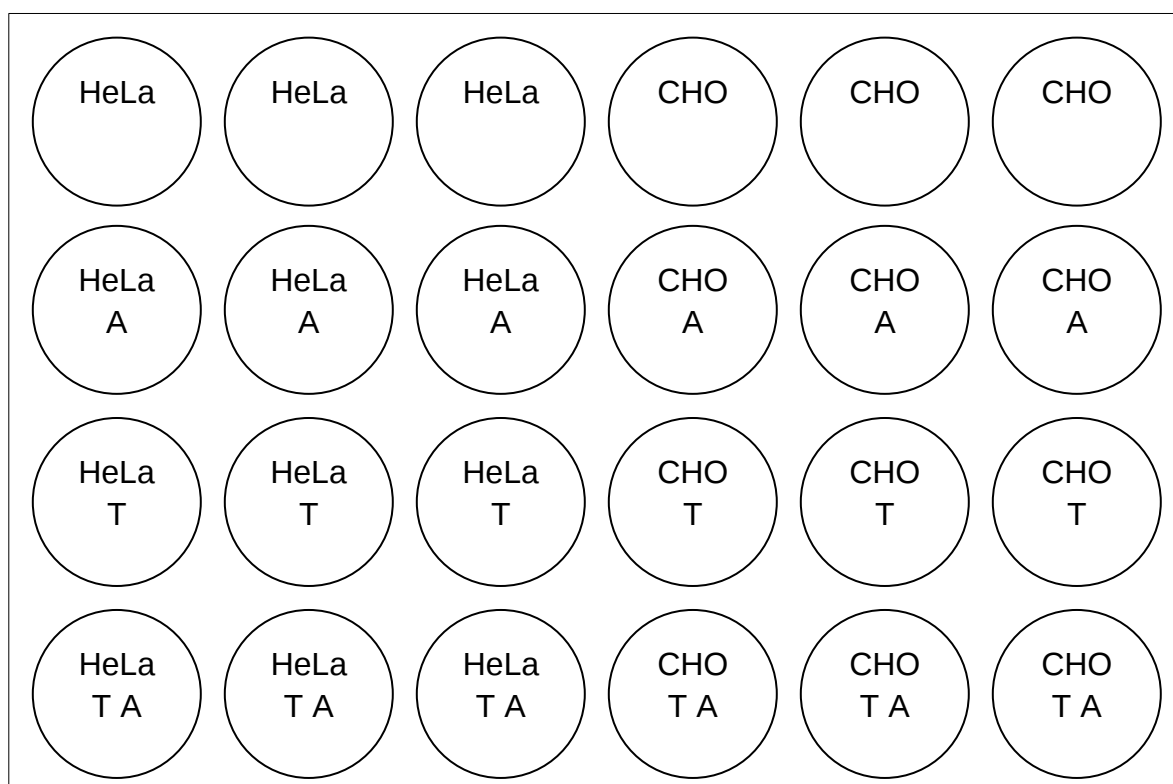


Figura 6. Ensamble de las placas con las células HeLa y CHO

Pasados los 40 minutos del tratamiento magnético a las condiciones encontradas anteriormente se someten las células a un tratamiento fotocatalítico de 10, 20, 30 y 40 minutos. Se compara entonces los efectos de utilizar los nanocompuestos de TiO_2 en células HeLa y CHO y su interacción con campo magnético y radiación UV que conlleven a menor viabilidad celular determinada con el kit LDH. Ver anexo 3 para estudios citotóxicos mediante kit LDH.

5. RESULTADOS

5.1. Aplicación de campos magnéticos en células HeLa y CHO

Al aplicar campos magnéticos a diferente intensidad y direcciones paralela y perpendicular se obtuvo los siguientes resultados en porcentaje de proliferación celular comparadas con células blanco, las cuales no fueron expuestas al tratamiento electromagnético. Ver figura 7.

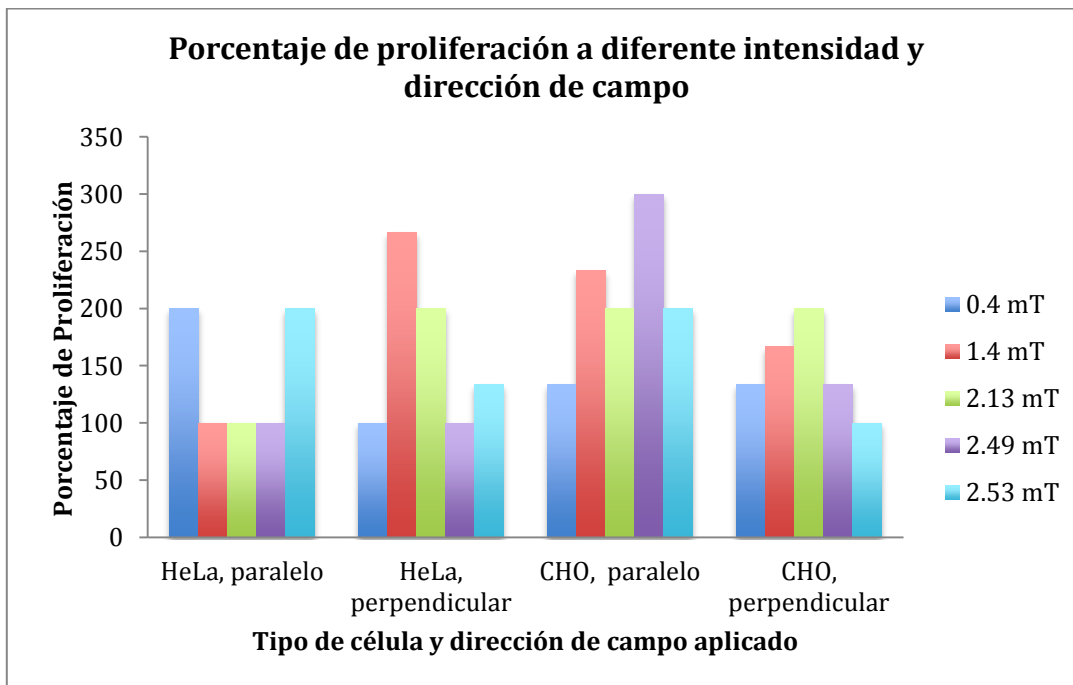


Figura 7. Porcentaje de proliferación de células HeLa y CHO luego de la aplicación de distintos campos magnéticos.

Al observar que el campo magnético aumenta la viabilidad celular se decide trabajar con las condiciones que mayor proliferación arroje.

Realizando un análisis estadístico con el programa Microsoft Excel 2010 se encontró que con 2.49 mT de intensidad hay un mayor crecimiento celular y que la menor proliferación ocurre en ausencia del campo magnético. Como lo que se desea es encontrar las condiciones de menor proliferación para determinado campo magnético y no fue posible encontrarlas en el rango de 0.4-2.53 mT, se opta por trabajar con las condiciones que mayor proliferación generen, ya que de todas formas el efecto del TiO_2 y la radiación UV es la total inhibición celular. Con base en lo anterior se escoge trabajar a 2.49 mT y dirección paralela debido a que con estas condiciones se observa mayor conteo celular para las células CHO.

Las condiciones de campo magnético que mayor viabilidad arrojaron están en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de mayor viabilidad celular encontradas.

Intensidad	2,49mT
Orientación	Paralelo
Frecuencia	50Hz
Tiempo de exposición	40 minutos

5.2. Aplicación repetitiva de campos magnéticos en células HeLa y CHO

En esta etapa del tratamiento se trabaja con las condiciones de la tabla 2, en las cuales se hacen tratamientos de 40 minutos cada 12 horas durante 4 días. Ver figuras 8, 9, 10 y 11 para imágenes de las células HeLa y CHO antes y después del tratamiento magnético.

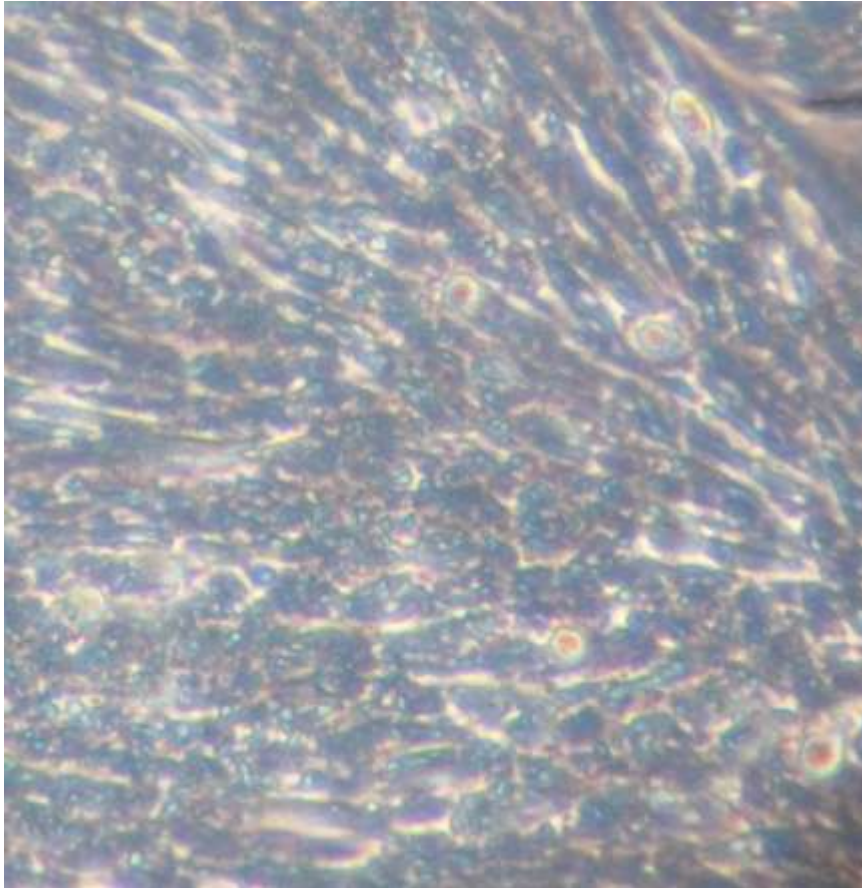


Figura 8. Células CHO antes de la exposición al campo magnético.

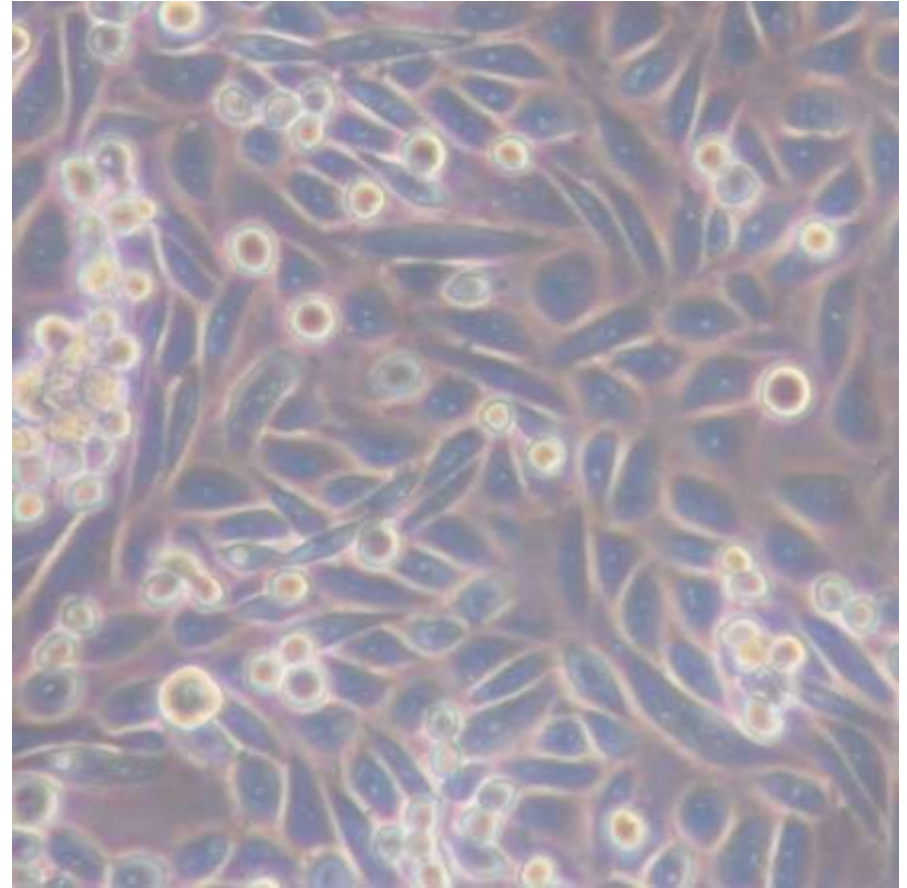


Figura 9. Células CHO después de cuatro días de exposición al campo magnético.

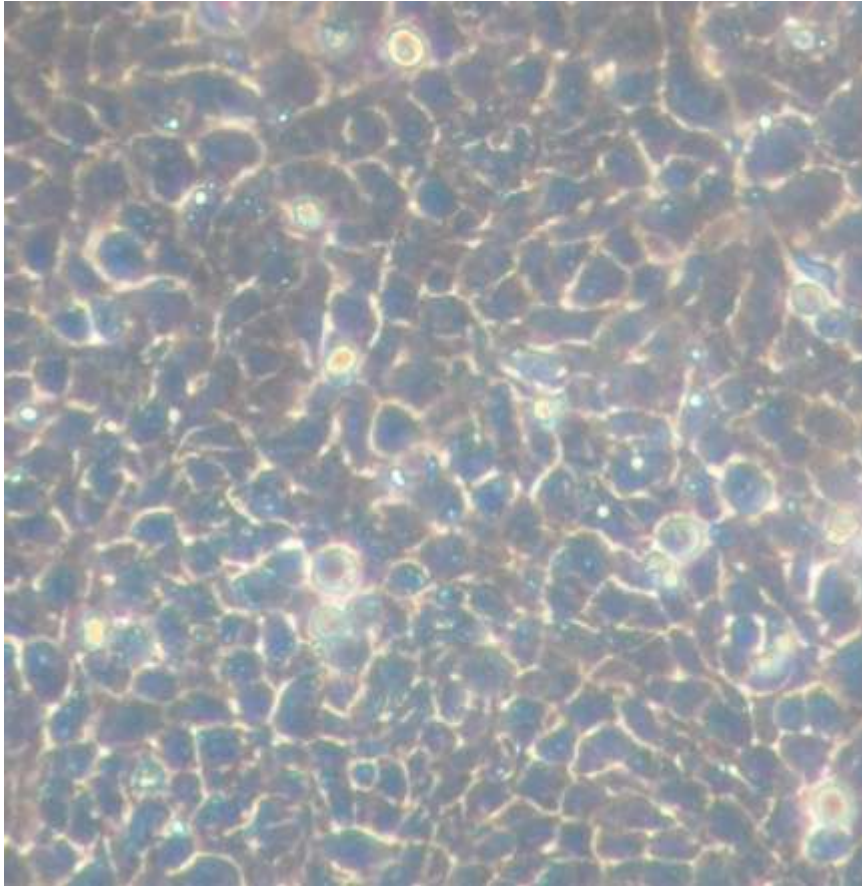


Figura 10. Células HeLa antes de la exposición al campo magnético.

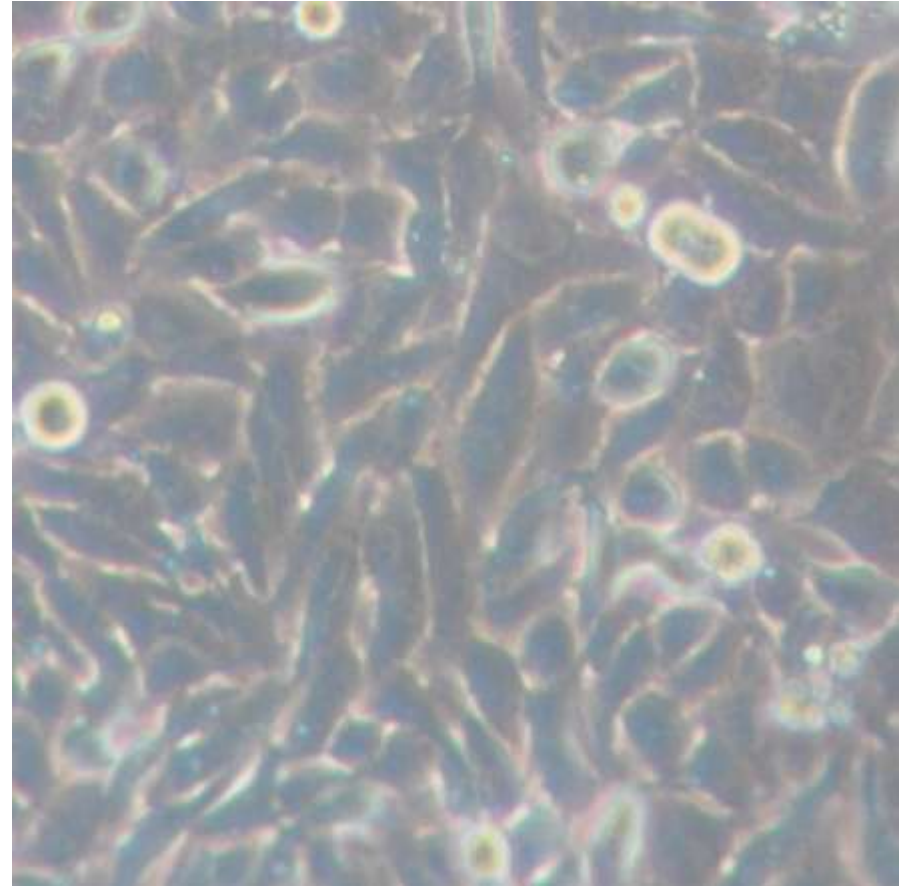


Figura 11. Células HeLa después de cuatro días de exposición al campo magnético.

En la figura 12 se puede apreciar el aumento en la cantidad de células luego del tratamiento repetitivo de campos magnéticos.

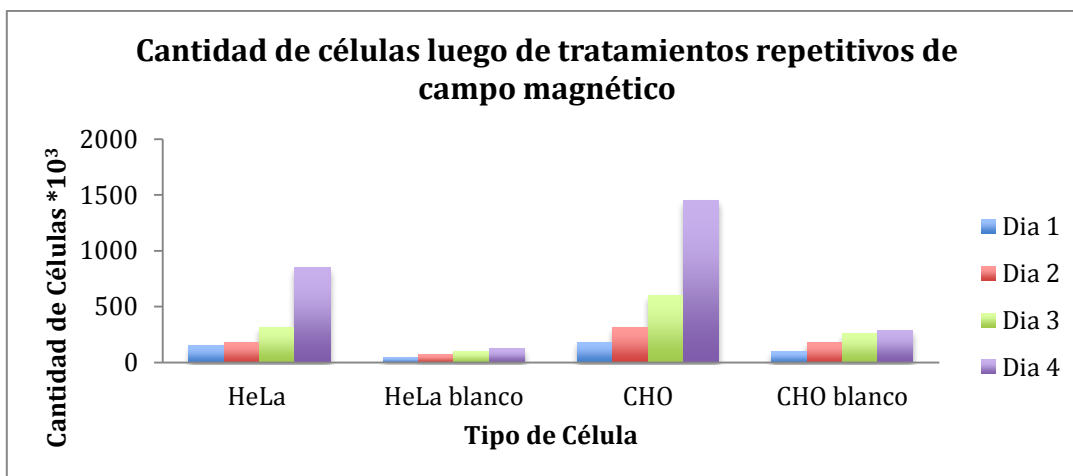


Figura 12. Cantidad de células luego de tratamientos de 40 minutos cada 12 horas durante 4 días, 2.49 mT, 50 Hz y orientación paralela.

Las tasas porcentuales de crecimiento para células HeLa y CHO se pueden ver en las figuras 13 y 14.

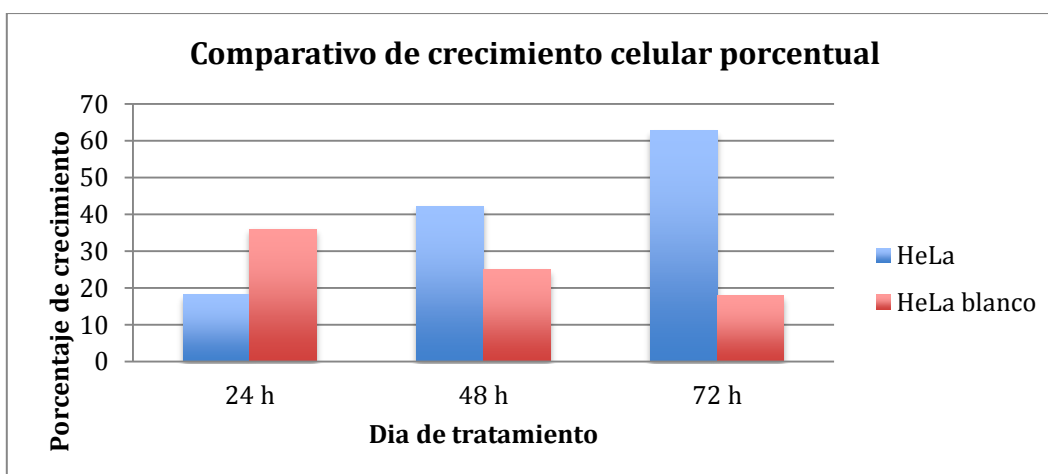


Figura 13. Crecimiento celular porcentual de células HeLa luego de tratamientos repetitivos de campos magnéticos.

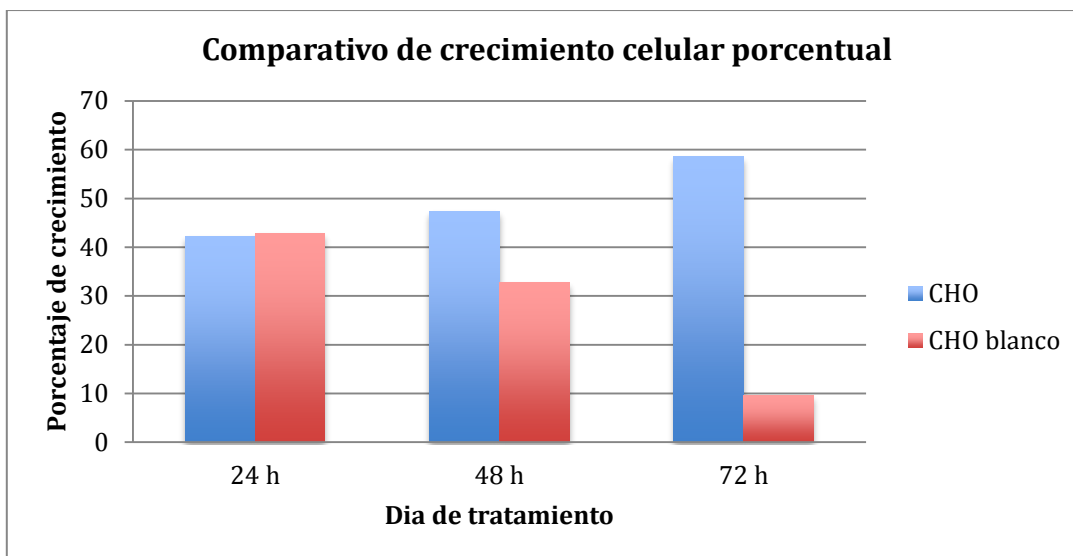


Figura 14. Crecimiento celular porcentual de células CHO luego de tratamientos repetitivos de campos magnéticos.

El crecimiento celular es mayor para ambos tipos de células HeLa y CHO, comparadas con aquellas células control, las cuales no fueron expuestas al tratamiento magnético.

5.3. Aplicación de campos magnéticos y tratamiento fotocatalítico.

En esta etapa del experimento se comparan los efectos de tratar las células HeLa y CHO solas, con nanocompuesto de TiO_2 , con solución de Triton X-100 y con combinación de ambos y su interacción con campos magnéticos durante 40

minutos a 2.49 mT, con orientación paralela y una frecuencia de 50 Hz y luego la exposición a radiación ultravioleta de 254 nm durante 10, 20, 30 y 40 minutos.

Al final de los diferentes tratamientos se midió la citotoxicidad celular, para ello se utilizo el kit LDH de Roche y se compararon los porcentajes de absorbancia obtenidos. Se afirma con un 95% de confianza que los tratamientos son diferentes entre si, ver tabla 3. Debido a que el $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabulado}}$, ($F_{\text{tabulado}} = 3.106$). Ver Anexo 4 para ANOVA de una vía.

Tabla 3. Valores de F calculados estadísticamente para los diferentes tratamientos realizados a las células HeLa y CHO.

Tipo de Celula	Valor de p	Valor de $F_{\text{calculado}}$
HeLa	0.003	7.12
HeLa y A	0.001	8.58
HeLa y T	0.001	9.07
HeLa, A y T	0.013	4.69
CHO	0.002	7.60
CHO y A	0.001	9.09
CHO y T	0.000	24.08
CHO, A y T	0.000	26.30

Se puede evidenciar en la figura 15 que el tratamiento fotocatalítico conjuntamente con el tratamiento magnético utilizando el nanocompuesto de TiO_2 -modificado como fotocatalizador, produce una citotoxicidad selectiva única para células HeLa hasta de un 99.99% y 83.74% cuando luego de 40 minutos de tratamiento electromagnético se exponen las células a 40 y 30 minutos respectivamente de fotocátalisis con el nanocompuesto de TiO_2 -modificado.

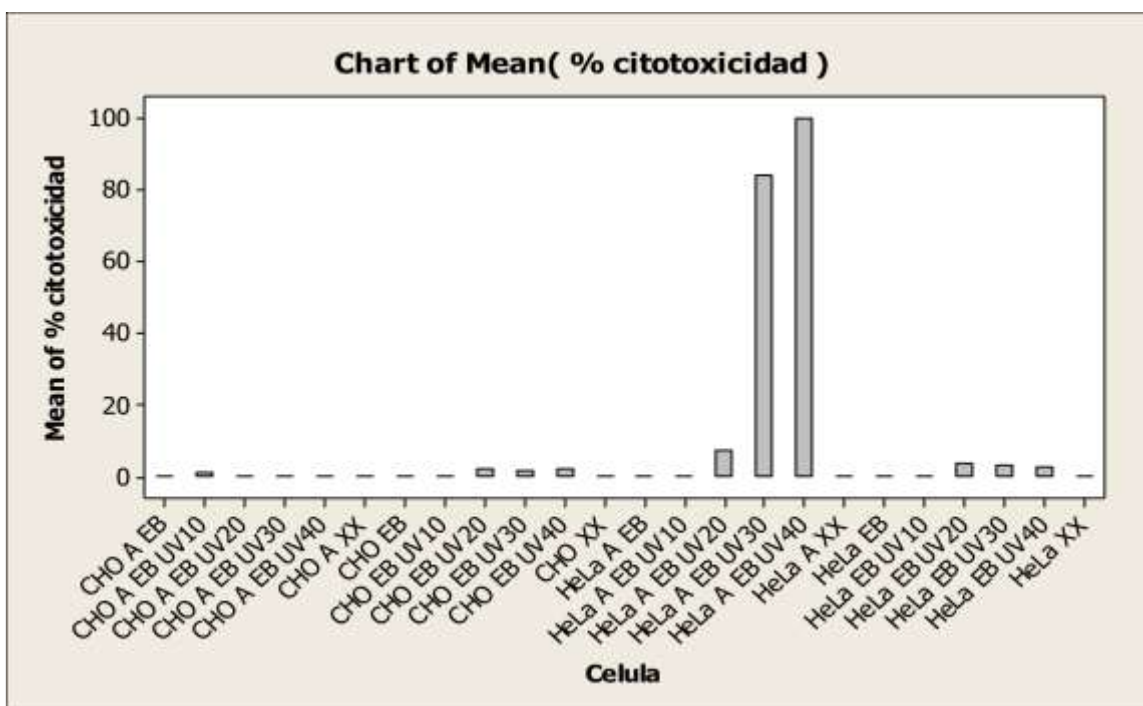


Figura 15. Porcentaje de citotoxicidad de las células HeLa y CHO luego de los tratamientos realizados en presencia y ausencia del nanocompuesto de TiO_2 -modificado.

Al comparar simultáneamente todos los tratamientos entre sí se puede afirmar con un 95 % de confianza que sí hay un efecto significativo en el tiempo de tratamiento fotocatalítico y por consiguiente a la exposición o no a radiación UV, $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabulado}}$, ($F_{\text{calculado}} = 2073.37$, $F_{\text{tabulado}} \approx 1.73$). Ver Anexo 4 para ANOVA de una vía y pruebas de Turkey.

Ver figura 16 para observar el efecto progresivo en la citotoxicidad a medida que se aumenta el tiempo de tratamiento fotocatalítico.

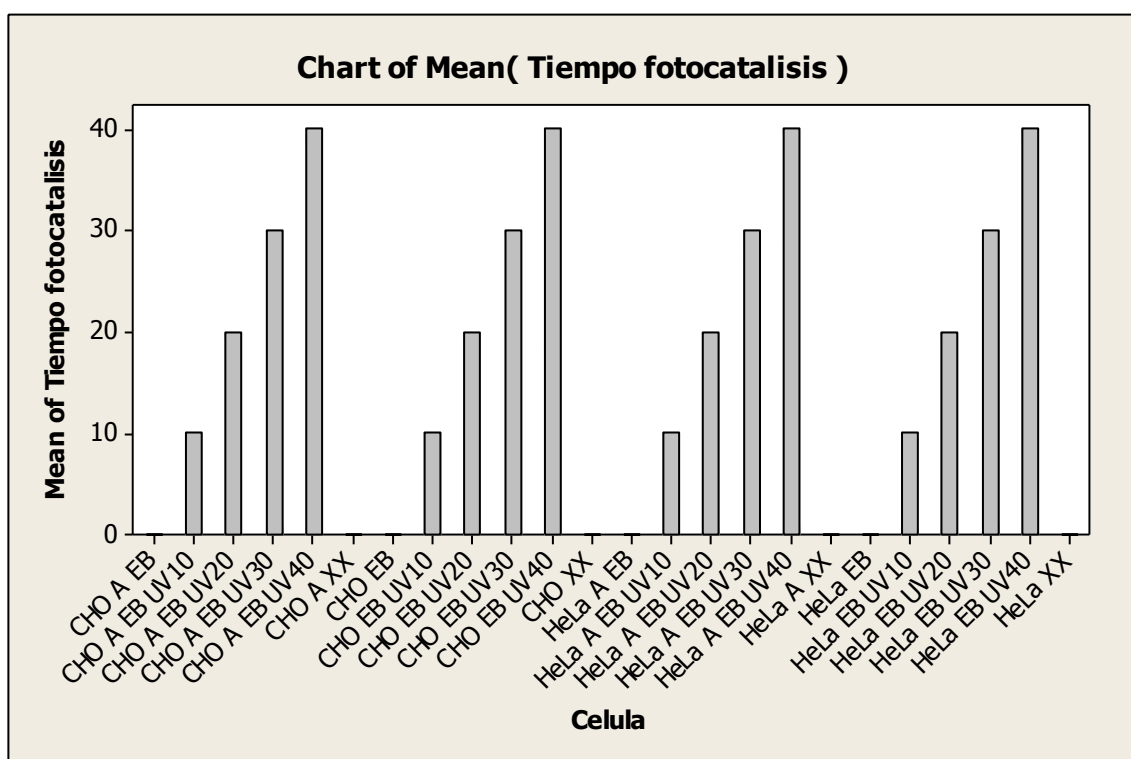


Figura 16. Efecto del tiempo de exposición a la radiación UV en la citotoxicidad celular.

6. DISCUSIÓN

6.1. Aplicación de campos magnéticos en células HeLa y CHO

Luego de la aplicación de los campos magnéticos a intensidades entre 0.4 y 2.53 mT, 50 Hz y direcciones paralela y perpendicular a las líneas celulares HeLa y CHO se encontró que la proliferación celular aumenta para ambos tipos de células.

Se ha evidenciado que los campos magnéticos de moderada intensidad entre 1 mT y 1 T debería influenciar la viabilidad de las células debido a las propiedades diamagnéticas de su membrana celular, sin embargo las células HeLa se han mostrado inafectadas [72]. Ésto puede ser debido a que los campos electromagnéticos de baja intensidad no transmiten energía suficientemente alta para afectar los enlaces químicos, y por lo tanto no dañan directamente al ADN [73], pero si se podría inducir un movimiento electrónico en el ADN [74].

Se ha propuesto que los campos electromagnéticos alteran estados fisiológicos celulares y que aumentan la aparición de daños en el ADN [75, 76], según ésto es posible que se afecte la producción de radicales libres [77-79], aceleración de la proliferación celular [80-83] y perturbación del ciclo celular [84].

6.2. Efecto de la aplicación repetitiva de campos magnéticos en las células HeLa y CHO

Luego de 4 días de aplicación de campos magnéticos cada 12 horas durante 40 minutos a las células HeLa y CHO, con una intensidad de campo de 2.49 mT, una frecuencia de 50 Hz y orientación paralela se puede observar que tanto las células HeLa como CHO incrementan su proliferación comparándolas con aquellas células control que no fueron expuestas al campo.

Al observar las células tratadas con campos magnéticos al microscopio y comparándolas con las no tratadas se encuentra que las primeras adquieren una forma alargada. Ésto podría ser causado por el fuerte efecto oxidante de los radicales libres que se producen con los campos magnéticos estáticos [85-87].

Existen tres teorías que podrían explicar el efecto de los campos magnéticos en los organismos vivos, que son: la teoría de membranas, la teoría de interferencia iónica y la teoría de los radicales libres. Las observaciones realizadas a partir de los experimentos que se llevaron a cabo sugieren que los efectos de los campos magnéticos podrían interpretarse como una combinación de éstas tres teorías.

Una combinación de éstas tres teorías permite interpretar los efectos de los campos magnéticos:

Teoría de membranas: Las membranas plasmáticas celulares están compuestas por moléculas con anisotropía diamagnética, las cuales cuando están bajo la influencia de un campo magnético rotan hasta que llegan a una posición de equilibrio en la cual se llega a un estado de menor energía libre. La rotación molecular de la estructura de la membrana modificará los canales iónicos los cuales alterará el transporte de iones [88-90].

Teoría de interferencia iónica: Los campos magnéticos estáticos afectan los estados de unión de los complejos formados entre iones y proteínas. En ésta teoría se sostiene que los campos magnéticos no causan ninguna transición cuántica, pero si afectan los estados transientes durante la formación del complejo de ión calcio y proteína [91-93].

Teoría de radicales libres: Cuando una solución de células es expuesta a campos magnéticos se forman radicales libres de oxígeno, los cuales incluyen: $\text{HO}_2\bullet$, $\text{O}_2\bullet$, $\bullet\text{OH}$, H_2O_2 , etc... éstos radicales son muy reactivos y por consiguiente causan mucho daño a las células de los organismos vivos [94, 95].

Hay suficiente evidencia que indica que los campos magnéticos de moderada intensidad entre 1 mT y 1 T producen un numero de fenómenos biológicos como: proliferación celular [70, 96], migración [97], orientación [98] y señalamiento

intracelular de los iones calcio [99]. Lo que explica lo encontrado experimentalmente.

Se ha propuesto que las propiedades diamagnéticas de las membranas celulares permite que el campo magnético estático sea apreciado casi inmediatamente a través de la alteración del flujo iónico de la transmembrana. Los campos magnéticos externos influyen la estructura y orientación de las proteínas diamagnéticas incluso antes de que las vías de transcripción sean activadas [89].

Porcentualmente las células CHO al cuarto día tenían un crecimiento de 58.62% adicional, comparadas con células CHO a las que no se les hizo tratamiento. De igual forma el incremento porcentual de las células HeLa fue de un 62.75% comparadas con las células HeLa control.

Estos resultados concuerdan con aquellos encontrados en la literatura en donde se estipula que los campos magnéticos de extremada baja frecuencia no tienen efecto genotóxico y son dependientes del tipo de célula [100, 101]. Estos campos magnéticos por el contrario, incrementan los niveles de proteínas debido a una elevada transcripción y/o translación [102]. La exposición a los campos magnéticos incrementan los niveles de α -polimerasa en las células eucarióticas [103].

Se ha sugerido que la exposición repetitiva de campos electromagnéticos pulsados estimula la regeneración de nervios estáticos [104] e incrementa los niveles extracelulares basales de los iones calcio en las células [105].

6.3. Efecto de la radiación ultravioleta y campos magnéticos en viabilidad de células HeLa y CHO.

Se puede observar que al aplicar tratamientos de campos magnéticos y luego continuar con un tratamiento fotocatalítico a las células HeLa y CHO, hay un bajo porcentaje de citotoxicidad para las células CHO y uno mayor para las células HeLa cuando los tratamientos fotocatalíticos superan los 30 minutos de exposición a radiación UV. Se ha visto que el TiO_2 tiene ciertas ventajas en las terapias anticancerígenas debido a su fuerte poder oxidante que mata a las células tumorales. Se ha reportado que la muerte celular debe por hipertermia, fotocátalisis y fototermia. La hipertermia sucede a nivel celular y se debe al calor inducido durante el proceso de reparación luego de una radiación que ha inducido el daño del ADN [106].

Cuando el TiO_2 es excitado por un fotón cuya energía es mayor que el band gap del TiO_2 (3.2 eV), un electrón de la banda de valencia se excita hasta la banda de conducción, formándose un par electrón hueco. Si el electrón y el hueco no se

recombinan, entonces reducen u oxidan especies de la solución electrolítica, en éste caso en el interior de la célula. Los huecos oxidan el agua formando radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), y el electrón reduce al oxígeno formando el ión superóxido (O^-) y H_2O_2 . Éstas especies de oxígeno reactivas llevan a varias reacciones químicas al interior de las células HeLa [100]. Las especies reactivas del oxígeno mencionadas se forman en la superficie fotoexcitada del TiO_2 en solución acuosa, éstas especies se espera que sean tóxicas para las células [107].

CONCLUSIONES

- El presente estudio permite concluir que en el rango de intensidad de campos magnéticos comprendido entre 0.4 y 2.53 mT utilizando una onda senoidal y una frecuencia de 50 Hz tanto las células HeLa y CHO aumentan su proliferación. Es decir, que a estas condiciones de campo no pueden ser utilizados como un tratamiento para el cancer de cuello cervical ya que no tiene efecto citotóxico.
- La utilización de un tratamiento de campo magnético con una intensidad de 2.49 mT, 50 Hz y dirección paralela de onda senoidal permiten una reducción de 10 minutos en el tiempo del posterior tratamiento fotocatalítico con un nanocompuesto de TiO_2 modificado y con una exposición a una radiación UV de 254 nm.
- La utilización de campos magnéticos como terapia anticancerígena tiene un futuro promisorio, ya que al no tener efecto citotóxico en las células, permite que un nuevo nanocompuesto de TiO_2 modificado y funcionalizado con nanopartículas magnéticas permita ser localizado puntualmente en el sitio del tumor durante el tiempo que dure la irradiación con luz ultravioleta.
- Se propone con base en la literatura y en los resultados obtenidos en el presente trabajo el diseño de un equipo que genere campos magnéticos en un mayor rango, que pueda variarse la forma de onda y frecuencia, que tenga incorporado un sensor de campo magnético y de temperatura. Igualmente se podría diseñar un equipo de bobinas cuadradas, con cronometro, alarma y que pueda aislar los campos magnéticos externos.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Dini, L., Abbro, L. (2005). Bioeffects of moderate-intensity static magnetic fields on cell cultures. *Micron*. 36 (3): 195-217.
- [2] Takaki, K., Higuchi, Y., Hashii, M., Ogino, C., Shimizu, N. (2013). Induction of apoptosis associated with chromosomal DNA fragmentation and caspase-3 activation in leukemia L1210 cells by TiO₂ nanoparticles. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 20 (20): 1-5.
- [3] Jemal, A., Murray, T., Ward, E., Samuels, A., Tiwari, R., Ghafoor, A., Feuer, E. y M. J. Thun: Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 55: 10, 2005.
- [4] La información para el control del cáncer. (2003). Consultado el 8 de Julio de 2012, Instituto Nacional de Cancerología, página web de servicios: <http://www.cancer.gov.co/contenido/contenido.aspx?catID=-1&conID=788&pagID=939>.
- [5] Globocan 2002 [programa de computador]. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2000.
- [6] Pineros M., Sanchez R., Cendales R., Perry F., Ocampo R., Garcia AO. y cols. Características sociodemográficas, clínicas y de la atención de mujeres con cáncer de mama en Bogotá. (2008). *Revista Colombiana de Cancerología*. 12(4):181-190.
- [7] Líneas De Investigación Para el Control del Cáncer en Colombia. (2010). Consultado el 12 de Mayo de 2012, Instituto Nacional de Cancerología, página web de servicios: <http://www.incancerologia.gov.co>.

- [8] Almonte M., Muñoz N. (2007) Carga de cánceres asociados con el virus papiloma humano en América latina. *Rev Per Ginecol Obstet.* 53(2):93-97.
- [9] Resumen de incidencia y mortalidad. (2012). Consultado el 9 de febrero de 2012, Registro poblacional de cáncer de Cali, pagina web de servicios: <http://rpcc.univalle.edu.co/es/incidencias/Estadisticas/index.php>.
- [10] Nancassa, R., Quintana, J., Rodríguez, C., Hernández, H., Hernández, V.,(n.d.). Radiocirugía en el tratamiento conservador de las lesiones preinvasoras del cuello uterino. Obtenida el 8 de mayo de 2011, http://bvs.sld.cu/revistas/mciego/vol15_supl1_09/articulos/a8_v15_supl109.htm.
- [11] Cáncer – Treatment, (n.d). Consultado el 8 de febrero de 2012. <http://www.umm.edu/ency/article/001289trt.htm>.
- [12] Piñeros, M., Pardo, C., Cantor, L., Hernández, G., Martínez, T., Pérez, N., Serrano, A., Posso, H.(2001). Registro institucional de cáncer del instituto nacional de cancerología, empresa social del estado. [versión electrónica] *Revista Colombiana de Cancerología.* 4-49.
- [13] Pardo C., Murillo R., Piñeros M., Castro M.A. (2003). Casos nuevos de cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología, Colombia, 2002. [versión electrónica]. *Revista Colombiana de Cancerología* . 7(3): 4-19
- [14] Allison, R., Sibata, C. (2010). Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 7: 61-75.
- [15] Terapia fotodinámica. (n.d). Consultado el 8 de febrero de 2012. <http://www.masdermatologia.com/PDF/0024.pdf>.

- [16] Zhu, W., Qiu, X., Iancu, V., Cheng, X-Q., Pan, H., Wang, W., Dimitrijevic, N., Rahj, T., Meyer, H., Patanthaman M., Stocks, G., Weitering, H., Gu, B., Eres, G., Zhang, Z. (2009). Band gap narrowing of titanium oxide semiconductors by noncompensated anion-cation codoping for enhanced visible-light photoactivity. *Physical Review Letters*. 103(226401).
- [17] Hashimoto, K., Irie, H. y Fujishima, A., (2005). TiO₂ Photocatalysis: A historical overview and future prospects, *Japanese Journal of Applied Physics*. 44(12): 8269-8285.
- [18] Teh, C., Mohamed, A. (2011). Roles of titanium dioxide and ion-doped titanium dioxide on photocatalytic degradation of organic pollunants (phenolyc compounds and dyes) in aqueous solutions: a review. *Journal of Alloys and Compounds* 509 1648-1660.
- [19] Huang, Z., Maness, P., Blake, D., Wolfrum, E., Smolinski, S. y Jacoby, W., (1999). Bactericidal mode of titanium dioxide photocatalysis, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*.133(2-3): 163-170.
- [20] Allison, R., Mota, H., Bagnato, V., Sibata, C. (2008). Bio-nanotechnology and photodynamic therapy – State of the art review. (Version electrónica) *ScienceDirect*, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 5: 19-28.
- [21] Dechsakulthorn, F., Hayes, A., Bakand, S., Joeng, L., Winder, C. In *vitro* cytotoxicity assessment on selected nanoparticles using human skin fibroblasts. *Proc. 6th. World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences*. August 21-25, 2007, Tokyo, Japan.

- [22] Basante, M., Camargo, R., Criollo, W. (2011). Muerte fotocatalítica de células de cáncer de cuello uterino (HELA y CHO) por efecto de nanocompuestos TiO₂-MWCNTs-Folato.
- [23] Sakai, H., Ito, E., Cai, R., Yoshioka, T., Kubota, Y., Hashimoto, K. y Fujishima, A. (2003). Intracellular Ca²⁺ concentration change on T24 cell under irradiation on the presence of TiO₂ ultrafine particles, *Biochimica et BiophysicaActa (BBA)- General Subjets*. 1202 (2): 259-265.
- [24] Xu, J., Sun, Y., Huang, J. Chen, C. , Liu, G., Jiang, Y., Zhao, Y., Jianng, Z. Photokilling. (2007). Cancer Cells Using Highly Cell-Specific Antibody–TiO₂. Bioconjugates and Electroporation. *ScienceDirect*. 71, 217-222
- [25] Labanauskiene, J., Gehl, J., Didziapetriene, (2007) . J. Evaluation of cytotoxic effect of photodynamic therapy in combination with electroporation in vitro, Bioelectrochemistry, *ScienceDirect*. 70 :78-82.
- [26] Primo, F., Michieletto, L., Rodrigues, M., Macaroff, P., Morais, P., Lacava, Z., Bentley, M., Tedesco, A. (2007). Magnetic nanoemulsions as drug delivery system for Foscan: skin permeation and retention in vitro assays for topical application in photodynamic therapy (PDT) of skin cancer. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 311(1): 354-357.
- [27] Thurn, K., Arora, H., Paunesku, T., Wu, A., Brown, E., Doty, C., Kremer, J. y Woloschak, G. (2011). Endocytosis of titanium dioxide nanoparticles in prostate cancer PC-3M cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 7(2): 123-130.

- [28] Zhang, A.P., Sung, Y.P. (2004). Photocatalytic killing effect of TiO₂ nanoparticles on Ls-174-t human colon carcinoma cells. *The American Journal of Gastroenterology*, 10(21): 3191-3193.
- [29] Lai, T-Y., Lee, W-C. (2009). Killing of cancer cell line by photoexcitation of folic acid-modified titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 204(2-3): 148-153.
- [30] Madroñero, de la C. (2004). Therapeutic utilisation of the magnetic fields. I. Principles of the biomagnetism. *Patologia del Aparato Locomotor*. 2 (1): 22-37.
- [31] Madroñero, de la C. (2004). A review of their different applications. *Patologia del Aparato Locomotor*. 2 (2): 90-104.
- [32] Sakurai, H., Okuno, K., Kubo, A., Nakamura, K., Shoda, M. (1999). Effect of a 7-tesla homogeneous magnetic field on mammalian cells. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. 49: 57-63.
- [33] Nakahara, T., Yaguchi, H., Yoshida, M., Miyakoshi, J. (2002). Effects of exposure of CHO-K1 cells to a 10-T static magnetic field. *Radiology*. 224: 817-821.
- [34] Koyama, S., Nakahara, T., Wake, K., Taki, M., Isozumi, Y., Miyakoshi, J. (2003). Effects of high frequency electromagnetic fields on micronucleus formation in CHO-K1 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 541 (1-2): 81-89.
- [35] Bodega, G., Forcadaa, I., Suarez, I., Fernandez, B. (2005). Acute and chronic effects of exposure to a 1-mT magnetic field on the cytoskeleton, stress proteins, and proliferation of astroglial cells in culture. *Environmental Research*. 98: 355-362.

- [36] Zhou, J., Ming, L., Ge, B., Wang, J., Zhu, R., Wei, Z., Ma, H., Xian, C., Chen, K. (2011). Effects of 50 Hz sinusoidal electromagnetic fields of different intensities on proliferation, differentiation and mineralization potentials of rat osteoblasts. *Bone*. 49: 753-761.
- [37] Jimenez-Garcia, M., Arellanes-Robledo, J., Aparicio-Bautista, D., Rodriguez-Segura, M., Villa-Treviño, S., Godina-Nava, J. (2010). Antiproliferative effect of extremely low frequency electromagnetic field on preneoplastic lesions formation in the rat liver. *BMC* 10: 159.
- [38] Lagroye, I., Percherancier, Y., Juutilainen, J., Pouletier, F., Veyret, B. (2011). ELF magnetic fields: animal studies, mechanisms of action. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 107: 369-373.
- [39] Raylman, R., Clavo, A., Wahl, R. (1996). Exposure to strong static magnetic field slows the growth of human cancer cells in vitro. *Bioelectromagnetics*. 358-363.
- [40] Noriega, B., Sabanero, M., Avila, M., Sosa, M. (2011). Influence of pulsed magnetic fields on the morphology of bone cells in early stages of growth. *Micron*. 42(6): 600-607.
- [41] Kim, J., Seung, C., Lee, H., Song, K. (2010). Repetitive exposure to a 60 Hz time varying magnetic field induces DNA double-strand breaks and apoptosis in human cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 400: 739-744.

- [42] Líneas De Investigación Para el Control del Cáncer en Colombia. (2012). Consultado el 12 de Mayo de 2012, Instituto Nacional de Cancerología, página web de servicios: <http://www.incancerologia.gov.co>.
- [43] Liga contra el cáncer. Sección Bogotá. (n.d). Consultado el 12 Mayo de 2012. De <http://www.ligacontraelcancer.com.co>.
- [44] Monsonego, J. et al. (2004). Mini Review, Cervical Cancer Control, Priorities and New Directions. *International Journal Cancer*.108(329-333).
- [45] Mortalidad de cancer en Colombia según Globocan 2008. (2012). Consultado el 13 de febrero de 2012.
<http://www.cancer.gov.co/documentos/Incidencia/Tabla%20II-%20Estimaciones%20Mujeres.pdf>
- [46] Ramírez, B., Trassierra V., Vera D, Jiménez JF. (2007). Terapia fotodinámica en el cáncer de próstata localizado, Valencia : Servicio de Urología. Hospital Universitario La Fe.
- [47] Li, L., Xie, J., Zhang, X., Cheng, J., Luo, Y., Zhang, L., Luo, R. (2010). Retrospective study of photodynamic therapy vs photodynamic therapy combined with chemotherapy and chemotherapy alone on advanced esophageal cancer. *Photodiagnoses and Photodynamic Therapy*. 7: 139-143.
- [48] Allison, R., Moghissi, K., Downie, G., Dixon, K. (2011). Photodynamic therapy (PDT) for lung cancer. *Photodiagnoses and Photodynamic Therapy*. 8: 231-239.
- [49] Stasinakis, A.S., Advanced Oxidation Processes, (2008). Use of selected advanced oxidation processes (AOPs) for wastewater treatment, *Global NEST Journal*, 10(3), 376-385.

- [50] Fujishima, A. Rao, T.N., Tryk, D.A. (2000). Titanium dioxide photocatalysis, J. photochem. Photobiol. C 1 : 1-21
- [51] Blake, D. M., Maness, P., Huang, Z., Wolfrum, E. J., Huang, J., Jacoby, W. A. (1999). Application of the photocatalytic chemistry of titanium dioxide to disinfection and the killing of cancer cells. Separation and Purification Methods, Volume 28(1), pp.6-9
- [52] Foto tomada de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-28042005000200006&script=sci_arttext, el día 13 de septiembre 2013.
- [53] Giraldo-Junco, J. (2007). Degradación de ácidos húmicos en aguas mediante fotocatálisis homogénea y heterogénea. *Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de Químico*. Universidad del Valle, facultad de ciencias, departamento de química.
- [54] Linovitz RJ, Pathria M, Bernhardt M, Green D, Law MD, McGuire RA, Montesano PX, Rehtine G, Salib RM, Ryaby JT and others. (2002). "Combined magnetic fields accelerate and increase spine fusion: a double blind, randomised, placebo controlled study". Spine 27:1383-1389.
- [55] Trock DH, Bollet AJ, Markoll R. (1994). "The effect of pulsed electromagnetic fields in the treatment of osteoarthritis of the knee and cervical spine. Report of randomised, double blind, placebo controlled trials". J Rheumatol 21:1903- 1911.
- [56] Chang K, Chang WH-S. (2003), "Pulsed electromagnetic fields prevent osteoporosis in an ovariectomized female rat model: A prostaglandin E2-associated process". Bioelectromagnetics 24:189-198.

- [57] Pavlin M, Pavselj N, Miklavcic D. (2002), "Dependence of induced transmembrane potential on cell density, arrangement, and cell position inside a cell system". IEE Trans Biomed Eng 49:605-612
- [58] Bassett, C.A.L. (1994), "Therapeutic uses of electric and magnetic fields in orthopedics. In: Biological Effects of Electric and Magnetic Fields", Eds. D.O. Carpenter and S. Ayrapetyan. Academic Press, San Diego,. Vol. II: 13-48.
- [59] Gossling HR, Bernstein RA, Abbott J. (1992), "Treatment of ununited tibial fractures: a comparison of surgery and pulsed electromagnetic fields (PEMF)". Orthopedics 15:711-719.
- [60] Diniz P, Shomura K, Soejima K, Ito G. (2002), "Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblasts". Bioelectromagnetics 23:398-405.
- [61] Barnes, F.S. and Hu, C.L., Nonlinear interactions of electromagnetic waves with the biological materials, in Nonlinear Electromagnetics, Uslenghi, P.L.L., Ed., Academic Press, New York, 1980, 391-426.
- [62] Singer, S.J. and Nicolson, G.L, The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, Science, 1972; 175, 720-731.
- [63] Poo, M., In situ electrophoresis of membrane components, in Annual Review of Biophysics and Bioengineering, Vol. 10, Mullins, L.J., Ed., Academic Press, New York, 1981; 245-276.
- [64] Wertheimer, N., Leeper, E, (1979). Electrical wiring configurations and childhood cancer. *American Journal of Epidemiology*. 109(3): 273-284.

- [65] World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. Volume 80: Non-ionizing radiation, Part 1, Static and extremely low-frequency (ELF) electric and magnetic fields. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. 2002: Lyon, France.
- [66] Tynes, T., Haldorsen, T. (2003) Residential and occupational exposure to 50 Hz magnetic fields and hematological cancers in Norway. *Cancer Causes & control*; 14: 715-720.
- [67] Labreche, F., Goldberg, MS., Valois, M-F. et al. (2003). Occupational exposures to extremely low frequency magnetic fields and postmenopausal breast cancer. *American Journal of Industrial Medicine*; 44: 643-652.
- [68] Willet, E., McKinney, P., Fear, N. et al (2003). Occupational exposure to electromagnetic fields and acute leukaemia: Analysis of a case-control study. *Occupational and Environmental Medicine*; 60: 577-583.
- [69] Terapias para el cancer con campos electromagneticicos. Consultado el 21 de enero de 2013. <http://www.dailymail.co.uk/news/article-2083803/Hopes-cancer-breakthrough-treatment-using-electromagnetic-fields-shrink-tumours.html>
- [70] Zimmerman, Z., Pennison, M., Brezovich, I., Nengun, Y., Yang, C., Ramaker, R., Absher, D., Myers, R., Kuster, N., Costa, F., Barbault, A., Pasche, B. (2012). Cancer cell proliferation is inhibited by specific modulation frecuencies. *British Journal of Cancer*; 106: 307-313.
- [71] Blackman, C. (2012) Editorial: Treating cancer with amplitude-modulated electromagnetic fields: a potential paradigm shift, again? *British Journal of Cancer*; 106: 241-242.

- [72] Sato, K., Yamaguchi, H., Miyamoto, H., Kinouchi, Y. (1992). Growth of human cultured cells exposed to a non-homogeneous static magnetic field generated by Sm-Co magnets. *Biochim Biophys Acta*. 1136(3):231-238.
- [73] Adair, R.K. (1998). Extremely low frequency electromagnetic fields do not interact directly with DNA. *Bioelectromagnetics*. 19: 136-138.
- [74] Valberg, P., Kavet, R., Rafferty, C. (1997). Can low level 50/60 Hz electric and magnetic fields cause biological effects?. *Radiat. Res*. 148: 2-21.
- [75] McCann, J., Dietrich, F., Rafferty, C. (1998). The genotoxic potential of electric and magnetic fields: an update. *Mutat. Res*. 411: 45-86.
- [76] Juutilainen, J., Lang, S. (1997). Genotoxic, carcinogenic and teratogenic effects of electromagnetic fields. Introduction and overview. *Mutat. Res*. 387: 165-171.
- [77] Zmyslony, M., Palus, J., Jajte, J., Dziubaltowska, E., Rajkowska, E. (2000). DNA damage in rat lymphocytes treated in vitro with iron cations and exposed to 7 mT magnetic fields (static or 50 Hz). *Mutat. Res*. 453: 89-96.
- [78] Lai, H., Singh, N. (2004). Magnetic field-induced DNA strand breaks in brain cells of the rat. *Environ. Health Perspect*. 112: 687-694.
- [79] Brocklehurst, B., McLauchlan, K. (1996). Free radical mechanism for the effects of environmental electromagnetic fields on biological systems. *Int. J. Radiat. Biol*. 69: 3-24.

- [80] Rosenthal, M., Obe, G. (1989) Effects of 50 Hz electromagnetic fields on proliferation and on chromosomal alterations in human peripheral lymphocytes untreated or pretreated with chemical mutagens. *Mutat. Res.* 210: 329-335.
- [81] Katsir, G., Baram, S., Parola, A. (1998). Effect of sinusoidally varying magnetic fields on cell proliferation and adenosine deaminase specific activity. *Bioelectromagnetics*. 19: 46-52.
- [82] Mattei, M., Caruso, A., Traina, G., Pezzetti, F., Baroni, T., Sollazzo, V. (1999). Correlation between pulsed electromagnetic fields exposure time and cell proliferation increase in human osteosarcoma cell lines and human normal osteoblast cells in vitro *Bioelectromagnetics* 20: 177-182.
- [83] Cadossi, R., Bersani, F., Cossarizza, A., Zucchini, P., Emilia, G., Torelli, G., Franceschi, C. (1992). Lymphocytes and low-frequency electromagnetic fields. *FASEB. J.* 6: 2667-2674.
- [84] Harris, P., Lamb, J., Heaton, B., Wheatley, D. (2002). Possible attenuation of the G2 DNA damage cell cycle checkpoint in HeLa cells by extremely low frequency (ELF) electromagnetic fields. *Cancer Cell Int.* 2: 3.
- [85] Brocklehurst, B., Mclauchlan, K.A. (1996). Free radical mechanism for the effects of environmental electromagnetic fields on biological systems. *Int. J. of Radiation Biology*. 69: 3–24.
- [86] Kohno, M., Yamazaki, M., Kimura, I., Wada, M. (2000). Effect of static magnetic fields on bacteria: *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* and

Escherichia coli. *Pathophysiology*. 7: 143–148.

[87] Wenjin, J., Huimin, H., Aihua, D., Chunyang, P. (2009) Effects of static magnetic fields on Escherichia coli. *Micron*. 40: 894-898.

[88] Luciana, D., Luigi, A. (2005). Bioeffects of moderate-intensity static magnetic fields on cell cultures. *Micron*. 36: 195-217.

[89] Rosen, A. (1993). Membrane response to static magnetic fields: effect of exposure duration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1148: 317-320.

[90] Strasak, L., Vetter, V., Smarda, J. (2002). Effects of low-frequency magnetic fields on bacteria Escherichia coli. *Bioelectrochemistry*. 55: 161-164.

[91] Binh, V. (1997b). Interference of ion quantum states within a protein explains weak magnetic field's effect on biosystems. *Electro and Magnetobiology*. 16: 203-214.

[92] Binh, V. (1998). Interference mechanism for some biological effects of pulsed magnetic fields. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. 45: 73-81.

[93] Lednev, V. (1991). Possible mechanism for the influence of weak magnetic fields on biological systems. *Electromagnetics*. 12: 71-75.

[94] Ross, S. (1990). Combined DC and ELF magnetic fields can alter cell proliferation. *Bioelectromagnetics*. 11: 27-36.

[95] Hashimoto, Y., Kawasumi, M., Saito, M. (2007). Effect of static magnetic field

on cell migration. *Electr. Eng. Jpn.* 160: 46-52.

[96] Kotani, H., Kawaguchi, H., Shimoaka, T., Iwasaka, M., Ueno, S., Ozawa, H. (2002). Strong static magnetic field stimulates bone formation to a definite orientation in vitro and in vivo. *J. Bone Miner Res.* 17: 1814-1821.

[97] Lyle, D., Fuchs, T., Cassamento, J., Davis, C., Swicord, M. (1997). Intracellular calcium signaling by Jurkat T-lymphocytes exposed to a 60 Hz magnetic field. *Bioelectromagnetics.* 18: 439-445.

[98] Ba, X., Hadjiargyrou, M., DiMasi, E., Meng, Y., Simon, M., Tan, Z., Rafailovich, M. (2011). The role of moderate static magnetic fields on biomineralization of osteoblasts on sulfonated polystyrene films. *Biomaterials.* 32: 7831-7838.

[99] Kotani, H., Iwasaka, M., Ueno, S., Curtis, A. (2000). Magnetic orientation of collagen and bone mixture. *J. Appl. Phys.* 87: 6191-6193.

[100] Ivancsits, S., Diem, E., Pilger, A., et al. (2002). Induction of DNA strand breaks by intermittent exposure to extremely-low-frequency electromagnetic fields in human diploid fibroblasts. *Mutat. Res.* 519: 1-13.

[101] McNamee, J., Bellier, P., Chauhan, V., et al. (2005). Evaluating DNA damage in rodent brain after acute 60 Hz magnetic-field exposure. *Radiat. Res.* 164: 791-797.

[102] Tuinstra, R., Greenebaum, B., Goodman, E. (1997). Effects of magnetic fields on cell-free transcription in E. Coli and HeLa extracts. *Bioelectrochemistry and*

Bioenergetics. 43: 7-12.

[103] Goodman, M., Greenebaum, B., Marron, M. (1995). Effects of electromagnetic fields on molecules and cells. *International Review of Cytology*. 158: 279-338.

[104] Sisken, B., Kanje, M., Lundborg, G., Herbst, E., Kurtz, W. (1989) Stimulation of rat sciatic nerve regeneration with pulsed electromagnetic fields. *Brain Res*. 485: 309-316.

[105] Pessina, G., Aldinucci, C., Palmi, M., Sgaragli, G., Benocci, A., Meini, A., Pessina, F. (2001). Pulsed electromagnetic fields affect the intracellular calcium concentrations in human astrocytoma cells. *Bioelectromagnetics*. 22: 503-510.

[106] Islam, S., Kusumoto, Y., Abdulla-Al-Mamun, Horie, Y. (2011). Photocatalytic and AC magnetic-field induced enhanced cytotoxicity of Fe₃O₄-TiO₂ core-shell nanocomposites against HeLa cells. *Catalysis Communications* 16: 39-44

[107] Cai, R., Baba, R., Hashimoto, K., Kubota, Y., Fujishima, A. (1993). Photoelectrochemistry of TiO₂ particles: efficient electron transfer from de TiO₂ particles to a redox enzyme. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 360 (1-2): 237-245.

ANEXO 1

Mantenimiento de los cultivos

La línea celular HeLa 229 y CHO-K1 se mantendrán en medio RPMI 1640 y Han F-12K respectivamente (Gibco-BRL) suplementado con 10% Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco-BRL0), 2 mM de L-glutamina (Gibco-BRL). Se utilizará Hepes (pH 7.2) a una concentración de 2 mM para evitar cambios en el pH.

Las células se incuban a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ en botellas de cultivo Falcon T-75 cm².

La manipulación de cultivos y preparación de soluciones será realizada en una cabina de flujo laminar tipo A2B3, manteniendo máximas las condiciones de esterilidad.

Para el manejo de las líneas celulares se debe tener un nivel 1 de bioseguridad y adecuadas condiciones de asepsia.

Congelación y descongelación del stock de la línea celular

Cada vez que se descongele un vial stock, las células se siembran en 2 botellas T-75, uno para la realización de experimentos y otro para volver a congelar. De esta manera se asegura que todas las líneas utilizadas en este trabajo permanezcan disponibles en el laboratorio de cultivos celulares.

La criopreservación se hace, a una concentración de 5×10^6 células por ml., en medio de cultivo de Suero Fetal Bovino (SFB) y Dimetilsulfóxido (DMSO), utilizado para evitar la formación de cristales intracelulares que pudieran dañar las células.

Procedimiento de congelación de células

Para la criopreservación de las líneas celulares se deben seguir las siguientes pautas:

Para células adherentes

- a) Se descarta el medio de cultivo de la botella de cultivo.
- b) Se lavan las células 3 veces con Búfer Salino Fosfato (PBS) estéril.
- c) Se adiciona tripsina y se incuba a 37 °C para desprender las células de la superficie de la botella.
- d) Se inhibe la acción de la tripsina adicionando medio de crecimiento.
- e) Se colectan las células en un tubo y se centrifuga a 1500 rpm., 5 minutos.
- f) Se descarta el sobrenadante y se lava el pellet celular 3 veces con PBS estéril.
- g) Se resuspende el pellet en medio de cultivo frío con 10% de DMSO.
- h) Se dispensa en crioviales de a 1 ml.

- i) Criopreservar los viales a -80 °C, por 24 horas y posteriormente depositar los viales en tanque con nitrógeno líquido hasta el momento de su utilización.

Procedimiento de descongelación

El objetivo de este procedimiento es eliminar el DMSO del medio de criopreservación, ya que este resulta tóxico para algunas células en crecimiento, especialmente células no adherentes.

- a) Descongelar el criovial rápidamente a un baño a 37 °C.
- b) Colectar el volumen de células con una pipeta serológica y colocar el contenido en un tubo de centrifuga con 5 ml de medio de cultivo frío.
- c) Centrifugar durante 5 minutos a 1000 rpm.
- d) Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet celular en 5 ml de medio de cultivo a 37 °C.
- e) Colectar el volumen de células con una pipeta y pasarlo a una botella de cultivo de 25 cm³.
- f) Colocar la botella de cultivo en una incubadora a 37 °C, en atmósfera húmeda, que contenga 5% de CO₂, y controlar el crecimiento celular, cambiar el medio de crecimiento cada 2 o 3 días.

Cada vez que se congele un stock celular se anota en el criovial el número exacto del pase de la línea celular utilizada.

Sub-cultivo celular

Cuando las células estén a condiciones de confluencia, se procede a sub-cultivar, garantizando el crecimiento exponencial de las células. El sub-cultivo permite controlar la densidad del inóculo inicial y asegura las condiciones óptimas para el crecimiento de cada línea celular.

Procedimiento para sub-cultivo de células

Para realizar el sub-cultivo celular se deben seguir los siguientes pasos.

- Para células adherentes:
 - a) Descartar el medio de cultivo.
 - b) Lavar la monocapa celular tres veces con PBS estéril.
 - c) Adicionar tripsina e incubar a 37 °C para desprender las células de la superficie de la botella.
 - d) Se inhibe la acción de la tripsina adicionando medio de crecimiento.
 - e) Se colectan las células en un tubo y se centrifuga a 1,500 rpm., por 5 minutos.
 - f) Se descarta el sobrenadante y se lava el pellet celular tres veces con PBS estéril.
 - g) Se cuenta el número total de células del cultivo, utilizando el método de exclusión con azul de tripan.
 - h) Pasar a botellas de cultivo.

- i) Colocar la botella de cultivo en una incubadora a 37 °C, en atmosfera húmeda, que contenga 5% de CO₂, y controlar el crecimiento celular, cambiar el medio de crecimiento cada 2 o 3 días.

Observaciones: El número de pases indica cuantas veces se ha sub-cultivado una línea celular. Se recomienda trabajar con células con pocos pases ya que las líneas celulares establecidas tienden a ser inestables, y como consecuencia habría cambios fisiológicos y morfológicos con el paso del tiempo.

Condiciones óptimas de los cultivos

El cultivo es incubado a 37 °C en una atmosfera humidificada, con 5% de CO₂. El medio de crecimiento celular es cambiado cada 2 a 3 días hasta que se observa la confluencia de la monocapa celular.

ANEXO 2

Viabilidad por conteo celular

La determinación del número de células para la siembra y los pases se realizan por el método de exclusión con azul de tripán, que consiste en diluir 1:10 las células aisladas (0.1 mL) y (0.9 mL) de azul de tripán. La dilución se coloca en una cámara de conteo celular para determinar el número de células vivas y muertas. El método de exclusión con azul de tripán permite diferenciar las células vivas (aquellas que durante la observación al microscopio no adquieren el colorante, su membrana celular permanece intacta y es selectiva al colorante), de las células muertas (ya que al observarlas bajo el microscopio se ven azules, por la permeabilidad de la membrana).

Ensayo de viabilidad con azul de Tripán

El método de exclusión con azul de tripán permite hacer tinciones histológicas que permite diferenciar las células vivas (no adquieren coloración), de las muertas (durante la observación al microscopio se ven azules, ya que el colorante ha permeado la membrana celular). La tinción con azul de tripán y la utilización de un microscopio o bajo una cámara de Neubauer permite hacer determinaciones de proliferación y viabilidad celular. Este proceso permite determinar la densidad de las líneas celulares (en Nº células/ml) y asegurar que el cultivo haya alcanzado su nivel óptimo de crecimiento antes de

congelarse o realizar cualquier ensayo. También se utiliza para determinar el número de células viables posterior al tratamiento con nano compuestos.

- a) El procedimiento para determinar la viabilidad es el siguiente:
- b) Descartar el medio de cultivo.
- c) Lavar la monocapa 3 veces con el PBS estéril.
- d) Adicionar tripsina e incubar a 37 °C para desprender las células de la superficie de la botella.
- e) Se inhibe la acción de la tripsina adicionando medio de crecimiento.
- f) Se colectan las células en un tubo y se centrifuga a 1,000 rpm., por 5 minutos.
- g) Se descarta el sobrenadante y se lava el pellet celular 3 veces con PBS estéril.
- h) Diluir 1:10 las células aisladas (0.1 ml de la suspensión de células) y (0.9 ml de azul de tripan).
- i) Colocar 10 µl de la dilución en una cámara de conteo celular (Neubauer) y observar al microscopio óptico para determinar el número de células vivas y muertas. Realizar el conteo celular en los campos visuales (superior izquierdo y derecho, inferior izquierdo y derecho).
- j) Contar el número de células presentes en los 4 campos (número total de células, número de células viables y número de células inviables) y obtener promedio de células.
- k) El número de células por ml se obtiene multiplicando el promedio de células por 10 (factor de dilución con la suspensión del cultivo y el azul de tripan),

por el volumen de suspensión inicial de las células en el medio, por 10.000 como constante de la cámara de Neubauer.

- l) El resultado obtenido corresponde al número total de células. El número de células viables o el número de células muertas se realiza de igual manera pero discriminando cuales de las células contadas son viables y cuáles no, esto servirá para realizar la determinación de viabilidad y mortalidad celular.

$$\% \text{ Viabilidad} = (\text{Nº de células viables} / \text{Nº total de células}) \times 100$$

$$\% \text{ Mortalidad} = (\text{Nº total de células muertas} / \text{Nº total de células}) \times 100$$

ANEXO 3

Estudio citotóxico

Se basa en la liberación de un sobrenadante de cultivo de sustancias detectables como:

- Cromo (51)
- Colorantes
- Enzimas (LDH)

Ensayo LDH

El ensayo de lactato deshidrogenasa es una alternativa no radioactiva para determinar y cuantificar la muerte celular por análisis colorimétrico. Se basa en la medida de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa que se libera de las células dañadas al sobrenadante del medio de cultivo.

Cuando la actividad enzimática de LDH en el sobrenadante del cultivo aumenta es porque se ha tenido un incremento en la cantidad de células muertas o con membranas dañadas. Este aumento en la cantidad de actividad enzimática en el sobrenadante se correlaciona directamente con la cantidad de Formazán generado durante un lapso. Por lo tanto, la cantidad de color formada en el análisis se correlaciona directamente con el número de células lisadas.

La actividad de la LDH inicia cuando el NAD^+ se reduce a NADH/H^+ por la LDH y el lactato pasa a piruvato. El segundo paso es cuando el catalizador (bifásico) transfiere H/H^+ a las sales de tetrazolium INT se reduce a formazán. Ver figura a.

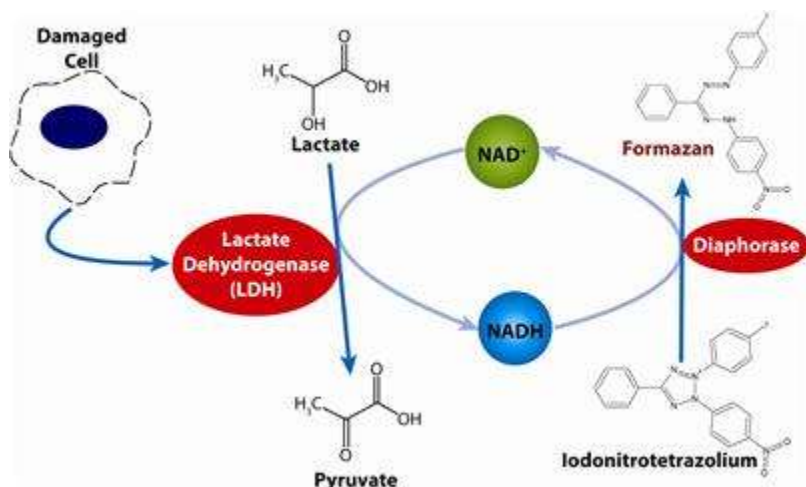


Figura 17. Mecanismo de la actividad de la enzima LDH.

Para realizar ensayos de Citotoxicidad con el kit de LDH $\text{\textcircled{R}}$ ROCHE se utilizan 3 controles:

- ✓ **Control Blanco:** Proporciona información sobre la actividad de LDH contenida en el medio de análisis. El valor de la absorbancia obtenido en este control se resta del resto de valores, cuando la medición de la absorbancia es mayor de 0.200.

- ✓ **Control Bajo:** Proporciona la información sobre la actividad de LDH liberada por las células normales no tratadas (es una liberación espontánea de LDH, esta es propia de las células).

- ✓ **Control Alto:** Proporciona la información sobre la actividad de liberación máxima de LDH de las células (liberación máximo LDH, en presencia de una sustancia citotóxica en este caso Triton X-100).

Cálculos:

Para determinar el porcentaje de actividad citotóxica, se calculan los valores promedio de la absorbancia de los ensayos por triplicado, haciendo luego la diferencia entre cada uno de estos valores y el obtenido del control Blanco. Los resultados se sustituyen en la siguiente ecuación:

Determinación de la citotoxicidad

$$\%de\ citotoxicidad = \frac{Lectura\ Muestra\ (CEM) - Control\ bajo}{Control\ alto - Control\ bajo}$$

ANEXO 4

One-way ANOVA: %A_1 versus Tratamientos para HeLa

Source	DF	SS	MS	F	P
Condiciones para Hela	5	0,06547	0,01309	7,12	0,003
Error	12	0,02207	0,00184		
Total	17	0,08753			

S = 0,04288 R-Sq = 74,79% R-Sq(adj) = 64,29%

One-way ANOVA: %A_2 versus Tratamientos HeLa con A

Source	DF	SS	MS	F	P
condiciones hela con A	5	0,005168	0,001034	8,58	0,001
Error	12	0,001445	0,000120		
Total	17	0,006613			

S = 0,01097 R-Sq = 78,15% R-Sq(adj) = 69,05%

One-way ANOVA: %A_3 versus Tratamientos HeLa con Tr

Source	DF	SS	MS	F	P
Condiciones Hela Tr	5	0,04982	0,00996	9,07	0,001
Error	12	0,01319	0,00110		
Total	17	0,06300			

S = 0,03315 R-Sq = 79,07% R-Sq(adj) = 70,35%

One-way ANOVA: %A_4 versus Tratamientos HeLa con Tr y A

Source	DF	SS	MS	F	P
Condiciones HELA Tr A	5	0,04812	0,00962	4,69	0,013
Error	12	0,02464	0,00205		
Total	17	0,07277			

S = 0,04532 R-Sq = 66,13% R-Sq(adj) = 52,02%

One-way ANOVA: %A_5 versus Tratamientos para CHO

Source	DF	SS	MS	F	P
Condiciones para CHO	5	0,032721	0,006544	7,60	0,002
Error	12	0,010327	0,000861		
Total	17	0,043048			

S = 0,02934 R-Sq = 76,01% R-Sq(adj) = 66,02%

One-way ANOVA: %A_6 versus Tratamientos para CHO con A

Source	DF	SS	MS	F	P
Condiciones para CHO con	5	0,026950	0,005390	9,09	0,001
Error	12	0,007113	0,000593		

Total 17 0,034062

S = 0,02435 R-Sq = 79,12% R-Sq(adj) = 70,42%

One-way ANOVA: %A_7 versus Tratamientos para CHO con Tr

Source	DF	SS	MS	F	P
Condiciones para CHO con	5	0,051158	0,010232	24,08	0,000
Error	12	0,005099	0,000425		
Total	17	0,056258			

S = 0,02061 R-Sq = 90,94% R-Sq(adj) = 87,16%

One-way ANOVA: %A_8 versus Tratamientos para CHO con Tr y A

Source	DF	SS	MS	F	P
Condiciones para CHO con	5	0,094860	0,018972	26,30	0,000
Error	12	0,008657	0,000721		
Total	17	0,103517			

S = 0,02686 R-Sq = 91,64% R-Sq(adj) = 88,15%

One-way ANOVA: % citotoxicidad versus Celula

Source	DF	SS	MS	F	P
Celula	23	45926,48	1996,80	2073,37	0,000
Error	48	46,23	0,96		
Total	71	45972,71			

S = 0,9814 R-Sq = 99,90% R-Sq(adj) = 99,85%

GROUPING INFORMATION USING TURKEY METHOD

Celula	N	Mean	Grouping
HeLa A EB UV40	3	99,990	A
HeLa A EB UV30	3	83,740	B
HeLa A EB UV20	3	6,990	C
HeLa EB UV20	3	3,730	D
HeLa EB UV30	3	3,037	D E
HeLa EB UV40	3	2,450	D E F
CHO EB UV20	3	2,178	D E F
CHO EB UV40	3	2,060	D E F
CHO EB UV30	3	1,672	D E F
CHO A EB UV10	3	0,880	D E F
HeLa A EB	3	0,270	E F
CHO EB UV10	3	0,242	E F
CHO XX	3	0,153	E F
HeLa EB UV10	3	0,068	E F
CHO EB	3	0,053	E F
HeLa EB	3	0,040	E F
HeLa XX	3	0,034	E F
HeLa A XX	3	0,023	E F
CHO A EB UV20	3	0,000	E F
HeLa A EB UV10	3	-0,001	E F
CHO A EB UV40	3	-0,014	E F
CHO A XX	3	-0,023	E F
CHO A EB UV30	3	-0,069	F

CHO A EB 3 -0,099 F

Means that do not share a letter are significantly different.

ANEXO 5

Tabla 4. Porcentajes de citotoxicidad para las células HeLa y CHO para los diferentes tratamientos.

Célula + Tratamiento	% Citotoxicidad	Triplicado 1	Triplicado 2	Triplicado 3
CHO A XX	-0.0233	0.004	-0.054	-0.02
HeLa A XX	0.0227	0.032	0.021	0.015
CHO XX	0.1530	0.139	0.158	0.162
HeLa XX	0.0337	0.051	0.022	0.028
CHO A EB	-0.0987	-0.016	0.02	-0.3
HeLa A EB	0.2697	0.245	0.285	0.279
CHO EB	0.0533	0.045	0.061	0.054
HeLa EB	0.0397	-0.015	0.09	0.044
CHO A EB UV10	0.8803	0.902	0.728	1.011
HeLa A EB UV10	-0.0010	-0.019	0.006	0.01
CHO EB UV10	0.2420	0.249	0.244	0.233
HeLa EB UV10	0.0683	0.058	0.071	0.076
CHO A EB UV20	0.0003	0.02	-0.014	-0.005
HeLa A EB UV20	6.9900	6.949	6.969	7.052
CHO EB UV20	2.1783	2.095	2.321	2.119
HeLa EB UV20	3.7303	3.886	3.538	3.767
CHO A EB UV30	-0.0690	-0.023	-0.116	-0.068
HeLa A EB UV30	83.7403	89.219	81.672	80.33
CHO EB UV30	1.6720	1.833	1.612	1.571
HeLa EB UV30	3.0370	3.017	3.142	2.952
CHO A EB UV40	-0.0143	0.021	-0.045	-0.019
HeLa A EB UV40	99.9900	99.99	99.99	99.99
CHO EB UV40	2.0600	2.096	1.998	2.086
HeLa EB UV40	2.4497	2.338	2.476	2.535