

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA**



**APLICACIÓN DE ESPECTROSCOPIA DE PLASMA INDUCIDO POR LÁSER A
ESCALA MICROSCÓPICA PARA LA DETERMINACION DE METALES TRAZA
EN TEJIDOS HUMANOS (PRÓSTATA).**

Trabajo Especial de Grado Presentado
ante la Ilustre Universidad Central de
Venezuela, por el Br. Alvaro Peña
Planchard, para optar al título de
Licenciado en Química.

Caracas, Octubre 2014

Los abajo firmantes designados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Seminario de Investigación titulado.

APLICACIÓN DE ESPECTROSCOPIA DE PLASMA INDUCIDO POR LÁSER A ESCALA MICROSCÓPICA PARA LA DETERMINACION DE METALES TRAZA EN TEJIDOS HUMANOS (PRÓSTATA)

Presentado por el Br. Alvaro Peña Planchard, C.I. 17.558.229, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos en nuestra magna casa de estudios para optar al título de Licenciado en Química.

Dr. Manuel Caetano
(Tutor)

Dr. Vincent Piscitelli
(Tutor)

Dr. Jose Chirinos
(Jurado)

Dra. Yosmeri Vitta
(Jurado)

Dr. Manuel Caetano, Profesor Titular del Centro de Físico Química de la Universidad Central de Venezuela y Dr. Vincent Piscitelli, Profesor Titular del centro de Físico Química la Universidad Central de Venezuela.

Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

APLICACIÓN DE ESPECTROSCOPIA DE PLASMA INDUCIDO POR LÁSER A ESCALA MICROSCÓPICA PARA LA DETERMINACION DE METALES TRAZA EN TEJIDOS HUMANOS (PRÓSTATA)

presentado por el Br. Alvaro Peña PLanchard portador de la cedula de identidad C.I. 17.558.229, ha sido revisado por nosotros y el mismo cumple con los requisitos establecidos en las normativas de la CTEG de la escuela de Quimica y por ello autorizamos su presentación.

Dr. Manuel Caetano.
(Jurado)

Dr. Vincent Piscitelli.
(Jurado)

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	1
RESUMEN	3
I.INTRODUCCIÓN	5
I.2.CÁNCER.....	5
I.3. EL CÁNCER DE PROSTATA.....	8
I.3.1. FACTORES DE RIESGO.....	12
I.3.2. DIAGNOSTICO DEL CANCER DE PRÓSTATA.....	15
I.3.3 RELACION ENTRE ELEMENTOS QUIMICOS Y EL CANCER.....	17
I.4. RELACION DE METALES TRAZAS CON EL CANCER DE PROSTATA.....	21
I.4.1. TÉCNICAS APLICADAS PARA EL ANÁLISIS DE ELEMENTOS TRAZA.....	21
I.4.2. ELEMENTOS TRAZA.....	21
I.4.3 DESVENTAJAS Y PROBLEMAS DE LAS TECNICAS APLICADAS PARA EL ANALISIS DE ELEMENTOS TRAZA.....	24
I.5 ESPECTROSCOPIA DE PLASMA INDUCIDO POR LÁSER A ESCALA MICROSCOPICA.....	25
I.5.1. ABLACION LASER.....	25
I.5.2. ESPECTROSCOPIA DE PLASMA INDUCIDO POR LÁSER (LIBS).....	26
II.OBJETIVOS	30
II.1. OBJETIVO GENERAL.....	31
II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
III.REVISION BIBLIOGRAFICA (ANTECEDENTES)	33
IV. RECOLECCION Y DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS	36
IV.1. MUESTRAS Y SU RECOLECCION.....	37
V.DISEÑO EXPERIMENTAL	40
V.I.MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS.....	41
V.II.MONTAJE Y DISEÑO EXPERIEMENTAL.....	41
V.I.METDODOLOGIA EXPERIMENTAL	44
VI.I.TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.....	45
VI.II.PORTA MUESTRA Y AJUSTES DE CONDICIONES PARA LA MEDIDA.....	45
VI.III. LINEAS OBTENIDAS EN LOS ESPECTROS Y SU IDENTIFICACION.....	50

VII.RESULTADOS Y DISCUSION.....	56
VII.III.ANALISIS DE LAS LINEAS DE LOS ELEMENTOS PRESENTES EN LAS CELULAS SANAS Y CON CANCER EN EL CORTE DE PROSTATA.....	57
VII.II.ANALISIS DE LAS LINEAS DE LOS ELEMENTOS PRESENTES EN LAS BIOPSIAS.....	69
VIII. CONCLUSIONES.....	72
IX. RECOMENDACIONES.....	74
X. BIBLIOGRAFIA.....	76
XI. APENDICE.....	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Las cinco primeras causas de mortalidad en Venezuela ambos géneros 2005.....	6
Tabla 2. Las diez primeras causas de mortalidad por cáncer en Venezuela.....	7
Tabla 3. Requerimientos diarios de algunos elementos traza en adultos de 25-50 años de edad.....	24
Tabla 4. Longitudes de onda obtenidas en el espectro de pulso de aire.....	47
Tabla 5. Longitudes de onda del espectro de biopsia a identificar.....	48
Tabla 6. Composición de estándares utilizados.....	49
Tabla7. Longitudes de onda de los elementos metálicos encontrados.....	51
Tabla 8. Líneas de Mg, Ca, y Fe exéresis de próstata con mayor densidad de células sanas.....	55
Tabla 9. Líneas de Na, exeresis de próstata con mayor densidad de células sanas.....	56
Tabla 10. Porcentaje de variabilidad líneas Fe y Ca II.....	58
Tabla 11. Intensidades de las líneas de Mg, Fe y Ca exéresis próstata células con cáncer.....	59
Tabla 12. Intensidades de las líneas de Na exéresis de próstata células con cáncer.....	60
Tabla13. Porcentaje de variabilidad de las intensidades de las líneas de Ca y Ca (#15) más intensa y la de Fe, Fe (#15).....	64
Tabla 14. Relación entre las líneas de Ca II de las zonas de exéresis de próstata..	66

Tabla 15. Relación entre las líneas de Fe de las zonas de exéresis de próstata.....	66
Tabla 16. Relación Ca/Fe promedio en ambas zonas.....	67
Tabla 17. Intensidades de las líneas de Mg, Fe y Ca en las biopsias.....	68
Tabla 18. Intensidades de las líneas de Na en las biopsias.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. La próstata y sus estructuras vecinales.....	7
Figura 2. Zonas de la Próstata.....	10
Figura 3. Comparación de una próstata sana y una con cáncer.....	11
Figura 4. Situación de incidencia por cáncer de próstata para el año 2003, según las tasas por Entidades Federales en Venezuela.....	14
Figura 5. Representación esquemática de los procesos involucrados en la ablación láser.....	26
Figura 6. Biopsias extraídas de próstata.....	35
Figura 7. Corte de próstata extraída suspendida en parafina.....	36
Figura 8. Corte de próstata extraída con zona con mayor índice de células con cáncer señalada.....	37
Figura 9. Diagrama del montaje experimental.....	39
Figura 10. Diámetro del cráter medido en un interferómetro de luz blanca.....	41
Figura 11. Porta muestra en forma de anillo con muestra suspendida.....	44
Figura 12. Biopsia atravesada por los pulsos con Q-Switch 103.....	44
Figura 13. Biopsias con diferentes longitudes.....	45
Figura 14. Biopsia en porta muestra con imanes.....	46
Figura 15. Espectro con interruptor Q de 102 y ub acumulado de 3 pulsos muestra suspendida.....	47
Figura 16. Espectro con pulso al aire.....	48
Figura 17. Espectro pastilla de MgSO ₄	50
Figura 18. Espectro pastilla de CaCO ₂	51
Figura 19. Espectro pastilla de Fe ₂ O ₃	51
Figura 20. Espectro pastilla de NaPO ₄	52
Figura 21. Pulsos exéresis de próstata con mayor densidad de células sanas.....	53
Figura 22. Pulsos exéresis de próstata con mayor densidad de células con cáncer.....	54

Figura 23. Espectro 14 exéresis de próstata con mayor densidad de células sanas.....	55
Figura 24. Intensidades de las líneas espectros exéresis de próstata zona de mayor concentración células sanas.....	58
Figura 25. Espectro 12 exeresis de próstata con mayor densidad de células con cáncer.....	60
Figura 26. Comparación de intensidades de las líneas de los espectros exéresis de próstata con células con cáncer.....	63
Figura 27. Zona con claros en el tejido exerésis de próstata mayor concentración de células con cáncer.....	64
Figura 28. Relación entre las zonas de exeresis de próstata intensidades promedio de las líneas de Ca.....	65
Figura 29. Relación entre las zonas de exéresis de próstata intensidades de las líneas de Fe.....	65
Figura 30. Comparación de las intensidades de las líneas de Mg, Fe, Ca II y Na III de los espectros de las biopsias.....	69

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo debo agradecerle a mis padres que en todo momento me ayudaron y motivaron durante todo mi estudio universitario y especialmente en la culminación de este TEG. Especialmente a mi padre que hizo todo lo posible por acompañarme físicamente y término acompañándome sentimentalmente. A mi madre que siempre estuvo encima presionándome y exigiéndome, sin lo cual se me hubiese hecho mucho más difícil. A mi familia que siempre me alentó, impulso y estuvo pendiente, especialmente a mis hermanos William Peña, Alberto Peña, Janette Peña, Carlos Peña, Oswaldo Peña, Soña Peña y mi tía Marixa Planchard. A mis compañeros de estudio que rápidamente se convirtieron en grandes amigos, especialmente a Karina Benavides, Giannina Recchimuzzi, Rubmary Gomez, Ariannais Chitty, Xavier Matute, Victor Fernandez, Sacha Oropeza, Loriet Cartaya, Mariana Amorer, Irving Marquez. A mis amigos que siempre estuvieron ahí Eduardo Hernandez, Maika Montes, Manuel Oliveros, Daniel Bello, Christina Friña, Maria Victoria Aguilar, Daniel Cova, Nestor Trejo, Alejandro Pineda y especialmente por su apoyo a Maureen Duran. A los profesores de la Facultad de Ciencias, en especial a los de la Escuela de Química Jose Daniel Martinez, Maria Rodriguez, Mary Lorena Araujo, Julio Osuna, Jimmy Castillo, Mauro Martinez, Gustavo Cabrera, los cuales no solo me brindaron excelencia y gran pedagogía si no también gran calidad humana, con mención especial al profesor Alberto Fernandez el cual me ayudo en gran medida en este TEG. A la unidad de postgrado en Urología y centro de patología de la Facultad de Medicina de la UCV especialmente a la Dra. Natalia por su ayuda y apoyo en la toma de las muestras para este proyecto. A mis tutores Dr. Manuel Caetano y Dr. Vincent Piscitelli quienes me aceptaron como su tesista y siempre estuvieron ahí brindándome su apoyo. A los jurados de este TEG Dr. Jose Chirinos y Dra. Yosmery Vitta por su excelente trabajo de evaluación. A mis compañeros de trabajo en Cervecería Polar con mención especial a mi jefa Carolina Cruz, quienes me brindaron la ayuda y el apoyo necesario en el trabajo para poder finalizar este TEG. Finalmente a Dios por permitirme llegar y culminar esta etapa de mi vida y a los que me acompañaron espiritual y sentimentalmente en especial mis abuelos.

RESUMEN

Se utilizó la técnica de espectroscopia inducida por láser (LIBS) para la identificación y posterior comparación de intensidades de líneas de metales en muestras de biopsias transrectales de próstata y corte de próstata extraída. Para las muestras de biopsias transrectales se ideó una porta-muestra sencillo que permitiera la realización de los pulsos sin interferencias externas. Se consiguieron condiciones de medida con las cuales se lograron identificar líneas de 4 elementos 2 de Ca y Na y una de Fe y Mg, de las cuales la de Mg no tuvo señal en todas las biopsias. En el corte de próstata extraída se identificaron por un patólogo 2 zonas, una con una alta concentración de células con cáncer y la otra con una concentración alta de células sanas. Esto permitió comparar los espectros de ambas zonas en donde se obtuvieron señales de 2 líneas de Ca, una de Fe y una de Mg la cual no se presentó en todos los espectros. Para el caso de Se compararon las líneas de Ca y Fe en ambas zonas obteniendo una intensidad promedio de Ca de 1170.1 y de Fe 159.2 cuentas para la zona con mayor concentración de células con cáncer y una intensidad promedio de Ca 787.5 y Fe 129.6, teniéndose una mayor relación Ca/Fe en la zona con mayor concentración de células con cáncer que en la de mayor concentración de células sanas.

I.INTRODUCCIÓN

I.I. CÁNCER

La célula es el elemento más simple, dotado de vida propia, que forma los tejidos organizados. Está compuesta por una masa rodeada de protoplasma que contiene un núcleo. Una pared celular rodea la célula y la separa de su ambiente. Dentro del núcleo está el ADN, que contiene la **información que programa la vida celular**.^[1]

El ser humano está formado por millones de células que se dividen y al hacerlo sus estructuras se dividen también en otras exactamente iguales a las anteriores, con los mismos componentes y funciones que la originaria.

Las células normales crecen y se reproducen a sí mismas a un ritmo limitado, dividiéndose sistemáticamente para dar nuevos tejidos. La célula normal pasa a convertirse en una célula cancerosa debido a un **cambio o mutación en el ADN**. Estas células son incapaces de realizar las funciones que corresponden a las células pertenecientes a ese tejido. Cuando crecen desordenadamente se amontonan produciendo masas denominadas “tumores”, algunos son benignos (no cancerosos) y otros malignos (cancerosos). La aparición de un tumor benigno interfiere en ocasiones con el buen funcionamiento del cuerpo al presionar o bloquear, impidiendo que los mismos puedan realizar su trabajo, aunque en general pocas veces ponen en peligro la vida. Los tumores malignos, por el contrario, invaden y destruyen los tejidos sanos a través de un proceso denominado metástasis. Las células tienden a emigrar a través de la sangre o de la linfa hacia otras partes del cuerpo donde forman nuevos tumores, ya que nunca dejan de multiplicarse. Este proceso puede darse de forma muy rápida y en otros casos de forma lenta.^[1,2]

El cáncer puede formarse en cualquier tipo de célula del tejido que incluya un conjunto de afecciones que son clasificadas según la célula de origen y el tipo de tejido. Existen 3 subdivisiones principales entre las cientos de diferentes formas de cáncer.^[2]

Los linfomas y leucemias, que proceden de tejidos formadores de células sanguíneas.

Los sarcomas, los cuales proceden de tejidos conectivos como huesos, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo.

Y la tercera subdivisión, **los carcinomas**, que incluyen algunos de los cánceres más comunes procedentes de tejidos epiteliales como la piel, los epitelios que tapizan las cavidades y órganos corporales y de los tejidos glandulares de la mama y próstata.

El cáncer no discrimina edades, puede afectar tanto fetos como personas adultas, pero el riesgo de padecer los tipos más comunes de cáncer aumenta significativamente con la edad. ^[3]

El cáncer constituye en Venezuela una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad. Una de cada cuatro personas, si alcanza la edad de 74 años, puede padecer alguna de sus variedades y una de cada siete tiene el riesgo de morir por cáncer. Para el año 2005, el cáncer ocupó la segunda posición en la mortalidad general después de las enfermedades del corazón (véase **tabla 1**). ^[4]

Tabla 1. Las cinco primeras causas de mortalidad en Venezuela ambos géneros .2005^[4]

Causa de Muerte	Mortalidad	%
Enfermedades del corazón	24353	20,71
Cáncer	18155	14,93
Enfermedades cerebro vasculares	8695	7,40
Suicidios y Homicidios	8614	7,31
Accidentes de todo tipo	8471	7,19
Otras causas	49543	42,05
Total	117831	100,00

La **Tabla 2** presenta la tasa de mortalidad en las primeras 10 localizaciones de cáncer en hombres, mujeres y ambos géneros.

Tabla 2. Las diez primeras causas de mortalidad por cáncer en Venezuela 2005.^[4]

Hombre	Mujeres	Ambos Géneros
Próstata	1766	Cuello Uterino y Ut N.E 1612
Bronquios y Pulmones	1647	Glándula Mamaria 1425
Estomago	1076	Bronquios y Pulmones 1021
Colon, Recto y Ano	578	Estómago 688
Leucemias	422	Colon, Recto y Ano 592
Hígado	356	Ovario 362
Páncreas	335	Leucemias 352
Linfomas no Hodgkin	299	Páncreas 351
Laringe	274	Hígado 349
Encéfalo y otras	208	Linfomas no Hodgkin 237
Total	9085	Total 9070

I.II. EL CÁNCER DE PROSTATA

La próstata es un órgano glandular, del tamaño de una nuez, presente en los hombres y situada alrededor del cuello vesical y parte de la uretra, por delante del recto, véase **figura 1**. Secreta un líquido, blanquecino y viscoso, que se mezcla con el espermatozoides en el momento de la eyaculación.^[1]

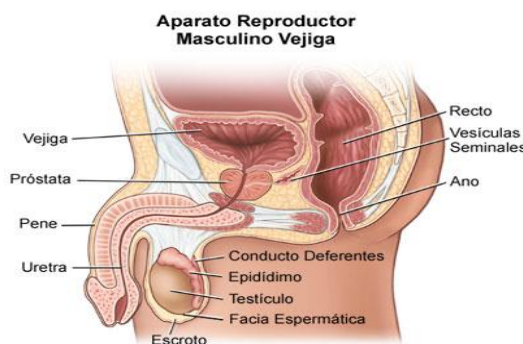


Figura 1. La próstata y sus estructuras vecinales.^[5]

La próstata se compone aproximadamente de 40 grupos de pequeñas glándulas que producen el líquido prostático, el cual es transportado a la uretra prostática ^[25], (durante el orgasmo se presentan contracciones musculares que exprimen el líquido de la próstata dentro de la uretra y luego el exterior). ^[6]

La próstata posee 3 zonas principales encapsuladas dentro de una cápsula fibrosa, véase **figura 2**.

La **zona periférica o glándula externa**, compuesta por aproximadamente un 65% de tejido glandular; la **zona central o glándula interna** compuesta por un 25% de tejido glandular y la **zona de transición**, que rodea la uretra prostática y está compuesta por un 10% del tejido glandular. El cáncer de próstata se desarrolla usualmente en la zona glandular, por lo cual es área más afectada es la zona periférica o glándula externa. ^[25]

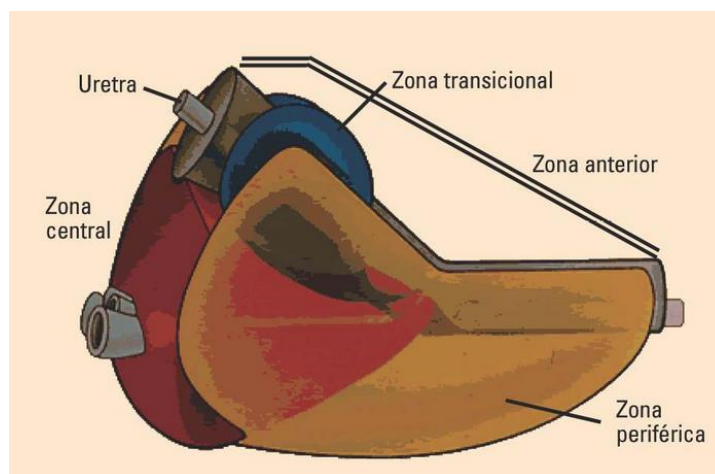


Figura 2. Zonas de la Próstata.^[7]

La próstata sufre grandes cambios con la edad, en donde las hormonas masculinas desde el desarrollo del feto estimulan la glándula prostática; al nacer la próstata está constituida por un conjunto de conductos dentro de un estroma que forma la mayor parte de este órgano. A partir de la séptima semana y hasta los nueve años, la próstata sufre cambios estructurales al final de los cuales hay hiperplasia del epitelio de los conductos y se forman evaginaciones externas de estos; paralelamente hay un lento aumento del tamaño de la próstata hasta llegar a la pubertad. Al llegar a esta etapa, la glándula alcanza el doble de su tamaño, debido

principalmente al desarrollo de los alveolos, de las evaginaciones y ramificaciones de los conductos, este cambio parece deberse a la acción de la testosterona. Mientras se produzcan las hormonas masculinas, el tamaño y función de la próstata se mantiene más o menos constante. Por lo contrario, si las hormonas masculinas van desapareciendo, la glándula prostática no puede desarrollarse y reduce su tamaño, en algunos casos hasta casi la desaparición. A partir de los 50 años aproximadamente, el órgano empieza a involucionar tomando uno de estos dos caminos: sufre una hipertrofia benigna y aumenta gradualmente de tamaño o se atrofia progresivamente. ^[5,6]

Con la muerte de las células viejas y reposición de células nuevas en el adulto el tamaño de la próstata se equilibra. Este equilibrio, es regulado normalmente por las hormonas andrógenos y en especial la testosterona. Este equilibrio se mantiene con el buen funcionamiento del sistema conocido como hipotálamo-hipófisis-testicular, donde el hipotálamo produce hormonas que actúan sobre la hipófisis para que la misma regule la producción de testosterona. Estudios recientes relacionan a la testosterona con el cáncer de próstata, ya que cuando hay un exceso de esta, se convierte en dihidrotestosterona, una hormona muy potente que puede promover el crecimiento celular con la consecuente inflamación de la próstata. Además, es conocido que cuando los niveles de testosterona disminuyen, por causa de extirpación quirúrgica de los testículos (castración) o por medicamentos, el cáncer de próstata puede mejorar lentamente. ^[5]

El cáncer de próstata se presenta a través de un tumor maligno que se desarrolla en la glándula prostática. Consiste en un crecimiento descontrolado de las células prostáticas. Esto hace, entre otras cosas, que la próstata, por su situación, presione sobre la vejiga y la uretra impidiendo la salida normal de la orina, ocasiona dificultad para eyacular, defecar, en la parte inferior de la espalda, además de producir retención urinaria, disfunción eréctil y goteo urinario, en especial inmediatamente después de terminar la micción, entre otros síntomas. Generalmente, se desarrolla en la parte posterior cerca del recto, aunque en etapa avanzada se puede localizar fuera de ella, como en los ganglios linfáticos y huesos. ^[8]

La mayoría de los tumores cancerosos prostáticos crecen muy lentamente, aunque algunos lo hacen de forma rápida, incluso pueden propagarse. ^[9]

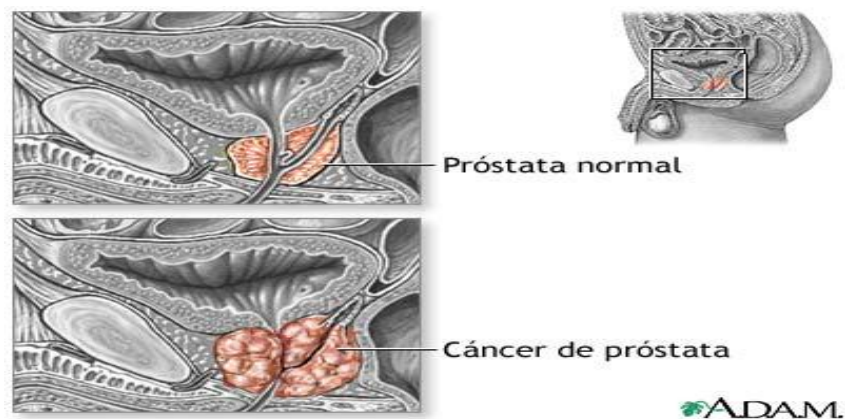


Figura 3. Comparación de una próstata sana y una con cáncer. ^[9]

La incidencia de cáncer de próstata ha aumentado en un 100% en los últimos 10 años. Algunos factores que han provocado un aumento de la incidencia de este cáncer destacan:

- Envejecimiento de la población.
- Disminución de otras enfermedades:
- Mejoras en las técnicas diagnósticas, como la biopsia transrectal ecodirigida, la resonancia magnética nuclear y la determinación de los niveles de antígeno prostático específico en la sangre.
- Programas de detección precoz.
- Mayor información en la población.
- Gran incremento de intervenciones quirúrgicas realizadas sobre enfermedades benignas de la próstata, como la hiperplasia prostática benigna y por lo tanto ha habido un aumento del diagnóstico incidental de cáncer en estado precoz. ^[1]

I.II.I. FACTORES DE RIESGO

Se han establecido ciertos factores para el desarrollo de esta enfermedad entre ellos ^[10]:

➤ **Edad**

Más del 70% de los casos de cáncer de próstata diagnosticados en hombre superan la edad de 50 años. Considerando esto la probabilidad de padecer cáncer de próstata aumenta rápidamente después de esta edad. ^[10]

➤ **Historia familiar**

Dado a que el cáncer de próstata se da más frecuentemente en unas familias que en otras se deduce que existe un factor genético. Tener alguna familiar cercano sea padre o un hermano con cáncer de próstata dobla el riesgo de padecer esta enfermedad. Los estudios genéticos han demostrado que existe un gen específico del cromosoma 1 ó gen HPC-1 que aumenta la probabilidad de contraer cáncer de próstata. ^[10]

➤ **Factores Hormonales**

Varios estudios sugieren que los factores hormonales pueden tener cierta importancia en el desarrollo del cáncer de próstata. Algunos de estos incluyen:

- La dependencia de las hormonas andrógenos (masculinas) de la mayoría de los cánceres de próstata.
- El hecho de que el cáncer prostático no aparece en los eunucos.
- El hecho de que el cáncer prostático puede ser inducido en ratas mediante la administración crónica de estrógenos y andrógenos (hormonas femeninas y masculinas.)
- La frecuente asociación de cáncer prostático con áreas de atrofia prostática esclerótica. ^[10]

➤ **Estilo de vida:**

- **Tabaco:**

Según estudios recientes, el tabaco también es un factor de riesgo para el cáncer de próstata. Fumar cigarrillos aumenta la producción de hormonas masculinas. Estas estimulan el crecimiento celular y por lo tanto, el crecimiento de los tumores prostáticos. Por otro lado, el **cadmio** contenido en los cigarrillos también es otro factor de riesgo. ^[10]

- **Dieta:**

La nutrición juega un papel importante en su desarrollo. La distribución geográfica del cáncer de próstata muestra índices muy elevados en países desarrollados o industrializados. Se están realizando estudios para determinar las sustancias que puedan reducir el riesgo de este cáncer. Por el momento, se recomienda comer menos carne, grasas, productos lácteos y comer más de cinco veces al día frutas y verduras. ^[10]

- **Inactividad física y obesidad:**

La actividad física constante y el mantener el peso saludable ayudan a reducir el riesgo. Por otro lado, la obesidad, definida como índice de masa corporal superior a 29 kg/m^2 se asocia con el doble de riesgo de padecer cáncer de próstata que en los hombres que poseen peso normal; además, en estos casos el tumor se diagnostica en estado avanzado y es más agresivo. ^[10]

- **Agentes infecciosos y actividad sexual:**

Se ha considerado que los agentes infecciosos transmitidos por vía sexual podrían provocar cáncer prostático. Sin embargo, los estudios epidemiológicos, virológicos e inmunológicos han aportado resultados contradictorios. Estos, no han aportado pruebas concretas para causa infecciosa de cáncer de prostático, como las gonococias, el virus del papiloma humano (VPH) y otro tipo de urenitis, prostatitis y enfermedades de transmisión sexual. Recientemente se ha descrito que la masturbación diaria entre los 20 y 50 años reduce el riesgo de cáncer de próstata; se cree que es debido a la eliminación de sustancias cancerígenas en el semen. ^[10]

➤ **Medio Ambiente**

○ **Nacionalidad:**

En Suecia se da el riesgo más elevado de cáncer de próstata; este presenta valores intermedios en Norteamérica y Europa, y bajos en Taiwán y Japón. Sin embargo, los japoneses que emigran a EE.UU. lo padecen con una frecuencia parecida a la de otros varones de ese país. Estudios recientes, sugieren que quienes emigran a regiones de baja incidencia a regiones de alta incidencia mantienen baja incidencia de cáncer prostático durante una generación y posteriormente adoptan una incidencia intermedia. [10]

○ **Región:**

Se han observado variaciones de incidencias de cáncer de próstata de un mismo país en la **figura 4** se observa las variaciones en las Entidades Federales en Venezuela:

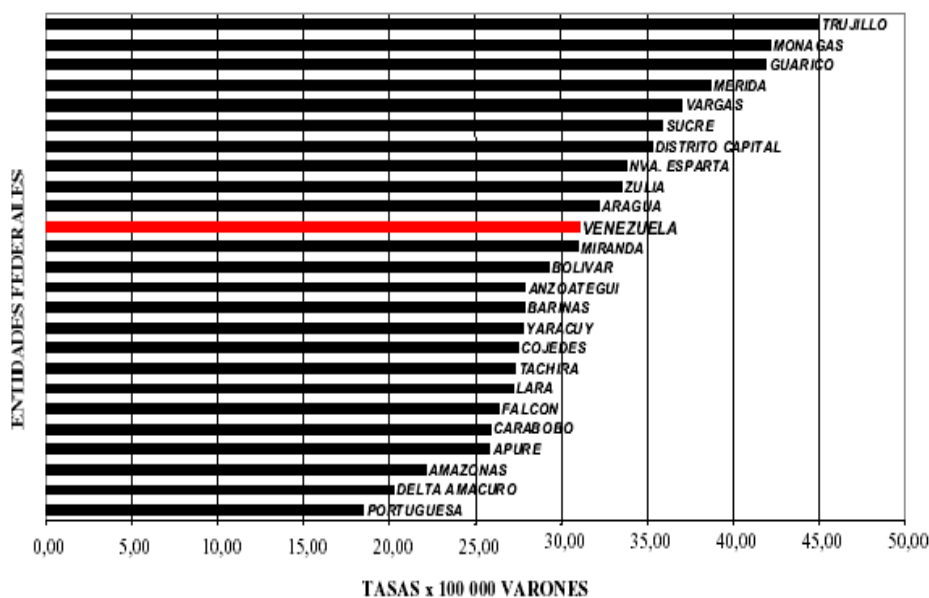


Figura 4. Situación de incidencia por cáncer de próstata para el año 2003, según las tasas por Entidades Federales en Venezuela. [4]

- **Trabajo**

Los trabajadores de las industrias del caucho y el cadmio en soldaduras y baterías, parecen tener más probabilidades de desarrollar cáncer de próstata. El cadmio es un metal pesado que interrumpe con el proceso natural del ADN celular y puede permitir la multiplicación sin control de las células malignas de los tumores. ^[10]

- **Raza**

La ocurrencia de cáncer de próstata en hombres afroamericanos es de un 70% mayor a hombres blancos americanos. Los hombres de ascendencia asiática o los habitantes de islas del Pacífico, tienen las tasas más bajas de incidencia y mortalidad. ^[10]

I.II.II. DIAGNÓSTICO DEL CANCER DE PRÓSTATA

Algunas pruebas para examinar la próstata y la sangre se emplean para detectar (encontrar) y diagnosticar el cáncer de la próstata. Las siguientes pruebas y procedimientos pueden ayudar a detectar el cáncer de la próstata ^[1,11]:

- **Examen digital rectal (EDR):** Consiste en un examen del recto mediante el cual el médico o la enfermera inserta un dedo enguantado y lubricado dentro del recto y palpa la próstata a través de la pared rectal en busca de nódulos o áreas anormales.
- **Antígeno prostático específico (APE):** Es una prueba de laboratorio que mide las concentraciones del APE en una muestra de sangre. El APE es una sustancia producida por la próstata que se puede encontrar en mayor cantidad en la sangre de varones que tienen cáncer de la próstata. La concentración de APE también puede encontrarse elevada en varones que sufren una infección o una inflamación de la próstata, o que tienen un HPB (un aumento de tamaño de la próstata de origen no canceroso).
- **Ecografía transrectal:** Es un procedimiento mediante el cual se inserta una sonda, que tiene el tamaño de un dedo, para examinar la próstata. La sonda

se utiliza para hacer rebotar las ondas de sonido contra los tejidos internos de la próstata (ecografía). Estas ondas de sonido crean ecos, los cuales son usados por una computadora para generar una imagen denominada ecograma. La ecografía transrectal también se puede usar durante una biopsia.

- **Biopsia:** Un patólogo examina la muestra en busca de células cancerosas y determina la puntuación de Gleason. Esta puntuación de Gleason va desde 2 hasta 10 y describe la posibilidad que tiene el tumor para diseminarse. Cuanto más baja la puntuación, menor la probabilidad de diseminación del tumor. Existen dos tipos de procedimientos de biopsia que se emplean para diagnosticar el cáncer de la próstata.
 - **Biopsia transrectal:** Consiste en la extracción de tejido de la próstata durante la cual se inserta una aguja fina a través del recto hasta la próstata y se extrae una muestra del tejido prostático. Este procedimiento se suele practicar con ecografía transrectal para ayudar a guiar la aguja. Un patólogo examina el tejido al microscopio en busca de células cancerosas.
 - **Biopsia transperineal:** Se extrae una muestra de tejido prostático al insertar una aguja fina a través de la piel entre el escroto y el recto hasta la próstata. Un patólogo examina el tejido al microscopio en busca de células cancerosas.

Actualmente no contamos con una estrategia robusta de prevención primaria del cáncer de próstata, debido en parte a que sus mecanismos de iniciación y progresión no se conocen aún con certeza. Sin embargo, el diagnóstico precoz y la administración de un tratamiento eficaz son las mejores prácticas de las cuales disponemos para combatir el cáncer.

A pesar de tener una enorme dependencia en el muestreo y por lo tanto un factor de azar, las biopsias siguen siendo la única manera de diagnosticar el cáncer. El análisis del antígeno prostático específico en suero ha sido ampliamente utilizado en

la última década como una herramienta de exploratoria eficaz para el cáncer de próstata. Sin embargo, la alta tasa de falsos positivos de la prueba de antígeno prostático específico en suero exige el desarrollo de biomarcadores diagnósticos y pronósticos más exactos para el cáncer de próstata. Un biomarcador que ha despertado el interés de los investigadores en el campo, es la alteración de la concentración de ciertos elementos químicos en células tumorales.

I.III.III. RELACION ENTRE ELEMENTOS QUÍMICOS Y CÁNCER

La mayoría de los cánceres están fuertemente relacionados con la dieta y la ingesta de ciertos metales que esto conlleva, de ahí la relación de algunos metales traza con el cáncer ^[12]:

- **Calcio:** El calcio existente en el cuerpo humano se ubica en un 99% en los huesos, el 1% restante se encuentra en el torrente sanguíneo, tejido adiposo y líquido extracelular. El calcio se absorbe intestinalmente por medio de la vitamina D. En el estudio realizado por Hutchinson, se obtuvo como resultado que el riesgo de contraer cáncer de próstata en una etapa avanzada es más del doble en hombres que consumen 1,200 mg de calcio al día, esto es equivalente a cuatro o más vasos de leche. Se cree que el alto consumo de calcio suprime en la sangre los niveles de una forma activa de la vitamina D, la cual es una hormona que protege el cuerpo y evita el desarrollo de células cancerígenas. El consumo de calcio no parece producir cáncer de próstata, pero al suprimir la forma activa de la vitamina D puede ocasionar el avance del cáncer de próstata de una etapa temprana a una avanzada. La cantidad de ingesta de calcio en los Estados Unidos para hombres mayores de 50 años es de 1,200 mg dado a que el consumo de calcio fortalece los huesos y puede reducir el riesgo de desarrollo de cáncer de colon.^[12]
- **Hierro:** La función más importante del Fe es la de transportar y almacenar oxígeno. En este sentido, el metal participa en el transporte de O₂ desde los pulmones hacia los tejidos, mediante hemoglobina, y en el almacenamiento

del mismo a nivel muscular, mediante la mioglobina. Numerosos estudios han encontrado una correlación positiva entre el almacenamiento de Fe y el riesgo de contraer ciertos cánceres, como el de recto, hepático, carcinoma renal, de pulmón, y gástrico. Se ha propuesto que el hierro (Fe^{+3}) presente en secciones de tejido prostático canceroso desempeña un rol catalítico en la reacción. La reacción de Fenton podría explicar esto por la producción de radicales libres, los cuales son responsables del desarrollo de cáncer.^[13]

- **Magnesio:** Estudios sustentan las teorías de muchos investigadores que indican que la carencia del magnesio es causa favorecedora del cáncer, en donde las regiones cuyos suelos y aguas son ricos en magnesio la incidencia del cáncer se da con una frecuencia mucho menor a las regiones que carecen de este elemento. Un ejemplo de eso es el país de Túnez, en donde sus regiones son ricas en este elemento y su población no presenta una incidencia de cáncer significativa (es prácticamente inexistente). La forma en que el magnesio previene el cáncer no está definida, algunos investigadores sugieren que el mismo vitaliza las células sanas, otros indican que actúa contrarrestando las altas concentraciones de potasio; que al ser altamente radioactivo genera cáncer cuando no hay presencia de magnesio en la dieta diaria. En lo que si se tiene certeza, es que cuando el cáncer está bien avanzado la ingesta de magnesio apenas puede frenar un poco el avance del mismo. El magnesio es considerado un eficaz preventivo de cáncer de próstata, mamas y de la matriz.^[14]
- **Cobre:** El cobre se encuentra distribuido en las carnes, moluscos, legumbres y chocolate. El déficit de cobre determina alteraciones en el metabolismo del colágeno, elastina e induce leucopenias. Está asociado al zinc, además de proteger contra oxidantes y radicales libres ^[15]. El zinc y el cobre compiten en la absorción, en carencia de zinc, el cobre ejerce una acción oxidante y acorta el tiempo de lipoperoxidación de las lipoproteínas de baja densidad, además la carencia de cobre está fuertemente relacionada con la ausencia de hierro.^[16]

- **Cadmio:** El cadmio parece estar implicado en la etiología del cáncer del pulmón, próstata, mama y otros. Esto, viene demostrado a través de estudios ambientales y ocupacionales que indican que el cáncer puede estar implicado con el aumento de incidencia en personas expuestas a este metal o sus compuestos ^[17]. Los efectos carcinogénicos del cadmio han sido demostrados en diferentes estudios *in vitro*. El cadmio probablemente actúa por medio de mecanismos indirectos, ya que es un elemento antagonista del zinc; es decir, puede desplazar al zinc de su lugar de unión a proteínas y/o enzimas. *In vitro* se ha demostrado que el zinc está involucrado en la conformación estructural de p53, por lo que una quelación o sustitución del mismo trae pérdida de la función de p53. Esta relación no ha sido bien determinada en cáncer de próstata ^[18,19]. Una vez absorbido el cadmio, pasa a la circulación sanguínea unido a la metalotioneína o en forma libre, donde es transportado por la albúmina, almacenándose en el hígado y riñones principalmente ^[20]. El cadmio también bloquea canales de calcio e inhibe ATPasas y otros sistemas de transporte iónico. El cadmio presenta competencia con el zinc y el cobre, por lo tanto, se produce afección de la homeóstasis de los mismos en la sangre y tejido, en donde generalmente se ven afectados diversos sistemas enzimáticos, tales como el citocromo oxidasa, superóxidodismutasa, uricasa, entre otras. ^[21]
- **Selenio:** Es un elemento en una gran variedad de selenio-proteínas, ejerciendo todas las funciones inmunes por caminos celulares específicos. Actualmente, ha establecido su correlación con la alta incidencia de varios tipos de cáncer con la baja concentración en suelos y cereales de selenio, así como la baja concentración del mismo en la sangre. Este oligoelemento, es almacenado en tejidos de densidades variables tales como: 30% en hígado, 30% en músculos, 15% en los riñones, 10% en el plasma y el 15% restante en otros órganos. El selenio es un elemento fundamental del sistema antioxidante intracelular como componente estructural del sitio activo de las enzimas Glutathione (GPx). Esta enzima-selenio es una de las que toma parte en la transformación de especies reactivas de oxígeno, catalizando la

reducción de peróxidos y lipoperóxidos ^[4]. El glutathion es usado como agente reductor, el cual juega un papel importante en la defensa antioxidante, ya que el mismo, forma parte del sistema antioxidante en todo el organismo ^[22]. Se puede decir que el selenio tiene una acción protectora ya que esta enzima asegura la destrucción del peróxido de hidrogeno (H₂O₂), el cual es tóxico y se forma en reacciones de oxidación respiratorias. Si no se realiza esta destrucción y eliminación, las células musculares, pancreáticas, hepáticas y glóbulos rojos de la sangre serán destruidos. Por esta razón, el selenio está involucrado en la fisiopatología de algunas enfermedades. ^[12,23]

- **Zinc:** El Zn posee una serie de propiedades químicas que lo hacen único y muy útil en varios sistemas biológicos, y así, participe de un gran número de procesos metabólicos. El zinc no cambia su estado electroquímico, por lo que no es útil en reacciones de óxido-reducción; sin embargo, por la misma razón, en el organismo no hay riesgo de daño por oxidación, lo que permite que el Zn sea transportado y utilizado más fácilmente ^[10]. Es el metal que se encuentra en mayor concentración en la próstata, mucho mayor que en otros tejidos y participa en las reacciones que implican síntesis o degradación de carbohidratos, lípidos, proteínas y los ácidos nucleicos ^[12]. La suplementación de zinc por encima de valores recomendados interfiere en la absorción de cobre y, por ende, produce la carencia del mismo. Se ha sugerido que el zinc inhibe el crecimiento celular en cáncer de próstata, ya que induce apoptogenesis (poda sináptica) mitocondrial, ya que está implicado con la conformación estructural del gen p53 y una quelación o sustitución del mismo in Vitro ocasiona pérdida de la función del p53 ^[18,24]. Esto indica, que la acumulación de altos niveles intracelulares de zinc por las células prostáticas induce apoptogenesis, lo cual representa un efecto fisiológico en la regulación del crecimiento celular prostático ^[24]. Los estudios realizados con el cadmio y el zinc indican que el zinc previene efectos tóxicos del cadmio. ^[18]

I.IV. RELACION DE METALES TRAZAS CON EL CANCER DE PROSTATA

La mayoría de los metales trazas tienen una gran relación con la próstata, como fue establecido en el punto **I.2.1**, donde alguno de estos elementos están relacionados directa o indirectamente con la generación o avance rápido del cáncer, como el Fe, Ca y Cd y otros elementos ayudan a disminuir la generación o el avance rápido del cáncer como el Zn, Se y Mg. Esto viene dado, por la disminución o aumento de la concentración de estos metales en el organismo y esencialmente en la próstata. Por ello la importancia del estudio de estos metales trazas en la próstata.

I.IV.I. TÉCNICAS APLICADAS PARA EL ANÁLISIS DE ELEMENTOS TRAZA.

En las últimas décadas, la cantidad de publicaciones relacionadas con el análisis de elementos químicos contenidos en órganos, tejidos y fluidos humanos ha aumentado considerablemente. Actualmente, el número de artículos publicados y monografías se estima en decenas de miles. Esto viene dado por la gran importancia que tienen estos elementos con el buen funcionamiento del cuerpo humano y la relación de los mismos con muchas de las enfermedades. Esta vasta cantidad de data adquirida en diferentes campos de investigaciones, y en la vida cotidiana, impulsa la necesidad de darle enfoque práctico y sencillo a las técnicas para la investigación de elementos químicos en el organismo.^[26]

I.IV.II. ELEMENTOS TRAZA

Se definen como elementos traza u oligoelementos a elementos inorgánicos necesarios en pequeñas cantidades (mg/L o ug/L) en el organismo. Estos se pueden

clasificar como elementos traza esenciales, posibles esenciales y no esenciales.
[27,28]

Para definirlos como esenciales deben cumplir con una de las siguientes características:

- Estar presente en los tejidos sanos de cualquier ser vivo.
- Tener una concentración constante en las diferentes especies.
- La ausencia de uno de estos elementos debe producir alteraciones funcionales o estructurales reproducibles.
- Prevenir la anormalidad con la adición del elemento
- La anormalidad producida debe asociarse a cambios bioquímicos específicos reversibles con la sustitución del elemento.^[29] Algunos de los elementos traza pueden tener una esencialidad incierta, por lo tanto, sus funciones y requerimientos se encuentran indefinidos en el cuerpo humano. Entre ellos se encuentran: **Li, Al y Sn.**^[28]

Por último, los elementos no esenciales pueden producir una patología aguda, desarrollada rápidamente tras la ingesta o el contacto con una dosis alta o crónica y por exposición baja pero prolongada de los mismos. Alguno de ellos son: **Cd, Pb, As, y Hg.**^[28] Asimismo, estudios en animales han demostrado que hay 15 elementos inorgánicos esenciales para el organismo. Estos elementos son: Hierro, zinc, cobre, cromo, selenio, yodo, cobalto, manganeso, níquel, molibdeno, flúor, estaño, sílice, vanadio y arsénico.^[29]

Los elementos traza se absorben como sustancias inorgánicas y como compuestos orgánicos. En los alimentos naturales éstos se encuentran como compuestos orgánicos. Una vez absorbidos estas sustancias circulan en el organismo como complejos unidos a proteínas, los cuales no siempre están en un equilibrio libre con los depósitos.^[29]

Su gran importancia deriva en que ellos participan o están involucrados en procesos cuyas funciones son indispensables para mantener la vida, crecimiento y reproducción, tales como, la capacidad que tienen los metales pesados de activar enzimas, intervienen en la constitución de coenzimas y hormonas, además desempeñan papeles inhibidores y activadores de tipo mineral. Dada la importancia

de los elementos trazas, se han establecido parámetros alimenticios diarios según la edad y sexo, los cuales se pueden visualizar en la siguiente tabla. ^[30]

Tabla 3. Requerimientos diarios de algunos elementos traza en adultos de 25-50 años de edad. ^[30]

Metales traza	Requerimientos de niveles diarios
Fe	*10,0 mg para hombres, 15,0 mg para mujeres.
Zn	*15,0 mg para hombres, 12,0 mg para mujeres.
Cu	*(1,5-3,0) mg, ambos sexos.
F	*4,0 mg hombres, 3,0 mg mujeres.
Mn	*(2,0-5,0) mg ambos sexos.
Cr	*(50,0-200,0) mg ambos sexos
I	*150,0 mg ambos sexos
Se	*70,0 mg hombres y 55,0 mg mujeres.
Mo	*(75,0-250,0)mg ambos sexos

Los elementos trazas poseen un rango óptimo de concentraciones en el organismo, este rango dependiendo de cada elemento puede ser corto o amplio. Si se tiene una deficiencia o exceso de estos elementos, el organismo deja de funcionar adecuadamente. ^[31]

En el análisis de elemento traza se han empleado una gran variedad de técnicas de análisis para muestras biológicas, entre ellas se encuentran: Fluorimetría, espectroscopia de absorción atómica con atomización electrónica (Electronic Atomic Absorption Spectroscopy, ET-AAS), análisis por activación neutrónica (neutrón activation analysis, NAA), espectroscopia de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado (Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometry, ICP OES), espectroscopia de masas con plasma inductivamente acoplado (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Detection, ICP-MS) y

espectroscopia de absorción atómica con llama y generación de hidruro (Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry, HG-AAS).^[32-33]

I.IV.III. DESVENTAJAS Y PROBLEMAS DE LAS TÉCNICAS APLICADAS PARA EL ANÁLISIS DE ELEMENTOS TRAZA

Estas técnicas de análisis requieren de un tratamiento de muestra que conlleva procesos de digestión o disolución o combinación de los mismos, remoción de una parte material al analizar, la digestión por ácidos o mezcla de los mismos, peróxido de hidrógeno entre otras, que normalmente son asistidos por altas temperaturas que son suministradas por microondas o de forma convencional, en algunos casos involucra fusiones con otros reactivos a altas temperaturas, para transformar finalmente la muestra en especies solubles con las cuales se puedan elaborar soluciones acuosas diluidas que son introducidas directamente en los equipos de lectura o sistemas de pre-concentración del analito. En todo este proceso de tratamiento de muestra pueden ocurrir pérdidas del analito, interferencias por contaminantes de la muestra, etc. Todo esto trae como consecuencia que los valores absolutos reportados posean errores, se tenga una cantidad de tiempo invertido muy grande y se tenga que invertir gran cantidad de dinero en el proceso.

Las muestras de tejido de próstata son ínfimas, estas vienen dadas por biopsias de tipo **transrectal** y **transperineal**. En ambos casos, las muestras de tejido se extraen con agujas muy finas que toman un trozo muy pequeño. Esto conlleva a tener ciertos problemas para el análisis de elementos traza con los métodos tradicionales, ya que como fue explicado anteriormente, en los métodos convencionales la muestra sólida debe pasar por un tratamiento ocasionando pérdidas del analito.

Debido a los problemas con el tamaño de la muestra, un método viable para el análisis de elementos traza es la técnica de **Espectroscopia de Plasma Inducido por Láser a escala microscópica**.

I.V. ESPECTROSCOPIA DE PLASMA INDUCIDO POR LÁSER A ESCALA MICROSCOPICA.

I.V.I. ABLACION LASER

La expresión ablación proviene del latín “Ablatus” que significa remover, por lo tanto, estrictamente hablando del término de ablación láser, significa remoción de material por medio de una interacción láser. Cuando un pulso de radiación o secuencia de ellos provenientes de un láser de alta energía es focalizado sobre un objetivo o muestra (en cualquier estado físico de la materia), una porción de la materia explota instantáneamente, convirtiendo la misma en un vapor, en forma de pequeñas partículas sólidas, líquidas, átomos, especies excitadas e iones del material. Esta conformación en la fase de vapor trae como consecuencia la formación y extensión de un plasma producido por las presiones y altas temperaturas existentes en el proceso, ocasionando la emisión de radiación de estos elementos o moléculas. Esto se puede ver reflejado en la figura siguiente:

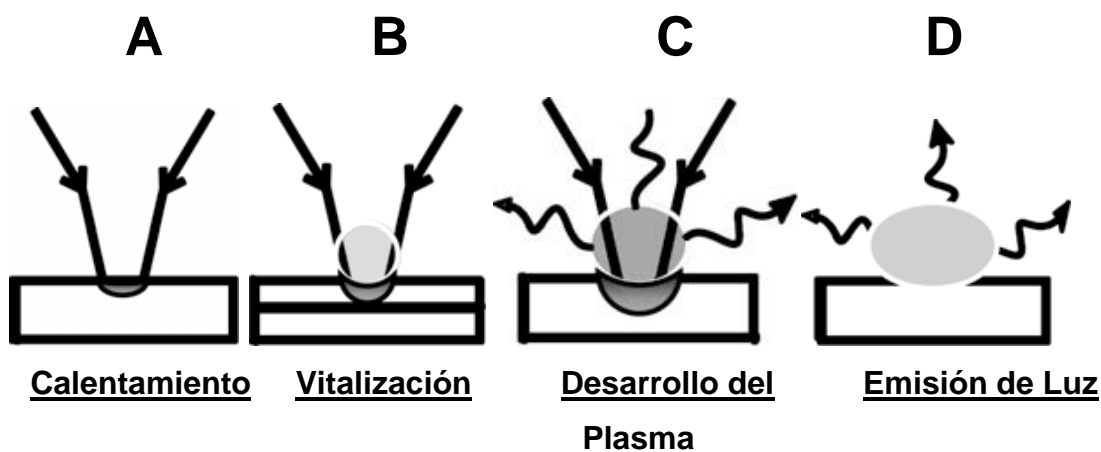


Figura 5. Representación esquemática de los procesos involucrados en la ablación láser.

El rango potencial de aplicaciones de este método es inigualable por otra u otras técnicas, debido a las abundantes ventajas bien conocidas de esta técnica que

incluye: (1) simplicidad, (2) la poca o falta de necesidad de preparación de la muestra, (3) detección simultánea de múltiples elementos, (4) la habilidad de detectar bajo y altos z-elementos, (5) buena sensibilidad en muchos elementos, (6) solo acceso óptico de la muestra es requerido, (7) capacidad para análisis de remoción, (8) cantidad más pequeña de material para ser analizado. Todo este conjunto de ventajas y facilidades permite que la ablación láser sea utilizada y aprovechada en muchas áreas de la ciencia y tecnología, los cuales abarcan: análisis de carbón; gases de combustión, patrimonios culturales, metales tóxicos en líquidos, detección de explosivos químicos y biológicos, análisis de suelos, análisis orgánicos, comidas, tejidos de animales, plantas y troncos, ciencia forense, minerales, aceites, cristales, aplicaciones industriales, campo médico, detección de lantánidos y actínidos, metales, aleación, acero, etc.

Desde el punto de vista analítico, el objetivo principal de la ablación láser es la determinación de los elementos que componen una muestra y como toda técnica esta posee ciertos límites y desventajas, entre las cuales se puede mencionar: la cantidad de material extraído depende fuertemente de la matriz a estudiar. Existe un fraccionamiento (cantidad de masa removida dependiente de las propiedades térmicas de los constituyentes) en la muestra, esto tiene como consecuencia que el plasma generado no sea estequiométricamente igual a la muestra.^[34-35]

I.V.II. ESPECTROSCOPIA DE PLASMA INDUCIDO POR LÁSER (LIBS)

El principio fundamental de la espectroscopia de plasma inducido por láser, se basa en los mismos principios de la ablación láser. La base de esta técnica, es la detección de la emisión atómica de especies excitadas, las cuales se encuentran en el plasma generado por la ablación del láser sobre la muestra. Esta emisión genera un espectro de líneas (característico de cada elemento) que nos permite realizar un análisis cualitativo.

Por otro lado, la altura y el área de la línea de emisión reflejan la intensidad de la misma y esta se relaciona con la densidad numérica de las especies en el plasma,

que a su vez está relacionada con la concentración de elemento específico en el material abaleado. [36,37]

La ecuación de Godlard y Loge (1.1), describe claramente la intensidad integrada de una línea de emisión para un especie sola presente en el plasma, que se encuentra en equilibrio termodinámico local. Esta nos señala que la intensidad de la línea de emisión depende de algunos parámetros espectroscópicos, como la temperatura electrónica del plasma T_e .

$$I_w^{ik} = N \frac{h\omega}{8\pi^2} \frac{g_i A_{ik} e^{-\left(\frac{E_i}{k_B T_e}\right)}}{Z(T_e)} \quad (1.1)$$

El término I_w^{ik} es la intensidad de la línea de emisión a una frecuencia ω que corresponde a una transición de un estado superior i a uno inferior k ; N es la densidad numérica de la especie en el punto de observación; h es la constante de Planck; g es el peso estadístico del estado i ; A_{ik} es la probabilidad de transición para una emisión espontánea del nivel i al nivel k ; E_i es la energía del estado cuántico i con respecto al nivel fundamental; k_B es la constante de Boltzmann.

Esta aproximación nos permite obtener información cuantitativa de la muestra a partir del espectro de absorción obtenido por el LIBS y la temperatura electrónica del plasma. [34]

La información cuantitativa obtenida depende de las características de la muestra, es por ello, que debemos emplear sistemas de calibración, que conlleva al uso de muestras de referencia con las cuales se puedan realizar curvas de calibración para el analito de interés en los rangos de concentración adecuados.

El método de LIBS posee grandes ventajas, estas abarcan las de ablación láser al basarse en el mismo fundamento y otras más que son propias del mismo, entre ellas tenemos:

1. La no preparación de la muestra o en el peor de los casos muy poca en comparación de los métodos estándares. Esto garantiza que no haya pérdida del analito y que la muestra se contamine.
2. El método analítico es independiente del estado físico de la materia. Esta técnica permite el análisis in situ de la muestra, al incorporar fibras ópticas que recoge y transporta la radiación de excitación emitida por la muestra, tanto en ambientes hostiles como en atmosferas controladas.
3. El uso de láser de alta potencia permite analizar las muestras en tiempo real, ya que cada pulso del mismo ofrece información de la muestra.
4. La técnica de LIBS se puede decir que es no destructiva de la muestra, ya que apenas son microgramos de muestra los que son ableados.
5. Permite evitar los problemas de traslado de material extraído a otra fuente de excitación, ya que la señal adquirida se obtiene en el mismo lugar y al instante en el cual se realiza la ablación.
6. Permite realizar mapas espectroscópicos de la muestra con solo re-direccionar el láser o cambiar la muestra de posición.

Como toda técnica, la de LIBS ofrece tanto ventajas como desventajas y limitaciones. Esta presenta grandes problemas a la hora de analizar elementos específicos, ya que la intensidad de emisión depende en gran medida de los efectos de matriz, fraccionamiento y el particulado que se genera en el plasma y sobre la muestra deteriorando las condiciones del análisis. Por otro lado, cuando se genera el plasma no todas las especies en él están excitadas, esto provoca que se puedan dar fenómenos de auto absorción y de variación de la densidad óptica del plasma a distintas condiciones, alterando la señal constantemente y evitando así que sea reproducible el análisis. ^[37]

Otro gran problema, es que el plasma generado puede comportarse como un radiador de cuerpo negro que emite en un amplio rango de longitudes de onda en un continuo. Esto se debe a que, en condiciones estándares atmosféricas (1 atmosfera de presión), el plasma se encuentra muy confinado ocasionando que su temperatura interna pueda alcanzar las decenas de kelvin. Todo esto genera interferencias por emisión de fondo.

Para estos problemas, se pueden implementar pulsos ultracortos (pico y femto segundos), estos pulsos mejoran considerablemente la respuesta de la señal, ya que sobre la muestra se da un efecto netamente ablativo, provocando una remoción del material mucho más uniforme. Dado a que el funcionamiento de este tipo láser es muy complejo y su mantenimiento es de un alto costo, no ha permitido su expansión e implementación habitual. ^[34]

Con el fin de mejorar las figuras de mérito analítico, se ha estudiado varias propiedades entre ellas ^[34]:

- Longitud de onda del haz de excitación: A medida que la energía por fotón sea mayor (menores longitudes de onda), la remoción del material se da con una mayor eficiencia y se disminuyen los efectos térmicos sobre la muestra permitiendo que se tenga una mejor reproducibilidad, pero con un impacto general menor que la duración del pulso.
- Presión del ambiente: Al incrementar la presión del ambiente se incrementa la fluorescencia y emisión de todas las especies excitadas, dado a que se aumenta o se generan colisiones en el frente de expansión y como consecuencia intercalaciones en la pluma. Otra consecuencia, es el aguzamiento de las fronteras de la pluma, formándose así, un frente de choque. Por último, este incremento disminuye la velocidad de propagación de la pluma relativa a la propagación en vacío, provocando el confinamiento espacial de la pluma.
- Presión interna de la cámara de ablación: Esta presión modifica la cinética de expansión del plasma. Presencia de varias presiones internas sobre la muestra, emisiones radiativas y serie de ondas o frentes de onda existen y

son debidos a la ionización de esta atmosfera y a la propagación de calor por parte del ambiente.

El estudio de estas variables y propiedades permite concluir que al trabajar en presiones internas más bajas o en sistemas de vacío, permite que las fluctuaciones dadas por la auto-absorción de la radiación y la emisión de cuerpo negro del plasma se vean disminuidas, mejorando en gran medida la reproducibilidad de la señal. Los efectos de fraccionamiento y particulado no son afectados por esto, además de una disminución de la intensidad total de las líneas de emisión. Esto conlleva a que, cuando se hace incidir sobre un líquido o sobre un sólido sumergido en un líquido, la explosión de materiales se ve impedida por la frontera líquido plasma, provocando que las líneas de emisión atómicas tengan tiempo de vida más corto en comparación a si se formaran en el aire.

Una de las ventajas no mencionadas del LIBS es que la misma se puede acoplar a otras técnicas de análisis. Esto permite solucionar problemas con las figuras de mérito analíticas, tamaños de muestra, entre otros. Una línea de trabajo muy seguida es el empleo de microscopia para generar cráteres que se encuentren más cerca de los límites de difracción de la luz empleada, con puntos focales definidos por parámetros ópticos. Lo cual permite estudiar cráteres de ablación cercanos a los límites de resolución axial del sistema de enfoque. Así mismo, el acoplado de un microscopio a la técnica de LIBS también puede permitir el análisis de muestras muy pequeñas. Un arreglo que permite trabajar en el plano focal de la lente y no en un plano de imagen como regularmente se trabaja, es el arreglo con microscopio confocal. ^[38]

|

II OBJETIVOS

II.I. OBJETIVO GENERAL:

Estudiar el uso de mapas de concentración de elementos traza en muestras de tejido prostático (biopsias), como herramienta de despistaje de cáncer de próstata.

II.II. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Establecer si LIBS puede ser utilizado para medir variaciones en el contenido de metales entre tejidos sanos y tejidos tumorales.
- Encontrar y ajustar las condiciones óptimas para el análisis de muestras de tejido humano (biopsias y cortes de próstatas) mediante la técnica de LIBS.
- Determinar el tratamiento de muestra indicado para realizar la medición.
- Identificar los posibles metales traza en los espectros obtenidos.
- Establecer relaciones entre las señales de los metales traza obtenidas.
- Determinar si hay diferencias entre las relaciones de los metales traza obtenidas en tejido sano y tejido con cáncer.

III. REVISION BIBLIOGRAFICA (ANTECEDENTES)

- **Akshaya** y col, 2004^[13]. Realizaron estudios sobre sangre de pollos y bisecciones de hígado de perros. Una mitad se introdujo en Buffer de Formaldehido Salino para luego de 48h incrustarse en cera de parafina. La otra mitad se colocó en una gota de un medio especial (BDH) en un trozo cuadrado de papel de filtro Whatma, para posteriormente ser congelado con vapor de nitrógeno líquido previo a ser sumergido en el mismo. Entre los resultados obtenidos encontraron que las intensidades de las líneas de Ca fueron mucho mayores en los tejidos con células con cáncer y las líneas de Fe fueron menos intensas en los tejidos con células con cáncer.
- **Galván** y col, 2005^[39]. Realizaron un estudio de Cd, Zn y antígeno prostático sobre tejido prostático obtenido por resección transuretral (extirpación del tejido) mediante la técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica. Estos estudios se le realizaron a 2 grupos, el grupo 1 de 10 muestras de tejido de cáncer de próstata y el segundo grupo de 50 muestras con HPB. Obteniendo como resultados que la concentración media de Zn fue mayor en las muestras con HPB que en las muestras con cáncer de próstata, lo cual fue estadísticamente significativo. La concentración media de Cd fue mayor en las muestras con cáncer de próstata que en las HPB, pero los resultados obtenidos no fueron estadísticamente significativos por la alta dispersión de las concentraciones. Por último, encontraron una correlación baja entre las concentraciones de Cd y Zn en ambos tejidos.
- **Cortesi** y col, 2006^[40]. Analizaron concentraciones de Zn en próstata, utilizando un método vivo en 310 individuos. Indicaron en sus resultados que la disminución de significativa de Zn se puede considerar un indicador de cáncer de próstata.
- **Murillo**, 2009^[41]. Realizó estudios de elementos traza en suero sanguíneo y próstata, mediante las técnicas de espectrometría de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado y espectrometría de masa con plasma inductivamente acoplado. Las muestras de próstata fueron tomadas de

pacientes con cáncer prostático e hiperplasia benigna a los cuales se les extrajo la próstata. En total, se analizaron 97 muestras en donde 15 de ellas eran sanas, 61 con hiperplasia benigna y 21 con cáncer de próstata. Los metales traza analizados fueron el Cobre (Cu), Zinc (Zn) y Selenio (Se). Los resultados obtenidos arrojaron las siguientes conclusiones: Se encontraron diferencias significativas entre el Cu, Zn y Se con respecto a las muestras con cáncer, se encontró que el Cu aumenta en pacientes con cáncer y tanto el Zn como el Se en pacientes sanos, también se encontró que la relación Cu/Zn disminuye en pacientes sanos y las relaciones Se/Zn y Se/Cu disminuye en pacientes con cáncer.

- **Hussein** y col, 2010^[42]. Realizaron un estudio in vitro detallado del uso de espectroscopia de plasma inducido por láser (LIBS) como método de análisis espectro-químico sencillo de tumores en humanos. Estos estudios fueron realizados en muestras de tejidos de 41 pacientes con cáncer de mama y 32 pacientes con cáncer colorrectal (cáncer de colon), también se analizaron tejidos no neoplásicos recolectados de mastectomías o colostomías. Se analizaron las líneas de emisión de Ca y Mg. Entre los resultados que obtuvieron la intensidad de las líneas de magnesio y calcio en los espectros fueron significativamente mayor en los tejidos con cáncer que en los tejidos no neoplásicos. Como conclusión determinaron que la técnica de espectroscopia de plasma inducido por láser (LIBS), es una técnica que provee una posibilidad fascinante de detectar ambos elementos en tejidos de órganos humanos, haciendo un seguimiento de las enfermedades del cáncer.

IV. RECOLECCIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS

IV.I. MUESTRAS Y SU RECOLECCIÓN

Se trabajó con dos tipos de muestra: Biopsias y Cortes de Tejido Prostático.

- Biopsias de Próstata.

Las biopsias de próstata fueron tomadas a 16 pacientes con edades comprendidas entre 50-75 años de edad, durante un periodo de 3 meses en el Hospital Clínico Universitario. Dichos pacientes fueron sometidos a un proceso de descarte de Cáncer de Próstata. Se extrajeron 13 muestras a cada individuo mediante biopsias Transrectales. La primera muestra extraída a cada paciente fue destinada a este proyecto, para evitar contaminación o interferencia de la formalina, líquido donde se sumerge la aguja para depositar la biopsia extraída para su conservación y traslado. Las muestras se introdujeron en un tubo plástico tapado y fueron colocadas inmediatamente en un refrigerador que las mantuvo a una temperatura de -20°C .

Estas muestras se enumeraron según el orden de extracción y poseían una longitud entre 0,5 y 1,5cm y una anchura de 0,5 a 1mm aproximadamente como se muestra en la siguiente figura:

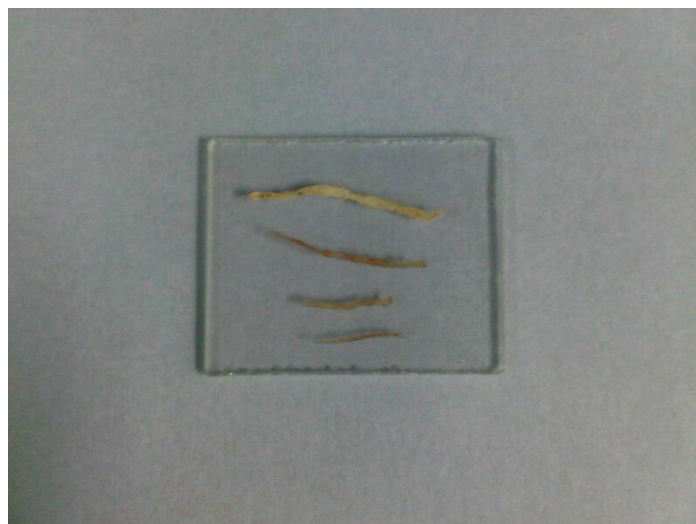


Figura 6. Biopsias extraídas de Próstata.

- Cortes de Tejido Prostático (Próstata extraída).

Se le extrajo la Próstata a un paciente diagnosticado con Cáncer. A esta muestra se le realizaron varios cortes laterales con un Microtomo para posteriormente ubicar en las mismas las células cancerosas. Uno de esos cortes con las células cancerosas identificadas fue proporcionado para el propósito de esta investigación.



Figura 7. Corte de Próstata extraída suspendida en parafina.

Al corte suministrado se le identificaron 2 zonas, una en la que se encontraba una concentración de células con cáncer muy alta y la otra con células con cáncer esparcidas con una baja densidad de las mismas. Este corte con su identificación fue suministrado por un patólogo del Hospital Clínico universitario en donde se demarca con color rojo la zona con mayor concentración de células con cáncer.



Figura 8. Corte de Próstata extraída con zona con mayor índice de células con cáncer señalada.

V.DISEÑO EXPERIMENTAL

V.I. Materiales y Equipos Utilizados.

Diseño del montaje y porta muestra utilizado:

- 1 Láser de alta energía modelo Surelite II de 1024nm. Tasa de repetición de 10 Hz.
- 5 Espejos de alta energía para 1024nm.
- 1 Lente objetivo de 10X.
- 1 Video Cámara
- 1 PC.
- 1 Espectrofotómetro Andor iStar de red Echelle con cámara CCD intensificada.
- 1 Fibra óptica de 50µm de abertura.
- 5 Soportes metálicos para los espejos.
- 1 Soporte metálico para la fibra óptica.
- 1 Buffer digital con inversor de señal.
- 1 Inversor de señal digital.
- 1 Osciloscopio TEKTRONIX modelo TDS 3034B.
- 2 Foto diodos de alta energía.
- Base de traslación mediante tornillos micrométricos.
- Porta muestra clásico para Microscopio.
- Porta muestra en forma de anillo.
- 4 Imanes.

V.II. MONTAJE Y DISEÑO EXPERIMENTAL

El montaje experimental que se utilizó fue basado en el utilizado por el Dr. Vincent Piscitelli en su trabajo doctoral. ^[34]

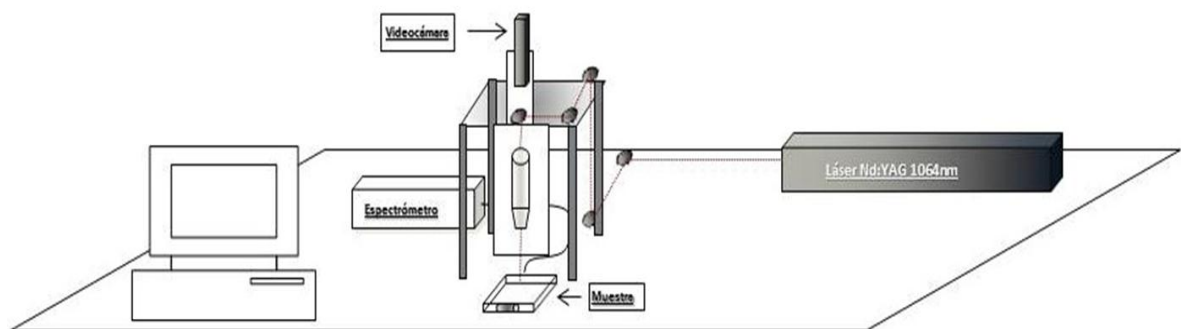


Figura 9. Diagrama del Montaje Experimental.

Este fue realizado en varias fases:

1. Montaje del sistema óptico:

La radiación de 1024 nm (fundamental) proveniente del láser es dirigida a través de la mesa mediante el arreglo de espejos adecuados para el uso de radiación de alta energía soportados sobre bases móviles metálicas, hasta hacerla llegar a un arreglo de lentes que actúa como un microscopio óptico, provisto de un lente objetivo de 10X con el cual se enfoca el haz de radiación y con una videocámara que permite tener una imagen a tiempo real de las muestras y el impacto de la ablación. La muestra es colocada sobre una base de traslación dotada de tornillos micrométricos que permiten el movimiento de la misma en el plano xy.

La luz producida por el plasma generado por la ablación es recogida por una fibra óptica la cual se encuentra en un soporte acoplado al microscopio, permitiendo el movimiento vertical simultáneo cuando se enfoque sobre la muestra y no se pierda la alineación con el plasma generado. Este soporte permite cambiar el ángulo de la fibra con respecto al plasma para garantizar la recolección de la mayor cantidad de radiación posible. Esta radiación es transportada hasta un espectrofotómetro de red echelle y con cámara CCD intensificada (Andor iStar) en donde la radiación es filtrada y detectada para posteriormente ser procesada en un PC.

2. Alineación del Sistema Óptico:

Los espejos fueron pre-alineados con un láser He-Ne y posteriormente alineados con el Láser de alta energía Nd:YAG .

3. Sincronización del Láser con el Espectrofotómetro.

La señal de disparo del láser (trigger) resultó ser de polaridad contraria a la de la señal esperada por el sistema de apertura externa de la compuerta de la cámara del espectrofotómetro, generándose una diferencia de fase entre ambos eventos y una pérdida de señal como consecuencia de este desfase. Debido a esto, se procedió a utilizar una señal de salida generada por el espectrofotómetro para iniciar de manera externa el disparo del láser. Para la sincronización de la señal proveniente del espectrofotómetro y el disparo del pulso del láser, se utilizó un osciloscopio que permitía monitorear, mediante dos fotodiodos, el tiempo de impacto y el de generación del plasma. Este montaje presentó inconvenientes ya que generaba tiempos de respuesta variables.

Finalmente se utilizó un Buffer digital con inversión de señal el cual permitió utilizar la señal de disparo del Láser para sincronizar la apertura de la compuerta de la cámara del espectrofotómetro.

Con este arreglo se procedió a optimizar los parámetros de funcionamiento del equipo, estableciendo como respuesta la relación señal/ruido. Las mejores condiciones obtenidas fueron las siguientes:

- Retraso de la apertura de la ventana: 500ns.
- Tiempo de apertura de la compuerta: 8 μ s.
- Ganancia: 255.
- Tiempo de exposición de la cámara: 0,02seg.
- Temperatura del detector: -18°C.
- Frecuencia 10Hz

Bajo estas condiciones se generaron cráteres sobre láminas de silicio, de alrededor de 65 μ m de diámetro, los cuales fueron medidos utilizando un interferómetro de luz blanca. En la figura 10 se muestra imágenes obtenidas con el interferómetro.

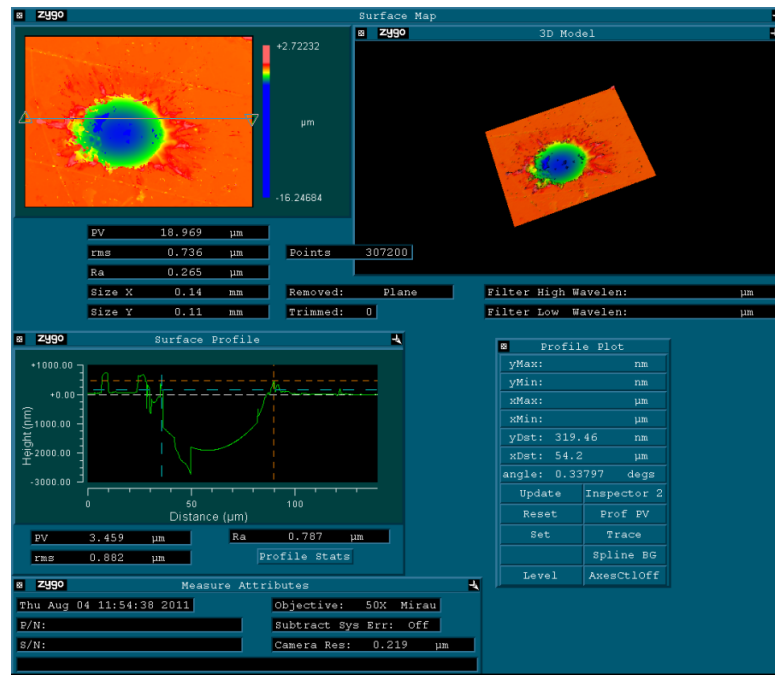


Figura 10: Diámetro del cráter medido en un interferómetro de luz blanca.

VI.METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

VI.I. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.

Las muestras se dejaron descongelar a temperatura ambiente por 5min en su tubo contenedor. Fueron extraídas del recipiente con sumo cuidado y colocadas sobre porta muestras utilizando en el procedimiento pinzas y guantes estériles.

El manejo de la muestra exigió extremo cuidado y muy buena iluminación debido a su fragilidad y tamaño.

VI.II. PUESTA A PUNTO DE LAS CONDICIONES DE FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA.

La muestra fue colocada a la distancia focal del arreglo de lentes. El ángulo y la altura de la fibra óptica con respecto al plasma, se ajustó en cada medida, debido a lo crítico y sensible del sistema a esta condición.

Montaje de las muestras de biopsias.

Se probaron tres esquemas para el montaje de las biopsias.

En el primero, se fijó la muestra sobre el portamuestra colocando adhesivo sobre cada extremo para evitar que se desplazara con cada pulso del láser. Un trozo pequeño de papel fue ubicado entre la muestra y el portamuestra para evitar el contacto directo. Este arreglo permitió, de manera muy sencilla, fijar la primera a presión, sin que sufriera daño. Los valores de trabajo del interruptor Q del Láser (apéndice) y del voltaje de la lámpara fueron condicionados por la naturaleza de la muestra. Las biopsias son delgadas y frágiles, por lo que podían ser atravesadas por la radiación si la energía era lo suficientemente alta. Se encontró que a valores del interruptor de Q menores de 96 (22,3 mJ de energía) la señal era demasiado baja, no se obtenían líneas lo suficientemente intensas como para diferenciarlas del ruido. A valores de interruptor Q mayores se obtenía interferencia del porta muestra indicando que la muestra había sido atravesada.

En el segundo esquema se procedió a utilizar un porta muestra en forma de anillo. Los bordes de la biopsia se fijaron nuevamente utilizando adhesivo y manteniendo el resto de la muestra suspendida en el aire como se muestra en la figura 11.



Figura 11: Porta muestra en forma de anillo con muestra suspendida.

Este esquema permitió utilizar un valor de interruptor Q mayor, remover más material y generar señales más intensas. El valor de interruptor Q óptimo encontrado estaba entre 101 y 103 lo que equivale a un rango de energía de 33 a 52mJ dependiendo del grosor de la muestra. Figura 12.



Figura 12: Biopsia atravesada por los pulsos con Q-Switch 103 (52mJ).

Sin embargo, debido a que las biopsias en algunas ocasiones sufrieron rupturas al momento de su extracción, sus tamaños variaron y algunas muestras de biopsias eran muy pequeñas para el anillo, por esto, se tuvo que considerar un nuevo esquema.

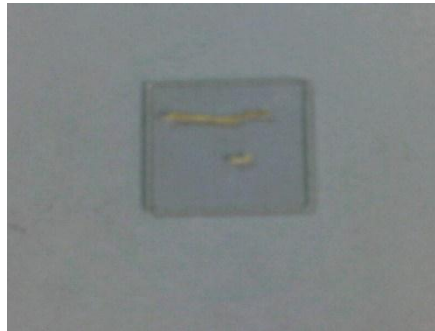


Figura 13: Biopsias con diferentes longitudes.

Tercer Esquema. Aprovechando lo aprendido en el esquema anterior se ideó un porta muestra con el uso de imanes recubiertos con papel, con fuerza suficiente para aguantar la muestra sin afectarla físicamente, figura 14.



Figura 14: Biopsia en porta muestra con Imanes.

Este montaje permitió que las muestras fueron ableadas a lo largo de toda su longitud pudiéndose hacer barridos completos de las mismas.

OPTIMIZACIÓN DE LA SEÑAL

Número de ablaciones por punto muestreado.

El número de ablaciones por punto de muestreo es igual al número de acumulaciones de intensidades que conforman la señal de emisión final. Cuanto mayor sea el número de acumulaciones más intensa la señal de emisión y menor el valor del ruido. El número máximo de ablaciones por punto muestreado, que permitía obtener una señal medible y que no destruía la muestra a posteriores pulsos, se pudo establecer entre 3 y 5 ablaciones, dependiendo del grosor y consistencia de la muestra. En la figura 15 se muestra el espectro LIBS obtenido de la primera biopsia extraída, utilizando radiación a 1024 nm de longitud de onda, con interrupción Q de 102 (47,7mJ) y un acumulado de 3 pulsos.

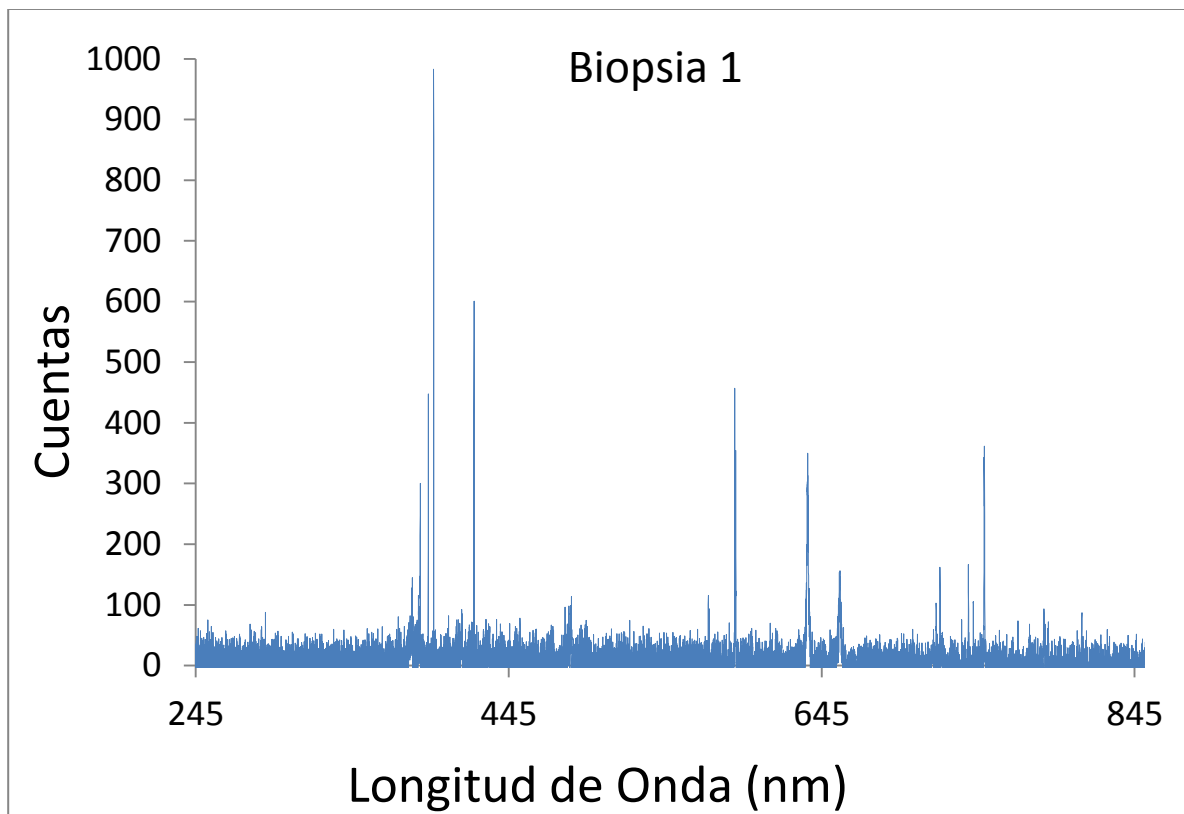


Figura 15: Espectro con interruptor Q de 102 (47,7mJ) y un acumulado de 3 pulsos muestra suspendida.

USO DE GAS INERTE.-

En un intento de mejorar la relación señal/ruido del espectro se hizo pasar una corriente de gas argón sobre el punto de impacto. Los resultados no arrojaron mejoras significativas en la relación señal/ruido, por lo que el uso del gas inerte fue rechazado.

ESPECTRO LIBS DEL AMBIENTE.

El espectro LIBS del ambiente fue registrado, ya que su posible contribución a la señal generada por la muestra no podía ser rechazada a priori. En la figura 16 se puede observar el espectro de emisión proveniente del plasma obtenido al enfocar el láser en un punto en el aire. El espectro final es el producto de la acumulación de varios pulsos.

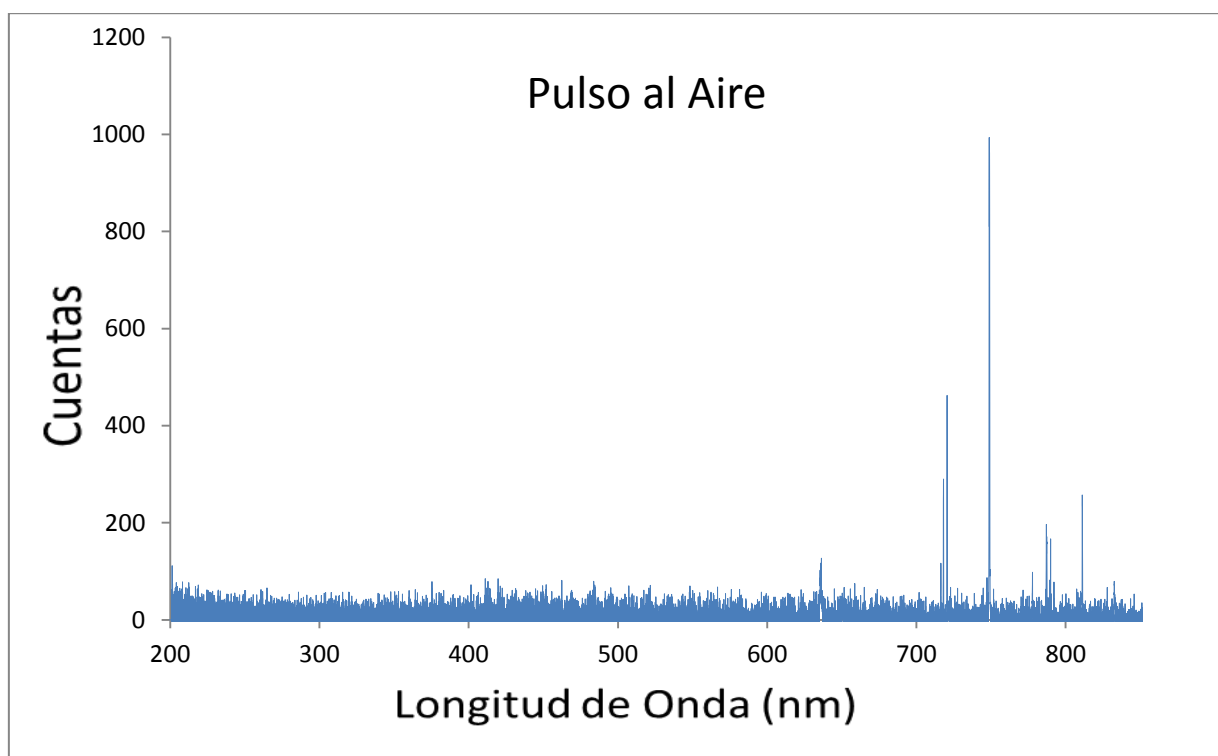


Figura 16: Espectro con pulso al aire

Las señales identificadas en el espectro del ambiente se muestran en la tabla 4. Estas líneas fueron descartadas durante el análisis de los espectros de biopsias

Tabla 4. Longitudes de Onda obtenidas en el espectro de pulso al aire.

Líneas	Longitud de Onda (nm)
1	635,77724
2	635,93203
3	716,38622
4	718,16841
5	720,56579
6	748,79999
7	777,79293
8	787,08743
9	789,93876
10	811,14387

VI.III. LINEAS OBTENIDAS EN LOS ESPECTROS Y SU IDENTIFICACION

En la Tabla 5 se observan las líneas a identificar para el análisis de los espectros.

Tabla 5. Longitudes de Onda del espectro de Biopsia a identificar.

Líneas	Longitud de Ondas (nm)
1	280,35869
2	393,59037
3	397,00132
4	422,82720
5	572,53991
6	572,60069
7	589,42514
8	590,00003

ESTÁNDARES PARA EL ANÁLISIS MULTIELEMENTAL CUALITATIVO

Con el objeto de facilitar la identificación de líneas de emisión provenientes de los elementos de interés presentes en el plasma (LIBS), se prepararon estándares en forma de comprimidos a partir de sales de los elementos de interés y que se encuentran en mayor concentración Na, Ca, Mg, Sr, Fe, Cu, Cd y Zn. En la Tabla 6 se presenta los estándares y distintas composiciones.

Tabla 6. Composición de Estándares utilizados.

Sales	Composición % p/p
CaCO ₃	99,5
MgSO ₄	99,5
Na ₃ PO ₄	94,0
SrCO ₃	99,5
Fe ₂ O ₃	99,0
CuCO ₃	99,5
ZnSO ₄	99,0
CdSO ₄	98,5

Los Espectros de los estándares con las líneas presentes en las Biopsias y Corte de Próstata se muestran en las figuras 17-21.

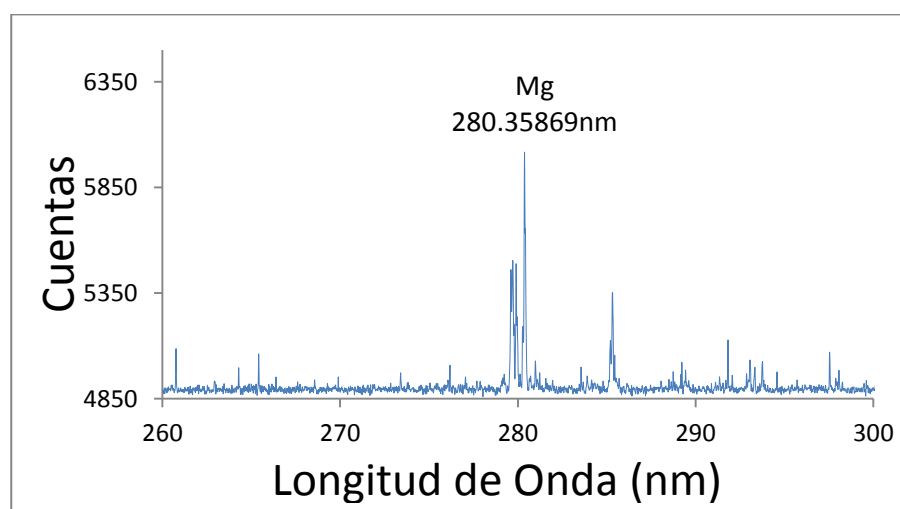


Figura 17: Espectro pastilla de MgSO₄.

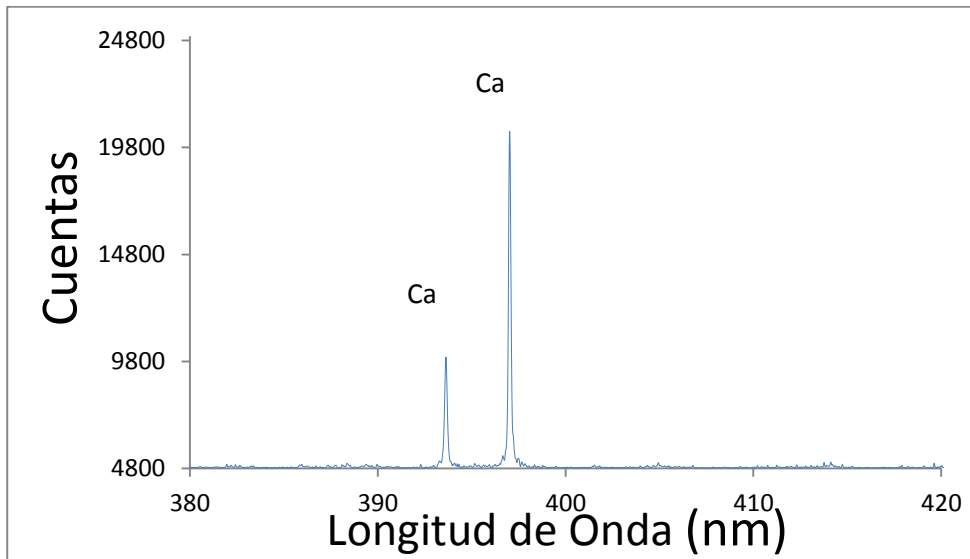


Figura 18: Espectro pastilla de CaCO₃.

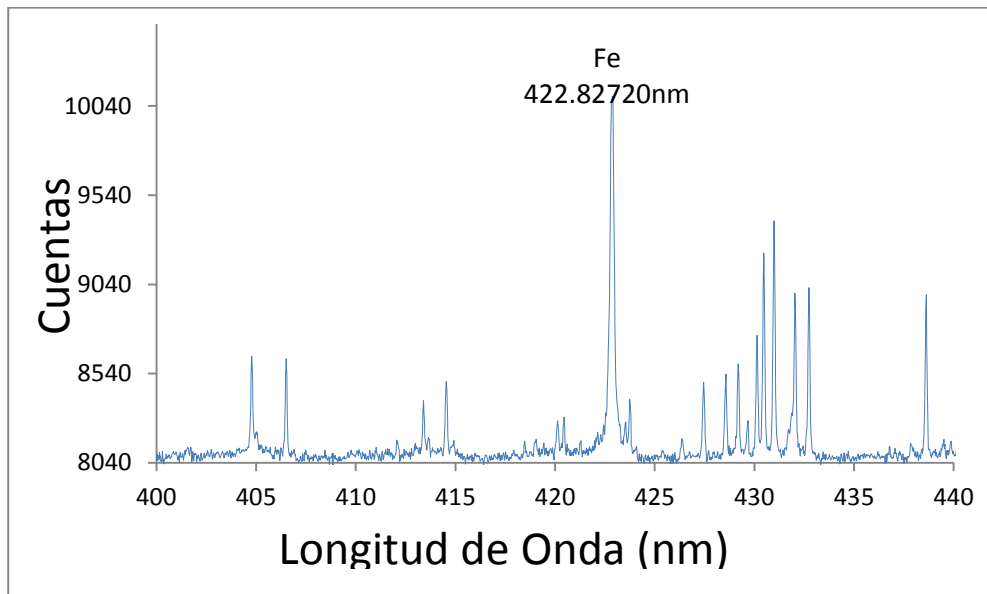


Figura 19: Espectro pastilla de Fe₂O₃.

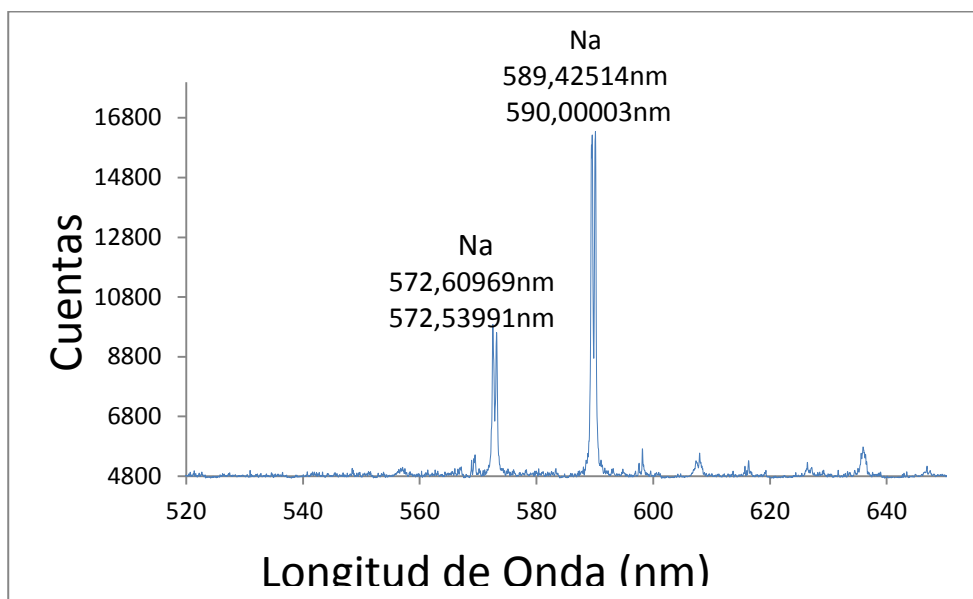


Figura 20: Espectro pastilla de Na₃PO₄.

Como se observa en los espectros se lograron identificar las siguientes líneas

Tabla 7. Longitudes de Onda de los elementos metálicos encontrados.

Elementos	Longitudes de Onda (nm)
Magnesio	280,35869
Hierro	422,82720
Calcio	393,59037
	397,00132
Sodio	572,60969
	572,53991
	589,42514
	590,00003

Una vez identificadas estas líneas, se procedió a analizar 10 Biopsias, un espectro por cada Biopsia con 3 acumulaciones de pulsos y la muestra de corte de próstata extraída diferenciando la zona identificada con mayor índice de células con cáncer y una con mayor extensión con mayor índice de células sanas, para ambas zonas se tomaron 20 espectros con una acumulación de 5 pulsos.

Las figuras 21 y 22 muestran en donde se realizaron los 5 pulsos para dar lugar a cada espectro de cada zona de la Exéresis de Próstata. Los 5 pulsos se hicieron de izquierda a derecha y de arriba para abajo la conformación de cada espectro.

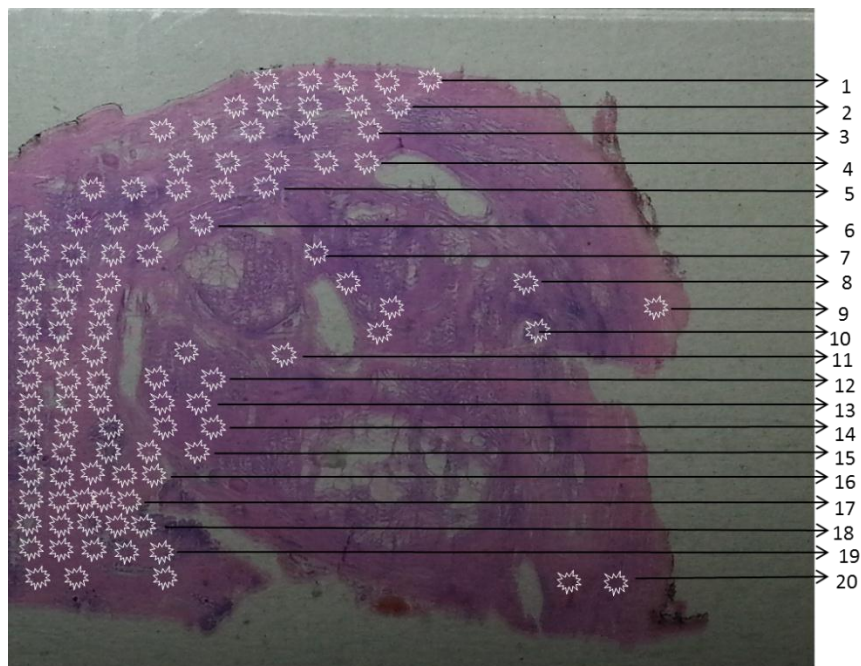


Figura 21: Pulsos Exéresis de Prostata con Mayor Densidad de Células Sanas.

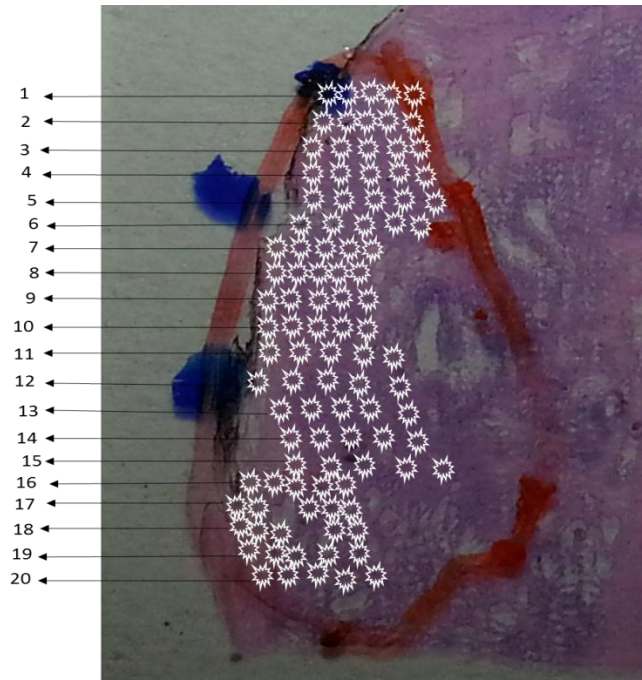


Figura 22: Pulsos Exéresis de Prostata con Mayor Densidad de Células con Cáncer.

VII. RESULTADOS Y DISCUSION

VII. ANALISIS DE LAS LINEAS DE LOS ELEMENTOS PRESENTES EN LA MUESTRA DE EXERSIS DE PROSTATA (BLOQUE DE PARAFINA).

Primero se realizaron los espectros de la zona con mayor índice de células sanas y a continuación se muestra en la figura 23. La ubicación aproximada de los 5 pulsos para dar resultado a cada espectro de esta zona.

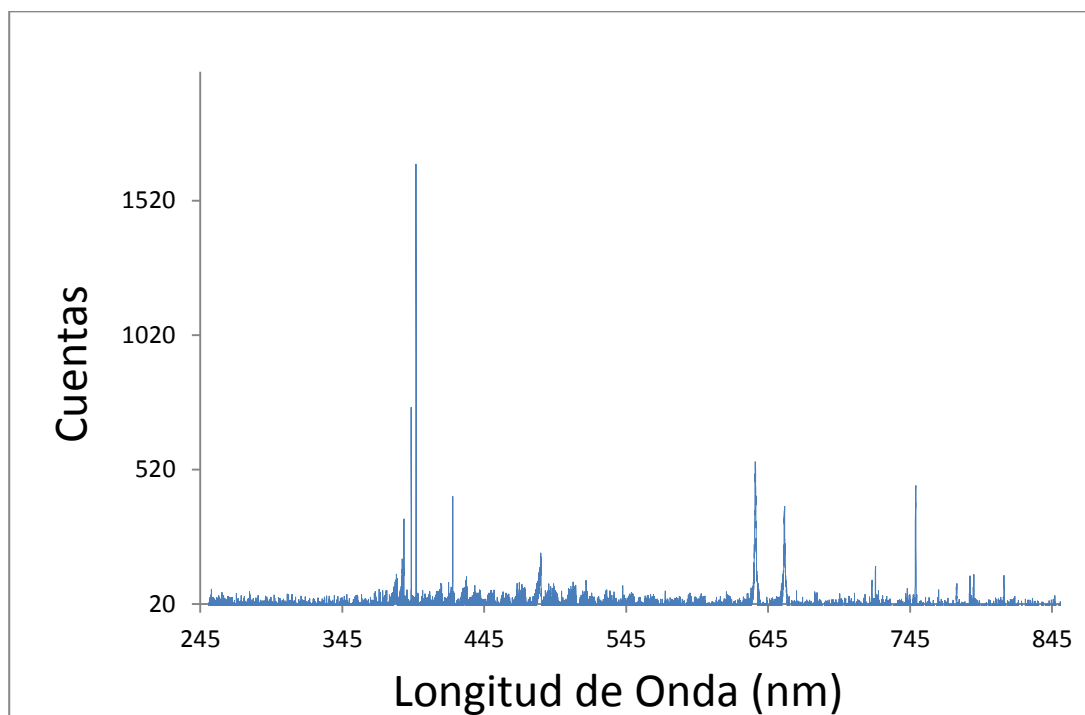


Figura 23: Espectro 14 Exéresis de Prostata con Mayor Densidad de Células Sanas.

Como se observa en este espectro, y se va a observar en la mayoría de los espectros de esta zona, no se observan líneas de Na y Mg. En la Tabla 8 y 9, se muestran las intensidades del resto de las líneas de los 20 espectros realizados.

Tabla 8. Líneas de Mg, Ca y Fe Exéresis de Prostata con Mayor**Densidad de Células Sanas.**

Espectro	Magnesio	Calcio	Calcio	Hierro
	280,37571nm	393,61412nm	397,00132nm	422,8272nm
1	5.2 ± 45.8	333.3 ± 48.2	673.4 ± 48.2	84.1 ± 57.5
2	35.3 ± 44.1	317.5 ± 42.1	651.7 ± 42.1	204.4 ± 62.1
3	90.7 ± 39.4	377.9 ± 39.0	643.8 ± 39.0	123.8 ± 64.7
4	35.5 ± 16.6	349.5 ± 30.0	665.1 ± 30.0	109.4 ± 54.0
5	48.6 ± 34.8	303.1 ± 51.7	670.7 ± 51.7	108.7 ± 56.6
6	8.2 ± 30.2	310.2 ± 42.5	620.9 ± 42.5	114.5 ± 53.5
7	19.6 ± 20.7	286.8 ± 29.4	474.9 ± 29.4	81.8 ± 38.4
8	0 ± 26.4	279.9 ± 37.8	542.7 ± 37.8	66.4 ± 43.0
9	16.1 ± 35.4	393.9 ± 41.2	705.3 ± 41.2	116.3 ± 61.2
10	46.2 ± 31.6	316.5 ± 38.2	665.2 ± 38.2	131.3 ± 56.9
11	33 ± 27.0	293.7 ± 54.2	588.6 ± 54.2	113.4 ± 63.4
12	37.9 ± 18.6	577.3 ± 25.4	1161.9 ± 25.4	117.7 ± 43.6
13	54.2 ± 34.8	561.3 ± 42.8	1311.6 ± 42.8	153.1 ± 53.7
14	39.3 ± 31.9	731 ± 38.8	1655.6 ± 38.8	419.7 ± 53.6
15	53.9 ± 23.9	331.3 ± 36.9	607.7 ± 36.9	73.4 ± 48.4
16	14.9 ± 36.9	391.9 ± 42.2	882.5 ± 42.2	95.2 ± 47.8
17	29.4 ± 39.1	332.9 ± 42.3	655.1 ± 42.3	92.1 ± 54.8
18	6.1 ± 16.9	307.8 ± 42.4	666.7 ± 42.4	103.8 ± 45.9
19	58.2 ± 42.0	621.5 ± 59.7	1174.1 ± 59.7	160.9 ± 43.7
20	15.9 ± 20.2	367.9 ± 37.6	733 ± 37.6	122.4 ± 48.7

Tabla 9. Líneas de Na Exéresis de Prostata con Mayor Densidad de Células Sanas.

Espectro	Sodio	Sodio	Sodio	Sodio
	572,53991nm	572,60969nm	589,42514nm	590,00003nm
1	0 ± 57.5	12 ± 57.5	0 ± 57.5	0 ± 57.5
2	17.2 ± 62.1	1.2 ± 62.1	10.2 ± 62.1	15.7 ± 62.1
3	14.7 ± 64.7	0 ± 64.7	25.8 ± 64.7	12.2 ± 64.7
4	0 ± 54.0	0 ± 54.0	21 ± 54.0	0 ± 54.0
5	0 ± 56.6	0 ± 56.6	6.9 ± 56.6	0 ± 56.6
6	0 ± 53.5	0 ± 53.5	35.8 ± 53.5	0 ± 53.5
7	0 ± 38.4	7.3 ± 38.4	17.1 ± 38.4	0 ± 38.4
8	0 ± 43.0	0 ± 43.0	12.7 ± 43.0	0 ± 43.0
9	0 ± 61.2	8.3 ± 61.2	13.5 ± 61.2	16.5 ± 61.2
10	10.2 ± 56.9	18.6 ± 56.9	28.1 ± 56.9	18.1 ± 56.9
11	0 ± 63.4	0 ± 63.4	0 ± 63.4	23.3 ± 63.4
12	0 ± 43.6	0 ± 43.6	0 ± 43.6	0 ± 43.6
13	0 ± 53.7	1.7 ± 53.7	10.6 ± 53.7	57.4 ± 53.7
14	16.2 ± 53.6	32.4 ± 53.6	36.3 ± 53.6	60.4 ± 53.6
15	0 ± 48.4	10.2 ± 48.4	18 ± 48.4	2.3 ± 48.4
16	7.1 ± 68.3	15.9 ± 68.3	51 ± 68.3	0 ± 68.3
17	0 ± 54.8	29.6 ± 54.8	7.8 ± 54.8	17.5 ± 54.8
18	6.2 ± 45.9	0 ± 45.9	0 ± 45.9	0 ± 45.9
19	0 ± 43.7	12.3 ± 43.7	0 ± 43.7	42.6 ± 43.7
20	21.2 ± 48.7	0 ± 48.7	11.4 ± 48.7	21.1 ± 48.7

Analizando la Tabla 10 y 11. No se observan señales de líneas de Na y la mayoría de las líneas de Mg son ruido. La línea más intensa en todos los espectros es la 397.00132nm de Ca. Esto se observa claramente en la Figura 24.

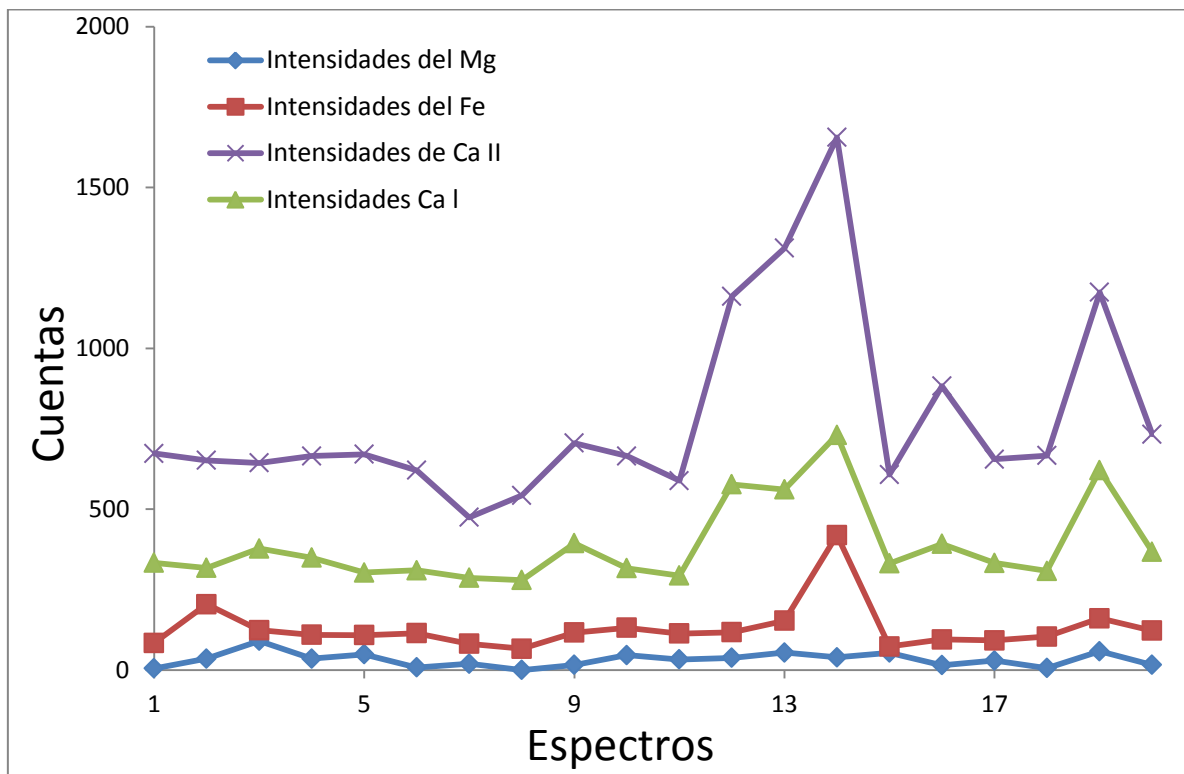


Figura 24: Intensidades de las líneas Espectros Exéresis de Próstata Zona de mayor concentración Células Sanas.

Debido a que todas las líneas de Na y la mayoría de las de Mg se encuentran como ruido se procedió a evaluar la variabilidad de la línea más intensa de Ca y la de Fe. En la tabla 12, podemos ver que las intensidades de las líneas de Ca varían con un porcentaje un poco mayor a las de Fe lo cual viene dado por el aumento en las intensidades de los espectros 11 al 14 y el 19, indicando un posible aumento de la concentración del Calcio en estas zonas. Es importante recordar que la Zona, que se identificó como Zona con Células Sanas, es una zona con un índice mucho menor de células con cáncer en donde la mayoría de las células son sanas, pero que en cualquier pulso hecho sobre la misma pueden estar inmersas células o una concentración alta de células con cáncer.

Tabla 10. Porcentaje de Variabilidad Líneas Fe y Ca II.

Líneas	Intensidad Promedio	Desviación	% de Variabilidad
Fe	129,6	75,3	58,1
Ca	787,5	301	38,2

La tabla 10 nos muestra que hay una mucha mayor variabilidad de las intensidades de las líneas de Fe con respecto a las de Ca II.

La Figura 25. Nos muestra el Espectro 12 de la Zona con mayor densidad de células con Cáncer donde se ve al igual que en la zona de células sanas que no hay señales de las líneas de Na. Esto se ve reflejado en el resto de los espectros.

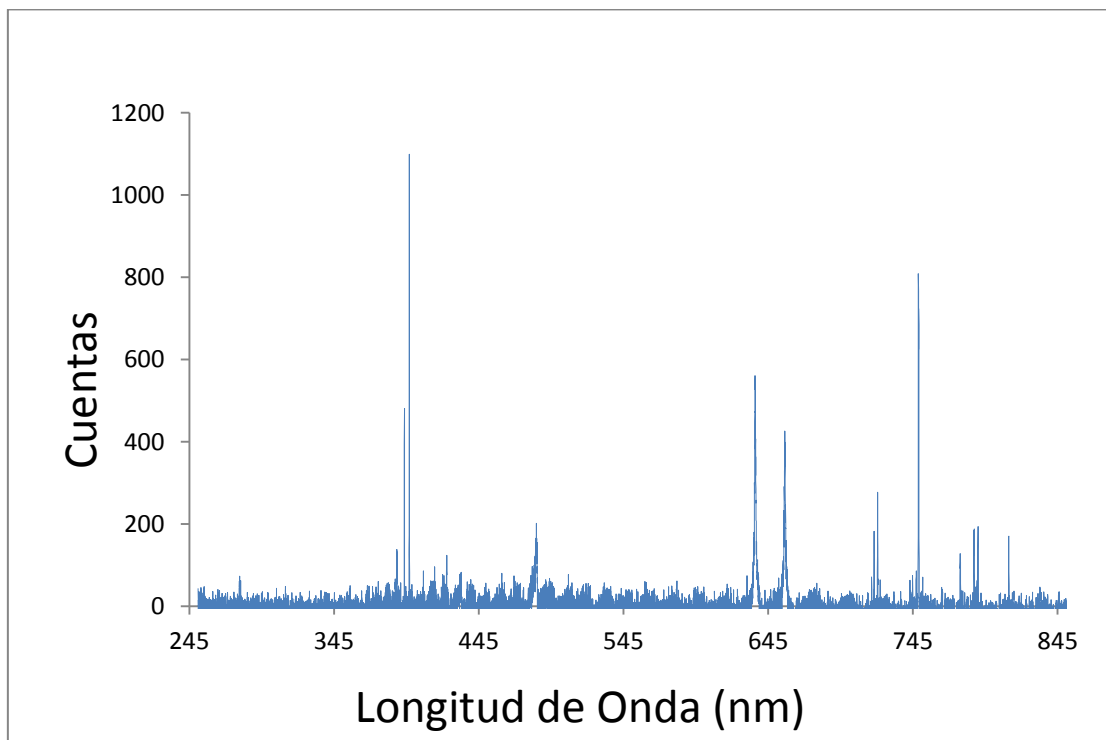


Figura 25: Espectro 12 Exéresis de Prostata con Mayor Densidad de Células con Cáncer.

Tabla 11. Intensidades de las Líneas de Mg, Fe y Ca Exéresis Próstata Células con Cáncer.

Espectro	Magnesio	Calcio	Calcio	Hierro
	280,37571nm	393,61412nm	397,00132nm	422,8272nm
1	41.8 ± 49.0	551.5 ± 49.0	1121.4 ± 49.0	160.6 ± 53.4
2	64.8 ± 31.4	749.8 ± 49.1	1402 ± 49.1	178.1 ± 48.2
3	30.8 ± 28.3	441.5 ± 41.5	674.7 ± 41.5	78.7 ± 54
4	31.3 ± 31.4	351.7 ± 43.0	720.5 ± 43.0	94.2 ± 56.1
5	5.2 ± 37.7	291.6 ± 41.1	506.6 ± 41.1	45.9 ± 46.0
6	57.7 ± 27.7	507.7 ± 47.2	1115.3 ± 47.2	131.6 ± 50.1
7	88.4 ± 55.8	538.4 ± 77.9	1146 ± 77.9	162.3 ± 68.8
8	0 ± 14.5	422.3 ± 21.7	682.2 ± 21.7	82.6 ± 41.8
9	6.8 ± 7.9	617.9 ± 29.9	1217.9 ± 29.9	262.6 ± 36.5
10	149.4 ± 14.9	1127.4 ± 31.2	2223.7 ± 31.2	307.2 ± 48.2
11	52.4 ± 8.6	893.9 ± 23.7	1843 ± 23.7	187.7 ± 44.2
12	46.1 ± 11.4	468.1 ± 40	1098.9 ± 40	123.8 ± 47.5
13	85.2 ± 22.5	898.4 ± 36.0	1881.1 ± 36.0	242.9 ± 47.9
14	23.4 ± 44.0	334 ± 62.4	705.9 ± 62.4	150 ± 64.1
15	32.7 ± 39.2	658.9 ± 43.0	1386.6 ± 43.0	179.5 ± 51.0
16	0 ± 26.3	303.6 ± 32.9	664 ± 32.9	150.3 ± 48.1
17	3.1 ± 47.8	180.6 ± 50.2	404.9 ± 50.2	75.7 ± 62.2
18	1.3 ± 44.1	403.5 ± 45.8	780.4 ± 45.8	53 ± 57.7
19	0 ± 43.3	157.4 ± 53.3	309 ± 53.3	106.4 ± 50.6
20	40.1 ± 46.7	96.9 ± 33.2	231.2 ± 33.2	59.1 ± 37.9

Analizando las intensidades de las líneas en la Tabla 11 se observa al igual que la zona con mayor cantidad de células sanas que las líneas de Mg casi en su totalidad no poseen señal. Las líneas de Ca poseen señal en todos los espectros y al igual que en las células sanas la línea más intensa es la de 397,00132nm de Ca.

En cuanto a las líneas de Fe los espectros 17, 18 y 20 no poseen señales. Esto puede verse más claramente en la Figura 29. Se ve claramente que la línea va tendiendo a cero.

Tabla 12. Intensidades de las Líneas de Na Exéresis de Próstata Células con Cáncer.

Espectro	Sodio	Sodio	Sodio	Sodio
	572,53991nm	572,60969nm	589,42514nm	590,00003nm
1	0 ± 53.4	0 ± 53.4	11.5 ± 53.4	14.4 ± 53.4
2	12.3 ± 48.2	3.5 ± 48.2	0 ± 48.2	17.7 ± 48.2
3	0 ± 54	0 ± 54	0 ± 54	23.9 ± 54
4	0 ± 56.1	47.3 ± 56.1	30.8 ± 56.1	0 ± 56.1
5	0 ± 46.0	0 ± 46.0	19.2 ± 46.0	0 ± 46.0
6	42.3 ± 50.1	7.2 ± 50.1	16.1 ± 50.1	0 ± 50.1
7	73 ± 68.8	37.9 ± 68.8	46.8 ± 68.8	15.2 ± 68.8
8	0 ± 41.8	3.9 ± 41.8	0 ± 41.8	0 ± 41.8
9	5.7 ± 36.5	0 ± 36.5	0 ± 36.5	0 ± 36.5
10	4.8 ± 48.2	0 ± 48.2	26.5 ± 48.2	34.3 ± 48.2
11	0 ± 44.2	1.4 ± 44.2	22 ± 44.2	0 ± 44.2
12	0 ± 47.5	0 ± 47.5	0 ± 47.5	25.3 ± 47.5
13	0 ± 47.9	0 ± 47.9	0 ± 47.9	0 ± 47.9
14	9.8 ± 64.1	0 ± 64.1	0 ± 64.1	11.7 ± 64.1
15	0 ± 51.0	0 ± 51.0	0 ± 51.0	3 ± 51.0
16	14.4 ± 48.1	1.7 ± 48.1	0 ± 48.1	6.4 ± 48.1
17	11.9 ± 62.2	9.3 ± 62.2	44.3 ± 62.2	0 ± 62.2
18	10.2 ± 57.7	0 ± 57.7	34.2 ± 57.7	41.6 ± 57.7
19	0 ± 50.6	0 ± 50.6	0 ± 50.6	1.3 ± 50.6
20	10.9 ± 37.9	0 ± 37.9	0 ± 37.9	6.9 ± 37.9

En cuanto a las líneas de Na, en ninguno de los espectros observamos alguna señal como se ve en la Tabla 12, en donde todas las intensidades están por debajo o al nivel del ruido.

La ausencia de señales de Na en ambas zonas puede deberse al tratamiento de la muestra a la hora de su extracción y preparación para identificar o buscar células con cáncer, lo que también puede afectar las señales de las líneas de Mg.

Si comparamos las intensidades de las líneas vemos que las líneas de Ca llegan a alcanzar intensidades mucho más altas, teniendo una diferencia mayor con respecto con las de Fe de las que tenía en las células Sanas. Como se ve claramente en la figura 26, las intensidades de las líneas de Mg no tienen señal. También se observa que las líneas de Ca tienen una gran variabilidad y que en los últimos espectros tenemos una disminución bastante pronunciada de su intensidad al igual q la línea de Fe..

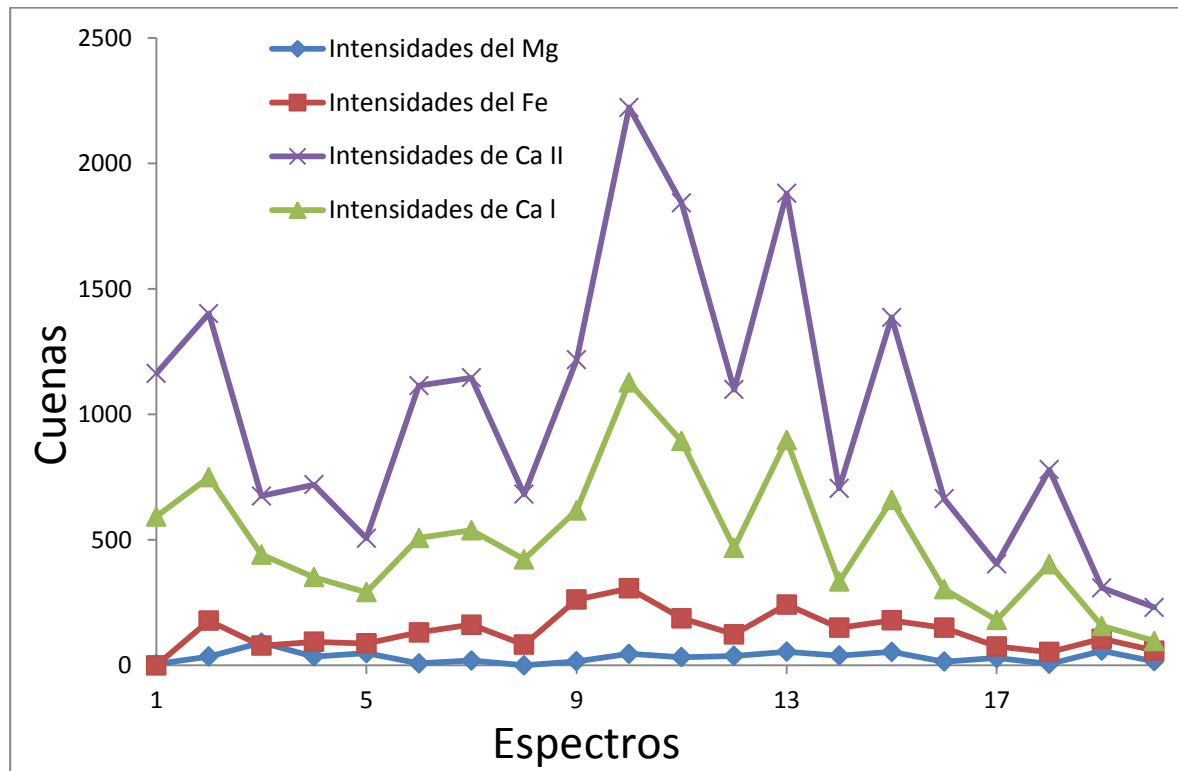


Figura 26: Comparación de las intensidades de las líneas de los espectros Exéresis de Próstata con Células con Cáncer.

Esta disminución de la intensidad de Ca y Fe en los últimos espectros pudo deberse a una menor concentración de este elemento en la parte final de la muestra. Como se observa en la Figura 30, la parte final de la muestra identificada con mayor concentración de células con cáncer se observa muchos claros (zona sin tejido) lo que dificultó mucho el asegurar que los pulsos hayan sido hechos completamente sobre el tejido.



Figura 27: Zona con claros en el tejido Exéresis de Próstata Mayor
Concentración de Células con Cáncer.

Debido a la gran cantidad de claros al final del tejido se decidió evaluar la variabilidad de las intensidades de las líneas de Ca hasta el espectro #15 en donde comienza a observarse los claros en el tejido.

Tabla 13. Porcentaje de Variabilidad de las Intensidades de las Líneas de Ca y Ca (15) más intensa y la de Fe, Fe(#15).

Líneas	Intensidad Promedio	Desviación	% de Variabilidad
Fe	141,6	70,9	50,1
Ca	1005,8	542,9	54
Ca ₁₅	1170,1	501,3	42,3
Fe ₁₅	159,2	72,1	45,3

Observando los porcentajes de variabilidad en la Tabla 13, claramente se ve la gran diferencia que hay cuando no se agregan los últimos 5 espectros de las líneas de Ca y Fe, en donde el porcentaje de variabilidad de las intensidades se reduce considerablemente de un 54.0% a un 42,3% para el caso de Ca y de 50.1% a 45.3% para el Fe. Y, a diferencia de la variabilidad en los espectros de la Zona con mayor índice de Células Sanas las variabilidades son similares entre Ca y Fe.

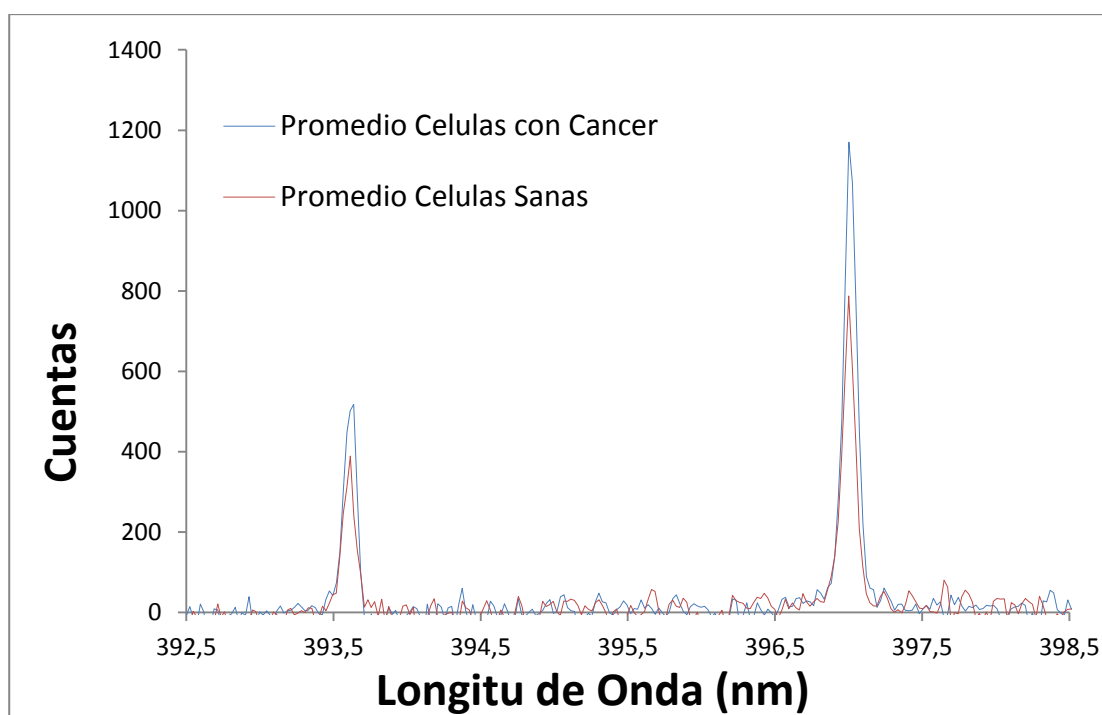


Figura 28: Relación entre las Zonas de Exéresis de Próstata Intesidades promedio de las líneas de Ca.

Al comparar las intensidades de las líneas de Ca entre las Zonas con mayor densidad de células con Cáncer reflejada en la Figura 28 con el color azul , con la de mayor densidad de células sanas reflejada en la Figura 31 con el color rojo, tenemos una diferencia bastante visible teniendo una mayor intensidad promedio las líneas de Ca en la zona con mayor índice de células con cáncer.

Comparando las intensidades promedio de las líneas de Fe entre ambas zonas representado en la Figura 29. Observamos que las intensidades promedios son bastante similares.

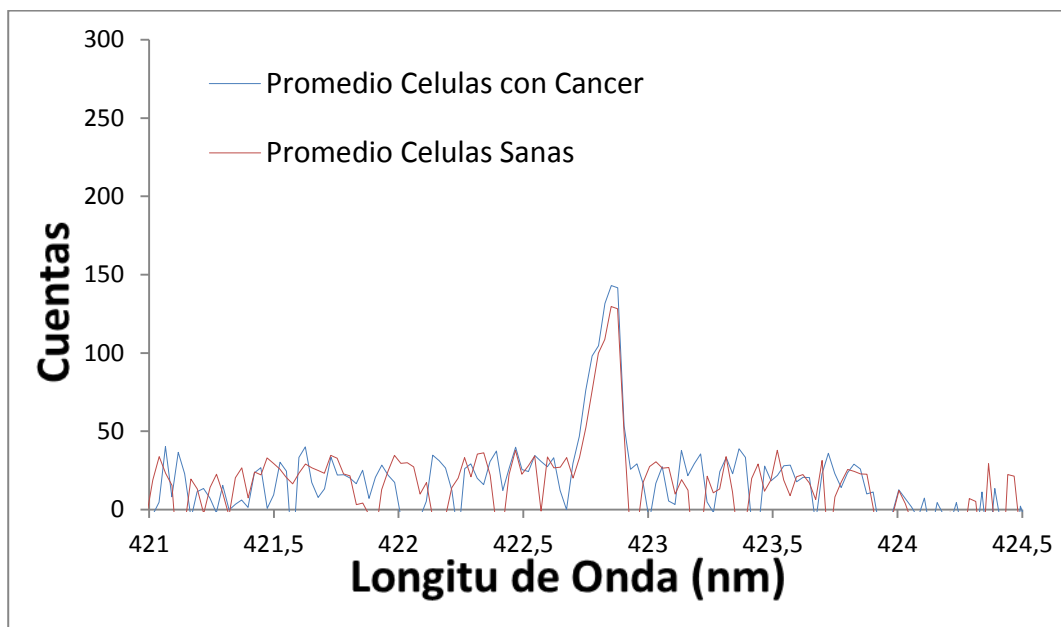


Figura 29: Relación entre las Zonas de Exéresis de Próstata Intensidades de las líneas de Fe.

En las Tablas 14 y 15 se tienen los valores de las relaciones entre las líneas de Ca II y Fe entre las zonas de mayor concentración de células con cáncer y mayor concentración de células sanas.

Tabla 14. Relación entre las líneas de Ca II de las Zonas de Exéresis de Próstata.

Intensidad Promedio Células Con Cáncer Ca II	Intensidad Promedio Células Sanas Ca II	Relación de Intensidades Ca II
1167,1	787,5	1,5

Tabla 15. Relación entre las líneas de Fe de las Zonas de Exéresis de Próstata.

Intensidad Promedio Células Con Cáncer Fe	Intensidad Promedio Células Sanas Fe	Relación de Intensidades Fe
157,7	129,2	1,2

La diferencia en las intensidades de Ca concuerdan con los resultados obtenidos por Akshaya y col, 2004^[13] y Hussein y col, 2010^[43]. Los cuales obtuvieron mayores intensidades en las líneas de Ca en tejidos con células o con mayor densidad de células con cáncer.

En cuanto a la intensidad de las líneas de Fe Akshaya y col, 2004^[13] obtuvieron intensidades más bajas para tejidos con una mayor densidad de células con cáncer. En nuestro caso obtuvimos lo contrario pero con una diferencia muy pequeña entre las intensidades promedio de cada zona.

Dada esta diferencia se procedió a comparar la relación Ca/Fe promedio entre las zonas de estudio dándonos una mayor relación como es de esperar en la Zona con mayor densidad de células con cáncer como lo refleja la tabla 16.

Tabla 16. Relación Ca/Fe promedio en ambas Zonas.

Intensidades Promedio Células con Cáncer			Intensidades promedio Células Sanas		
Ca	Fe	Ca/fe	Ca	Fe	Ca/Fe
1167,1	157,7	7,4	787,5	129,6	6,1

Para el promedio de las intensidades de las líneas de Ca y Fe para la zona con mayor índice de células con cáncer se tomaron los primeros 15 espectros debido a lo expuesto anteriormente con el área del tejido de los últimos 5 espectros.

VII.III. ANALISIS DE LAS LINEAS DE LOS ELEMENTOS PRESENTES EN LAS BIOPSIAS.

Como se observa en las Tablas 17 y 18 a diferencia de los espectros de la exéresis de próstata se obtuvo señal de las líneas más intensas de Na en todos los espectros. Y solo en los primeros 2 espectros no se obtuvieron señales de Mg.

Tabla 17. Intensidades de las Líneas de Mg, Fe y Ca en las Biopsias.

Muestra	Magnesio	Calcio	Calcio	Hierro
	280,37571nm	393,61412nm	397,00132nm	422,8272nm
1	41.6 ± 21.5	447.4 ± 42,2	983.2 ± 42,2	600.29 ± 41.7
2	81.6 ± 56.6	361.5 ± 49.5	895.9 ± 49.5	797.4 ± 51.0
3	119.9 ± 45.9	455.6 ± 52.2	128.2 ± 52.2	357.7 ± 56.6
4	214.8 ± 42.6	715.7 ± 52.7	1596.2 ± 52.7	757.3 ± 62.9
5	119.7 ± 43.3	539.4 ± 51.0	1233.8 ± 51.0	669.8 ± 55.4
6	155.8 ± 44.8	618.8 ± 38.7	1536.7 ± 38.7	573.8 ± 36.6
7	220.4 ± 40.2	845.2 ± 69.8	1887.3 ± 69.8	474.3 ± 51.6
8	102.1 ± 37.3	222.6 ± 43.0	567.5 ± 43.0	319.1 ± 42.8
9	137.7 ± 26.1	603.7 ± 29.4	1221 ± 29.4	329.4 ± 43.3
10	194 ± 21.1	738.3 ± 30.8	1716 ± 30.8	359.5 ± 42.7

Tabla 18. Intensidades de las Líneas de Na en las Biopsias.

Muestra	Sodio	Sodio	Sodio	Sodio
	572,53991nm	572,60969nm	589,42514nm	590,00003nm
1	115.6 ± 41.7	88.5 ± 41.7	457.1 ± 41.7	354.6 ± 41.7
2	162.8 ± 51.0	157.1 ± 51.0	751.5 ± 51.0	633.6 ± 51.0
3	74.7 ± 56.6	79.4 ± 56.6	411.1 ± 56.6	280.7 ± 56.6
4	207.5 ± 62.9	157.9 ± 62.9	825.7 ± 62.9	602.2 ± 62.9
5	199.7 ± 55.4	189.1 ± 55.4	495.2 ± 55.4	359.2 ± 55.4
6	168 ± 36.6	127.5 ± 36.6	468.4 ± 36.6	411.6 ± 36.6
7	67.7 ± 51.6	79.5 ± 51.6	167.6 ± 51.6	143.5 ± 51.6
8	76.5 ± 42.8	52.3 ± 42.8	226.6 ± 42.8	167.8 ± 42.8
9	27.9 ± 43.3	48.5 ± 43.3	169.7 ± 43.3	136.2 ± 43.3
10	27.4 ± 42.7	48.13 ± 42.7	124.9 ± 42.7	157.0 ± 42.7

Para tener poder visualizar mejor estos resultados en la Figura 33 se observa una comparación de las intensidades de las líneas de Mg, Fe, Ca II y Na III.

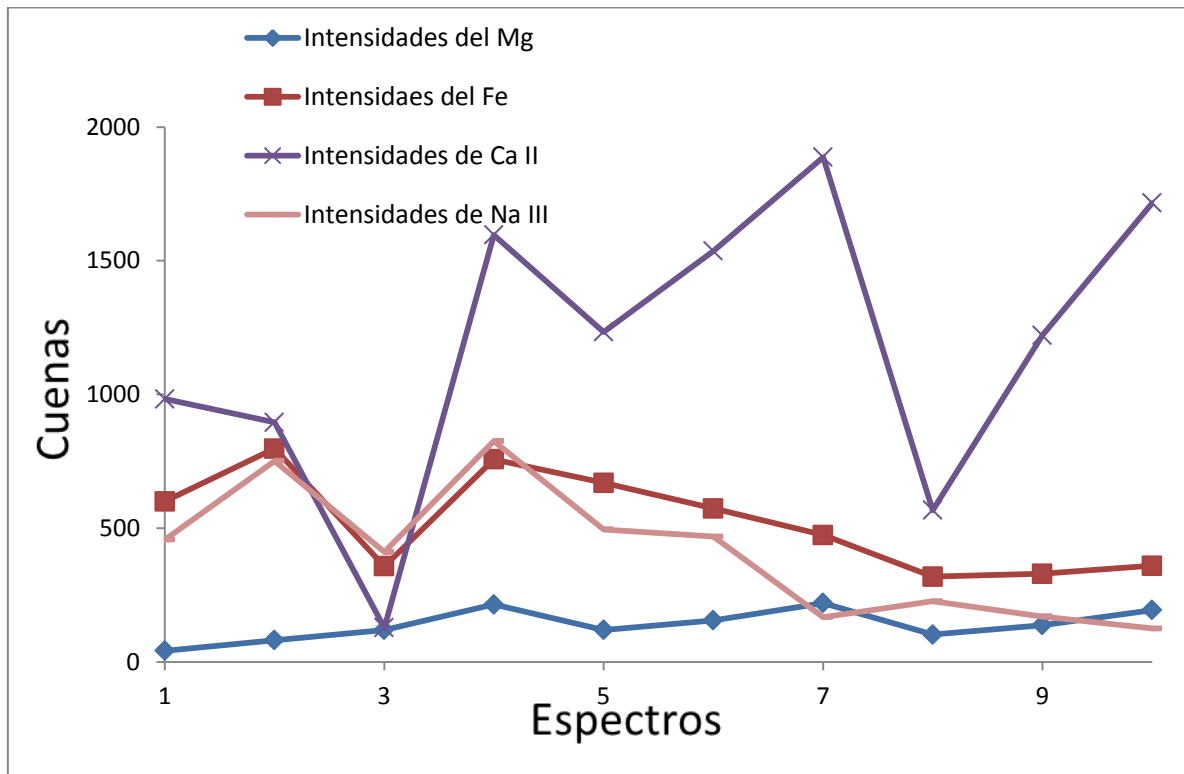


Figura 30. Comparación de las intensidades de las líneas de Mg, Fe, Ca II y Na III de los espectros de las Biopsias.

Si vemos la comparación entre las líneas con excepción de la Biopsia #3 la línea más intensa de Ca es la línea más intensa en el resto de las biopsias, demarcada con color morado en la Figura 33. También se puede ver que, las intensidades de las líneas en cada biopsia varían en gran medida y estas intensidades no varían con una relación entre sí, no tienen una tendencia de aumento o disminución. Sí la línea de Ca aumenta o es más intensa no se observa que alguna de las otras líneas aumente o sea más intensa cada vez que esto ocurre y así, se observa con todas las líneas si las comparamos de esta manera.

VIII. CONCLUSIONES

Al evaluar los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir que se logró ajustar las condiciones de medida para el análisis de las biopsias de próstata, ideando un porta muestra sencillo que eliminó las interferencias en el análisis. Igualmente, en los espectros obtenidos se lograron identificar 4 metales en las Biopsias Mg, Fe, Ca y Na y 3 metales en la muestra de próstata extraída con el mismo ajuste de condiciones Mg, Fe y Ca en donde se observa la ausencia de las señales de Na.

Nuestros espectros muestran un porcentaje de variabilidad del Fe mucho mayor al del Ca en la zona con mayor densidad de células sanas en la exéresis de próstata a diferencia de la zona con mayor densidad de células con cáncer en donde se obtuvieron porcentajes de variabilidad de Ca y Fe similares.

Por otro lado, se observó con claridad mayores intensidades en las líneas de Ca en la zona con mayor concentración de células con cáncer mientras las intensidades de las líneas de Fe tuvieron pocas diferencias entre ambas zonas. Siendo la de mayor intensidad promedio la de la zona con mayor índice de células con cáncer; lo cual originó que exista una relación más alta de Ca/Fe en esta misma zona.

Los resultados obtenidos en las biopsias de próstata analizadas no nos permitieron observar relaciones entre las intensidades de los metales identificados en las mismas.

Todo lo expuesto anteriormente nos permite concluir que la técnica es viable para el análisis de metales y metales traza en Biopsias de Próstata y Próstatas extraídas.

IX. RECOMENDACIONES

- No reutilizar las muestras de Biopsias de Próstata varias veces debido a que van perdiendo consistencia y se hace más difícil su manipulación. Además de esto se observó que las intensidades fueron disminuyendo a medida que se utilizaba, guardaba y volvía a utilizar varias veces una muestra de Biopsia.
- Hacer un estudio amplio de muestras de Próstata extraída con Zonas con mayor cantidad de Células con Cáncer y otra con mayor cantidad de Células Sanas y así comparar y evaluar si existe una diferencia significativa entre la relación Ca/Fe de ambas zonas. Y así poder evaluar el método como un método de diagnóstico preventivo contra la aparición o tratamiento del Cáncer.
- Intentar mejorar las condiciones de medida para intentar aumentar las señales y buscar otros elementos metálicos que puedan contribuir con el estudio planteado.

X. BIBLIOGRAFIA

- [1] S/A Cáncer conceptos básicos. Descargado en <http://www.elmundo.es/elmundosalud/especiales/cancer/basicos.html> Octubre. 2010.
- [2] S/A Generalidades del cáncer. Descargado <http://www.latinsalud.com/articulos/00126.asp> Octubre. 2010
- [3] Ramzi Cotran, Vinay Kumar, Tucker Collin. Robbins Pathologic Basis of Disease, 6ta Edición. (1999). p. 327.
- [4] Capote N. Luis G., Aspectos epidemiológicos del cáncer en Venezuela. Rev. venez. oncol., dic. 2006. 18 (4): 269-281. ISSN 0798-0582.
- [5] Diaz M. Gonzalo E. La Próstata. Universidad Nacional de Colombia. <http://www.drgdiaz.com/eco/prostata/index.shtml>. Octubre de 2010.
- [6] Licata, M. El selenio en la nutrición. Descargado en <http://www.zonadiet.com/nutricion/selenio.htm> Septiembre. 2010.
- [7] Torres A. Antonio., Borque Ángel F. Col. GPC Cáncer de Próstata. (2008) p. 29-31
- [8] S/A Instituto Nacional del Cáncer EE.UU. <http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/prostate>. Octubre 2010
- [9] S/A. Medline Plus. http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/18038.htm . Octubre de 2010
- [10] <http://www.dmedicina.com/enfermedades/cancer/cancer-prostata>. (Descargado en Octubre de 2010).
- [11] Centro de investigación del cáncer Fred Hutchinson. Vida Saludable Prevención.
- [12] Zulema Coppes. Selenio en la nutrición y el cáncer. Rev. Asociacion de Química y Farmacia del Uruguay. Agosto. 1999. No. 24. http://www.aqfu.org.uy/revista/revistas1999/abril/selenio_nutricion_cancer.htm
- [13] Akshaya Kumar, Fang-Yu Yueh, Jagdish P. Singh, and Shane Burgess. Characterization of Malignant Tissue Cells By Laser-Induce Breakdown

Spectroscopy. Optical Society of America. Applied Optics. (2004). Vol. 43, No 28. p. 5399-5402.

- [14] S/A Propiedades del magnesio. <http://www.vivirnatural.com/alim/magnesio.htm> Septiembre de 2010.
- [15] Hirsch, S. Vitaminas y elementos trazas. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Chile. S/F. Descargado en http://gimena.files.wordpress.com/2008/01/vitaminas_y_elementos_traza.pdf. Septiembre. 2010.
- [16] Campbell, J. Lifestyle, minerals and health. Medical hypotheses. (2001). Vol. 57, p. 521-531.
- [17] Brys M., Agnieszka D., zinc and Cadmium analysis in human prostate neoplasms. Biol Trac Element Res. (1997). Vol. 59, p. 145-151.
- [18] Liang JY, Liu YY. Inhibitory effect of zinc on human prostatic carcinoma cell. Prostate (1999). 40 (3): 200-207.
- [19] Bataineh ZM. Nuclear zinc in the three lobes of the rat prostate gland. Citobios (2001). 105 (408): 7-17.
- [20] Kowal NE. Urinary cadmium and beta2-microglobulin: correlation with nutrition and smoking history. J Toxicol Environ Health (1988). 25 (2): 179-183.
- [21] Fels LM. Risk assessment of nephrotoxicity of cadmium. Renal Fail (1999). 21 (3-4): 275-281..
- [22] Lam K., Wang L., Hong BS., Treble D. Purification of Phospholipid hydroxiperoxide glutathione peroxidase from bovine retina. Curr Eye Res. (1993). 12 (1): 9-15.
- [23] Patrik L. Selenium biochemistry and cancer: a review of the literature. Alternative medicine review. (2004). 9 (3): 239-241.
- [24] Bataineh ZM. Nuclear Zinc in the three lobes of the rat prostate gland. Citobios. (2001). 105 (408): 7-17.
- [25] Feng P., Liang JY. Zinc induced mitochondrial apoptogenesis in prostate cells. Mol Urol (2000). 4 (1): 31-36.

- [26] Zaichik V., Ermidou-Pollet, S., Pollet S. Bio-and medicolelementology as a new scientific discipline I. Fundamental postulates. Proceedings 5th International symposium on trace elements in human: new perspectives. Athens 2005. Págs. 24-28
- [27] Alarcon-Corredor, O. Los elementos traza. Laboratorio de espectroscopia molecular. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad de los Andes. Merida. Aceptado 30 de noviembre 2009. (Descargado en Septiembre de 2010).
- [28] Villaroel, J. Elementos biogénicos (Zn, Cu, Fe y Mg) en el pelo, uñas y suero sanguíneo en la mujer gestante, en el pelo y uñas de recién nacidos. Trabajo de grado para optar al título de Doctor en Química Analítica. Facultad de Ciencias. Universidad de los Andes. Mérida. 2004.
- [29] L. Mahan, S. Scout-Stump. Nutrición y Dioterapia de Krause. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. México. 1996. Capítulo 5. Págs. 119-161.
- S/A. Medline Plus.
http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/18038.htm
. Octubre de 2010
- [30] Licata, M. El Selenio en la nutrición. Descargado en <http://www.dmedicina.com/enfermedades/cancer/cancer-prostata>. Octubre 2010.
- [31] Zachara B., Szewczyk-Golec K., Wolski Z., Tyloch. J., Skok Z., Bloch-Boguslaw E., and Wasowicz W. Selenium level in benign and cancerous prostate. Biological trace element research. (2005). 103-200.
- [32] Nomura A., Lee J., Stemmermann G., and combs G. Serum Selenium and subsequent risk of prostate cancer. Cancer Epidemiology, Biomarkers & prevention. (2000) 9: p. 883-887.
- [33] Skoog D., Holler J., Nieman T. Principio de análisis instrumental. Quinta edición: Editorial McGraw-Hill. España 2001. Capítulo 10,11. Págs. 245-288.
- [34] Piscitelli S. Vincent. Contribución al estudio de la espectroscopía de plasma inducido por láser. Trabajo especial de grado para optar al título de Doctor en Ciencias, Mención Química. Marzo 2010.

- [35] Richard E., Xianglei M., Haichen L., Jhanis G., Samuel S. Laser ablation in analytical chemistry—a review. *Talanta*. (2002). 57: p. 425–451
- [36] Fantoni, L. Caneve, F. Colao, L. Fornarini, V. Lazic, V. Sizzichino. Laser Induce Breakdown Spectroscopy. *Advances in Spectroscopy for Lasers and Sensing*. Springer (2006): p. 229-254.
- [37] Cremers David A., Chinni Rosemarie C. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy—Capabilities and Limitations. *Applied Spectroscopy Reviews*. (2009). 44 (6): p. 457-506.
- [38] Richard E. Laser Ablation. *Focal Point* (1995). 49 (9): p. 14-25
- [39] Richard E. Laser Ablation. *Focal Point* (1995). 49 (9): p. 14-25
- [40] Cortesi M., Shilstein S., Breskin A., Chechik R., Vartsky D., Ravivd G., Kleinman N., Rmond J., koganf G., Gladysh V., Huszar M., Moriel E., Volkov A., Fridman E. Prostatic Zn determination for prostate cáncer diagnosis. *Talanta* (2006) 70: p. 914-921.
- [41] Murillo V. Victor J. Determinacion de elementos traza en suero sanguíneo y próstata por espectrometría óptica con plasma inductivamente acoplado y espectrometría de masa con plasma de acoplamiento inductivo. Trabajo especial de grado para obtener el título de Licenciado en Química. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. 2009.
- [42] A. El-Hussein, A.K. Kassem, H. Ismail, M.A. Harith. Exploiting LIBS as spectrochemical analytical technique in diagnosis of some types of human malignancies. *Talanta* (2010) 82: p. 495–501.

VX. APENDICE

ESPECTROS DE EXERESIS DE PROSTATA Y DE LAS BIOPSIAS.

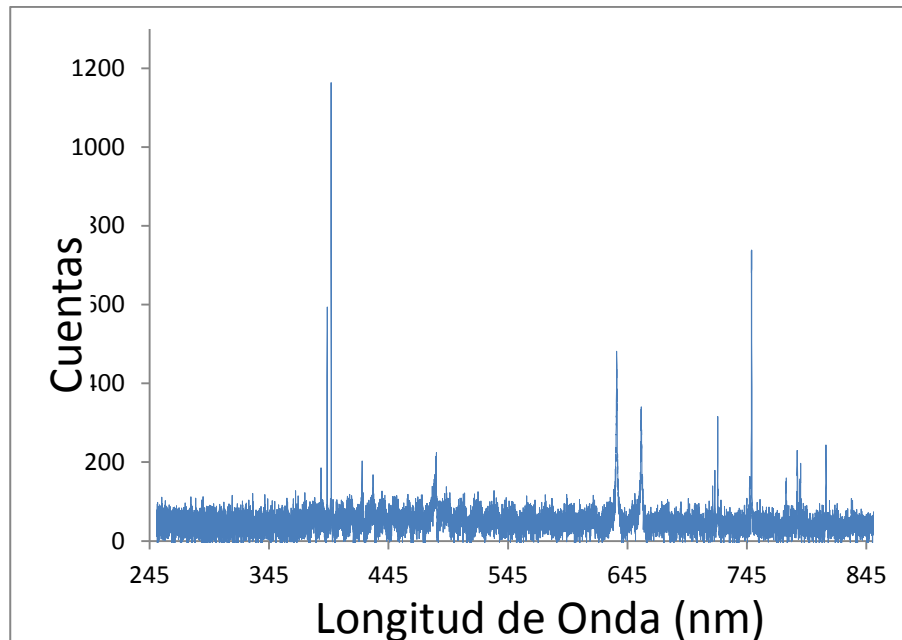


Figura 1: Espectro 1 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células con Cáncer.

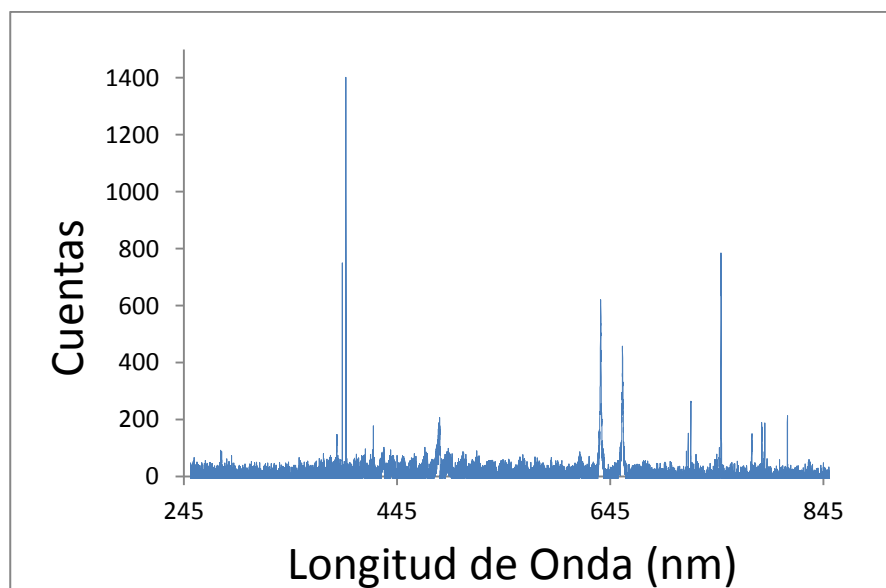


Figura 2: Espectro 2 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células con Cáncer.

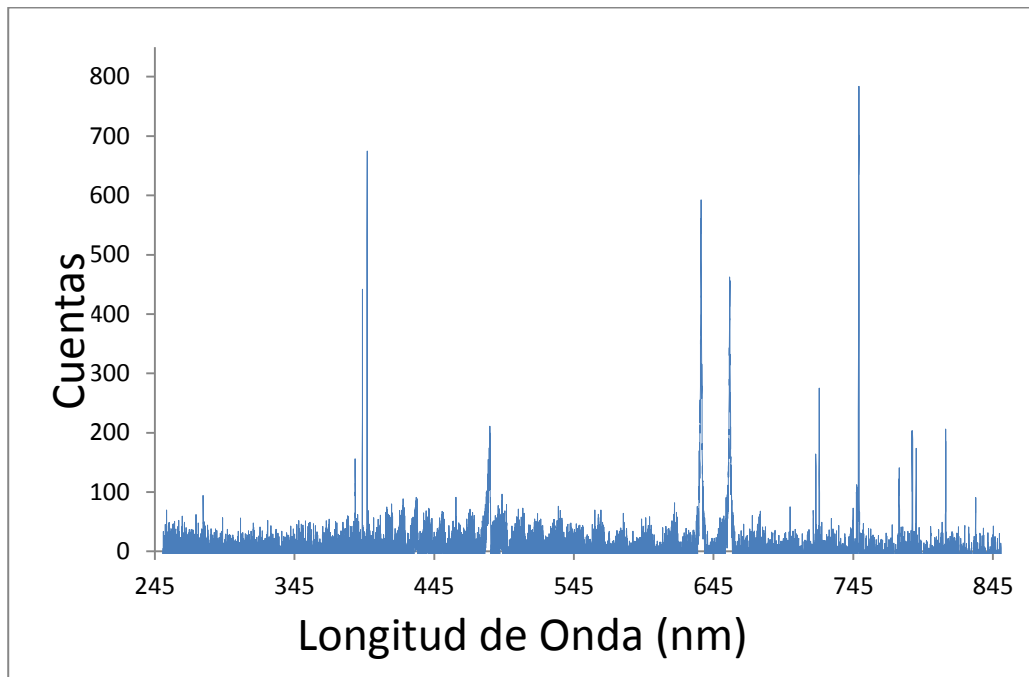


Figura 3: Espectro 3 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células con Cáncer.

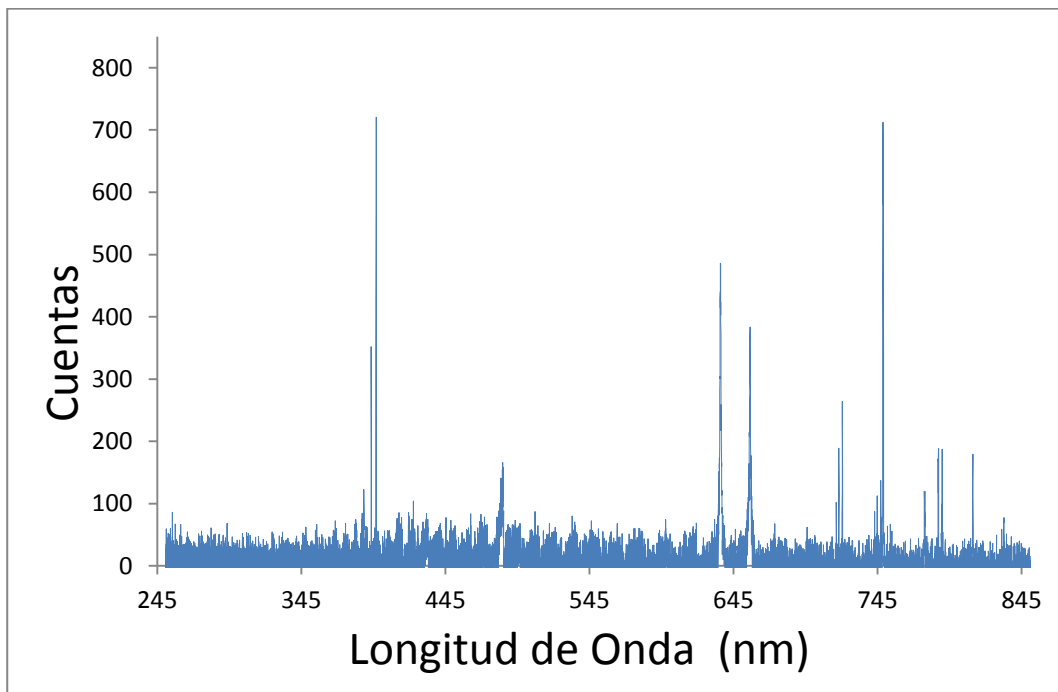


Figura 4: Espectro 4 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células con Cáncer.

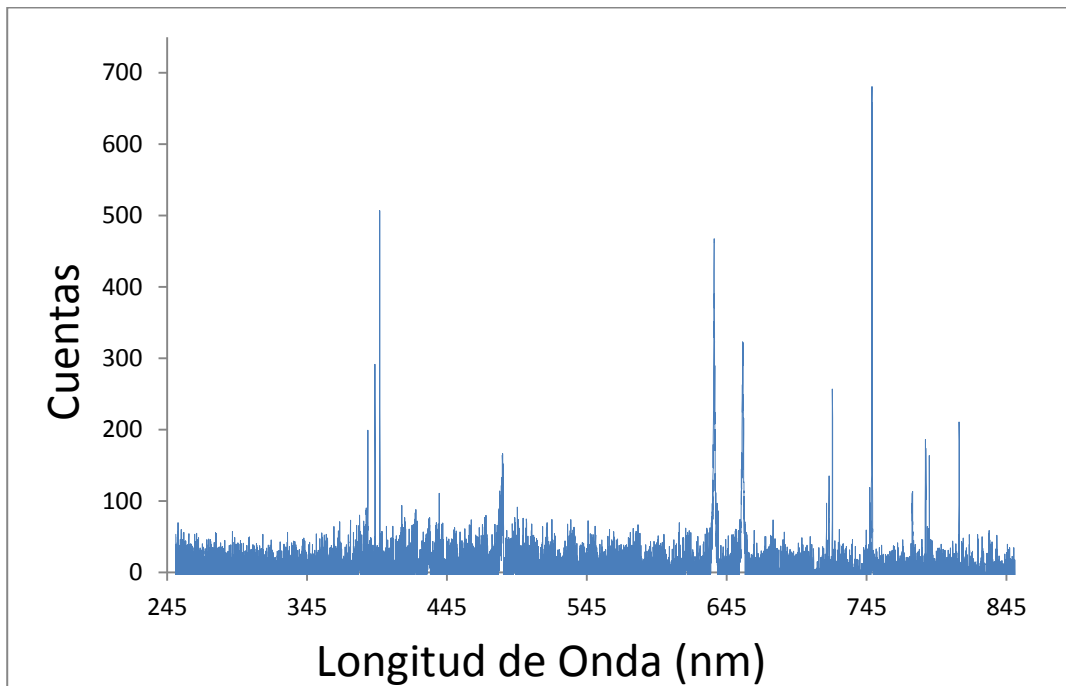


Figura 5: Espectro 5 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células con Cáncer.

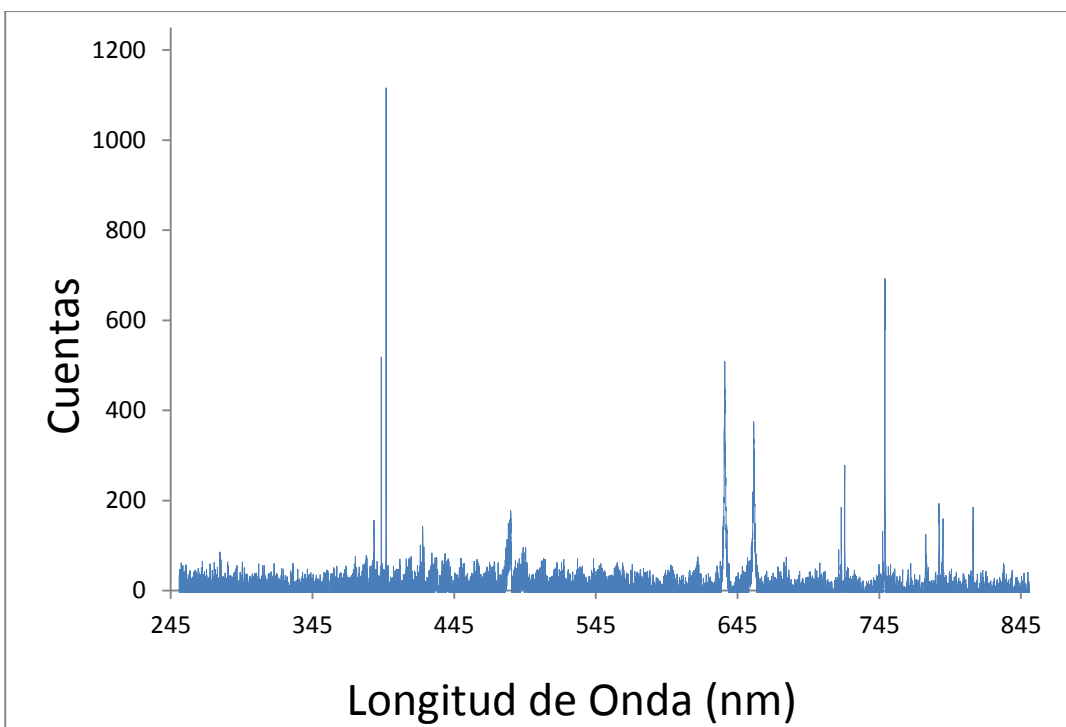


Figura 6: Espectro 6 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células con Cáncer.

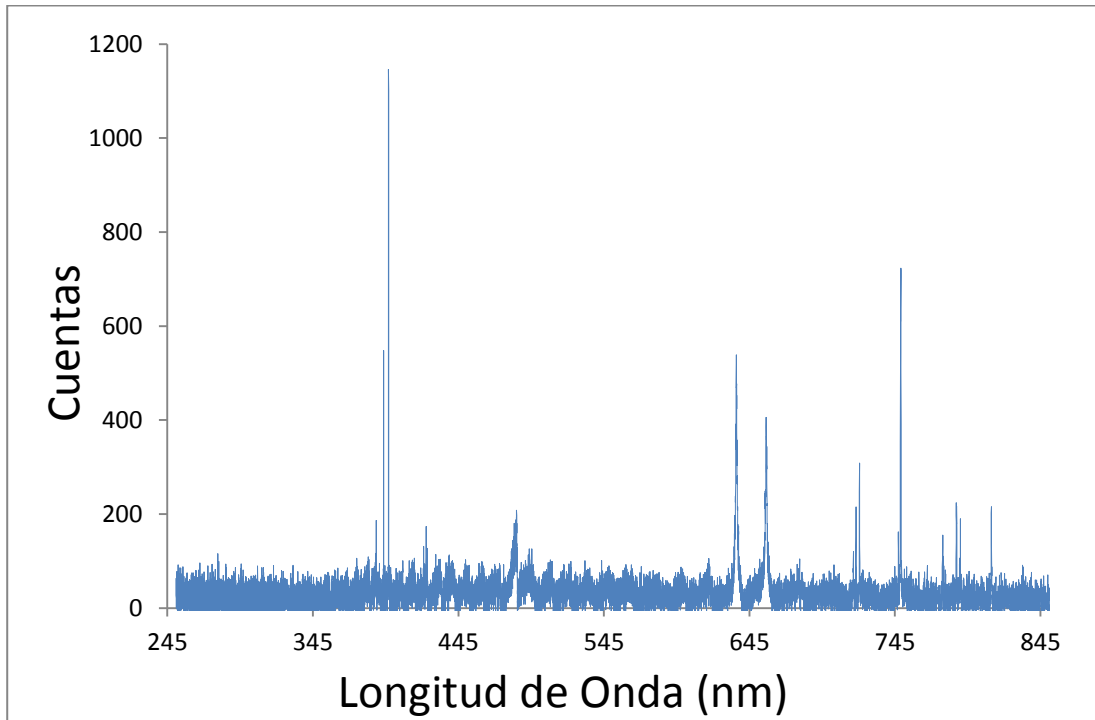


Figura 7: Espectro 7 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células con Cáncer.

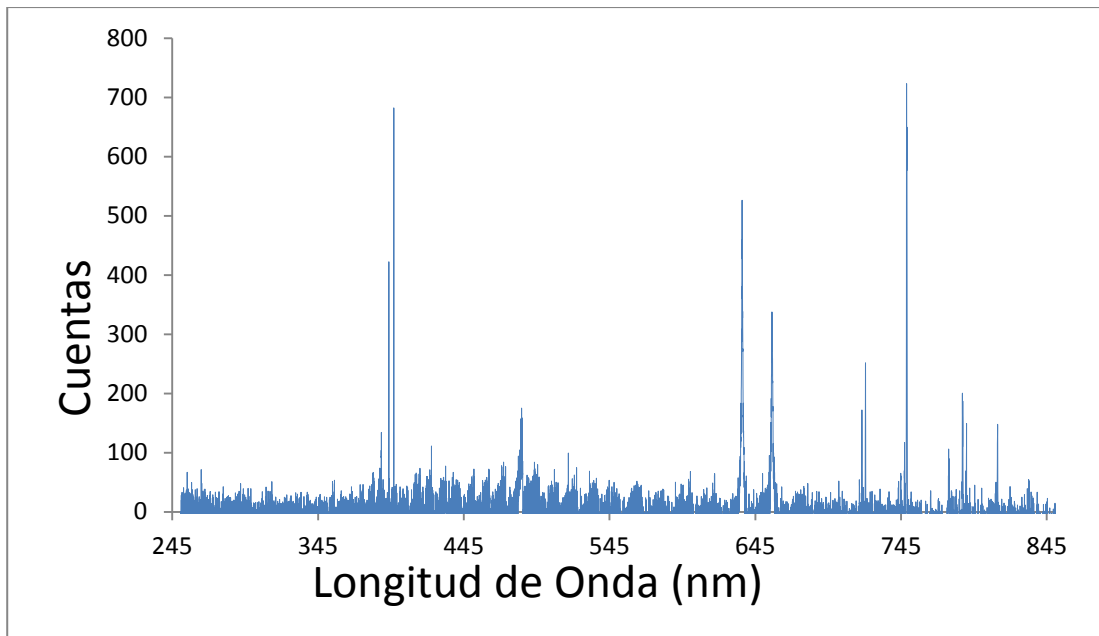


Figura 8: Espectro 8 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células con Cáncer.

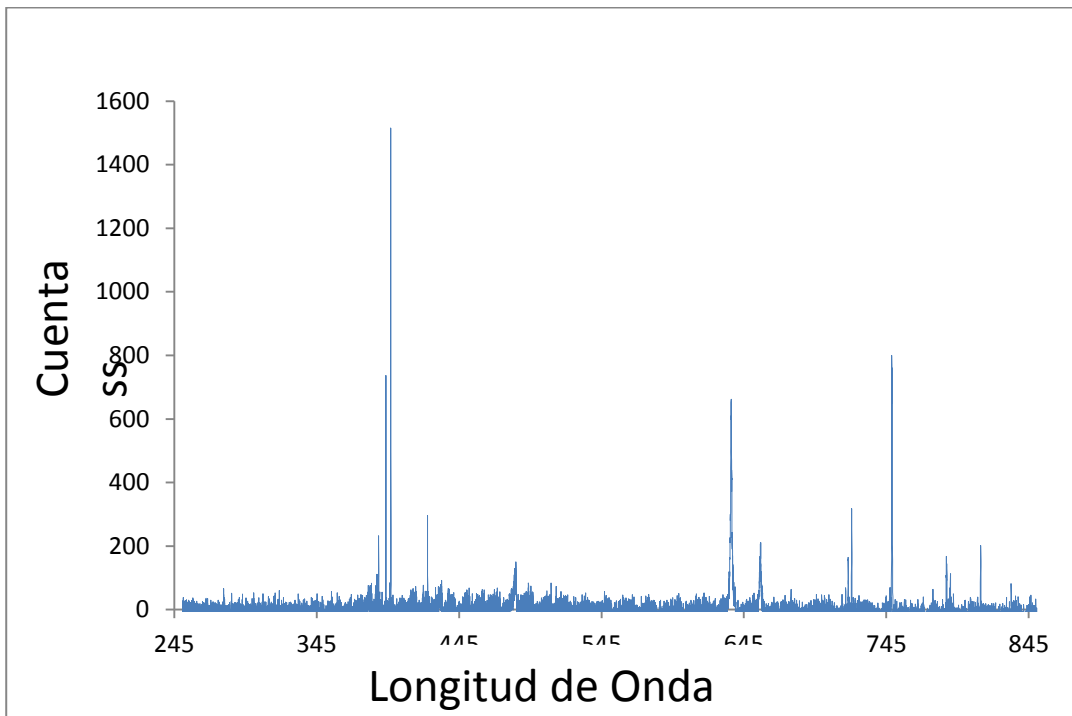


Figura 9: Espectro 9 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células con Cáncer.

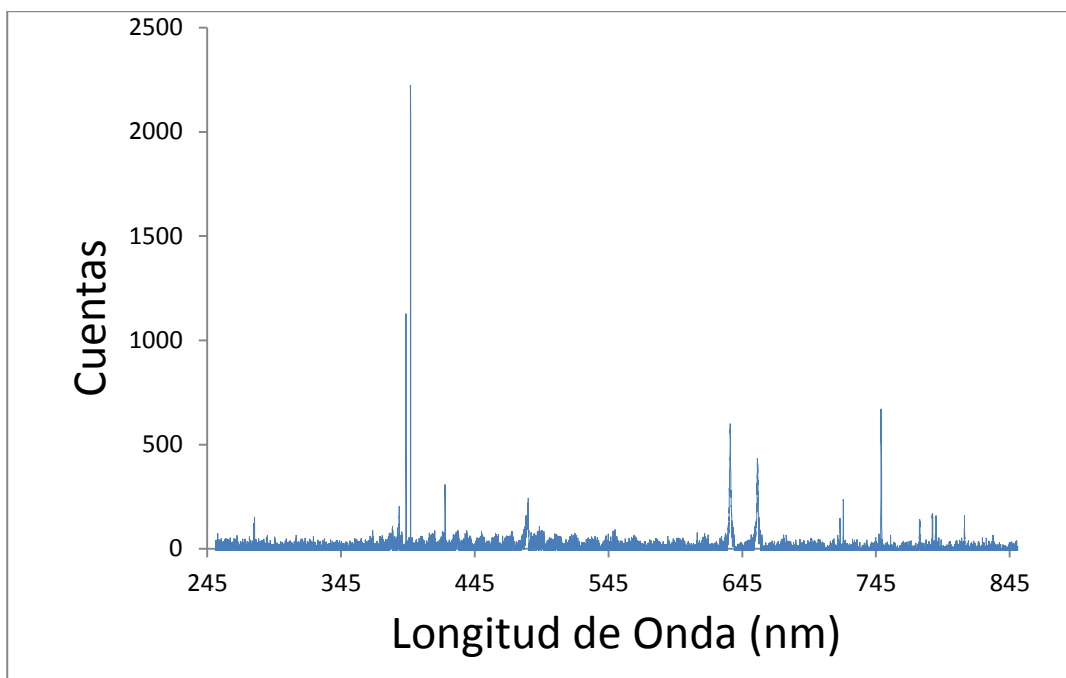


Figura 10: Espectro 10 Exéresis de próstata con Mayor Densidad de Células con Cáncer.

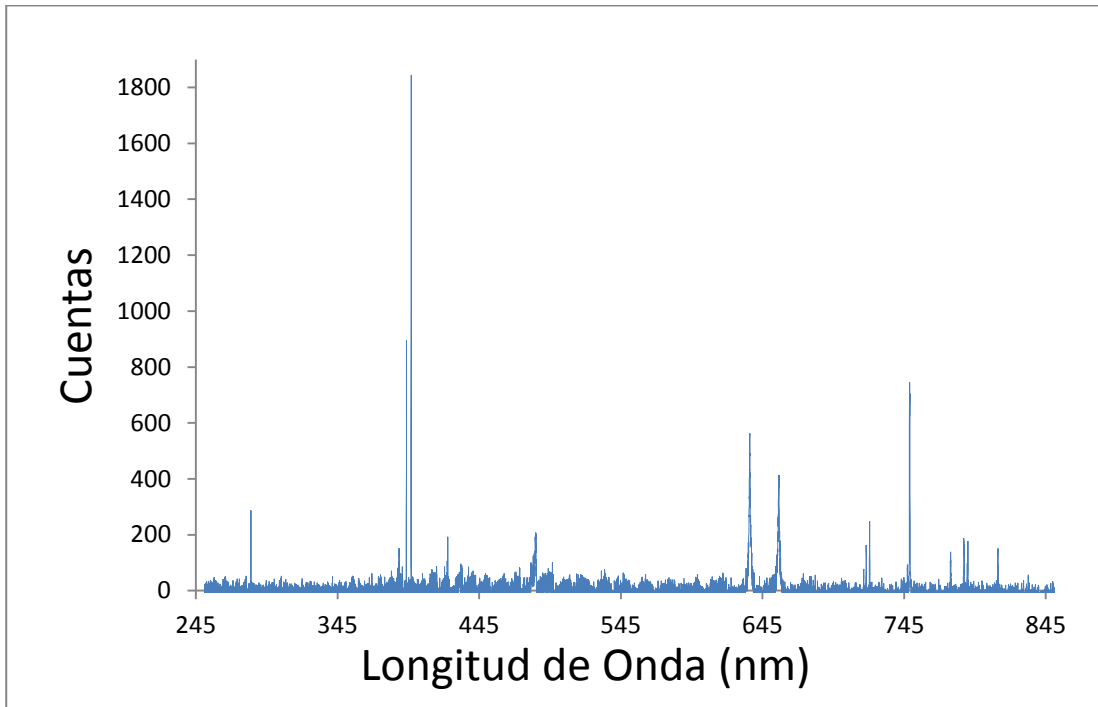


Figura 11: Espectro 11 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células con Cáncer.

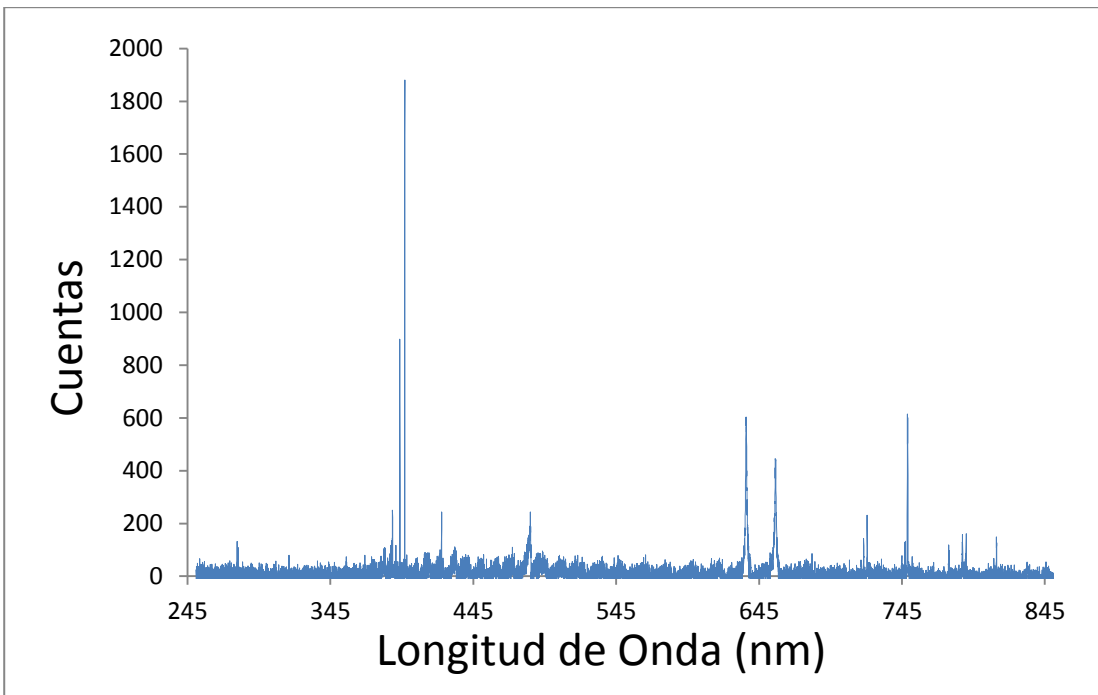


Figura 13: Espectro 13 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células con Cáncer.

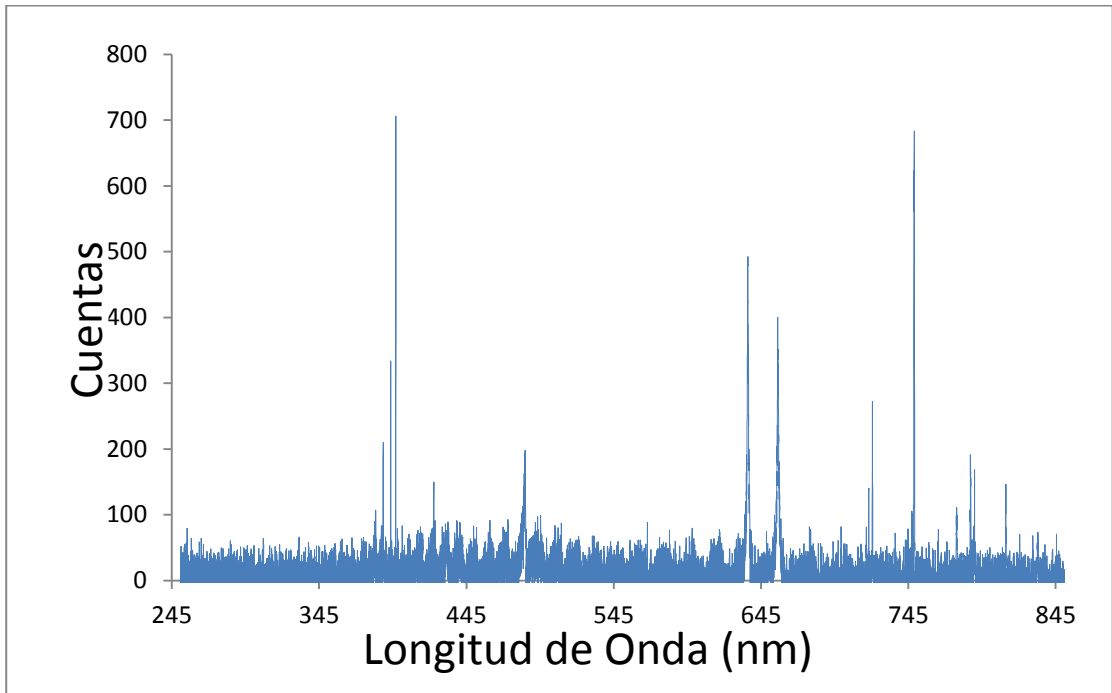


Figura 14: Espectro 14 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células con Cáncer.

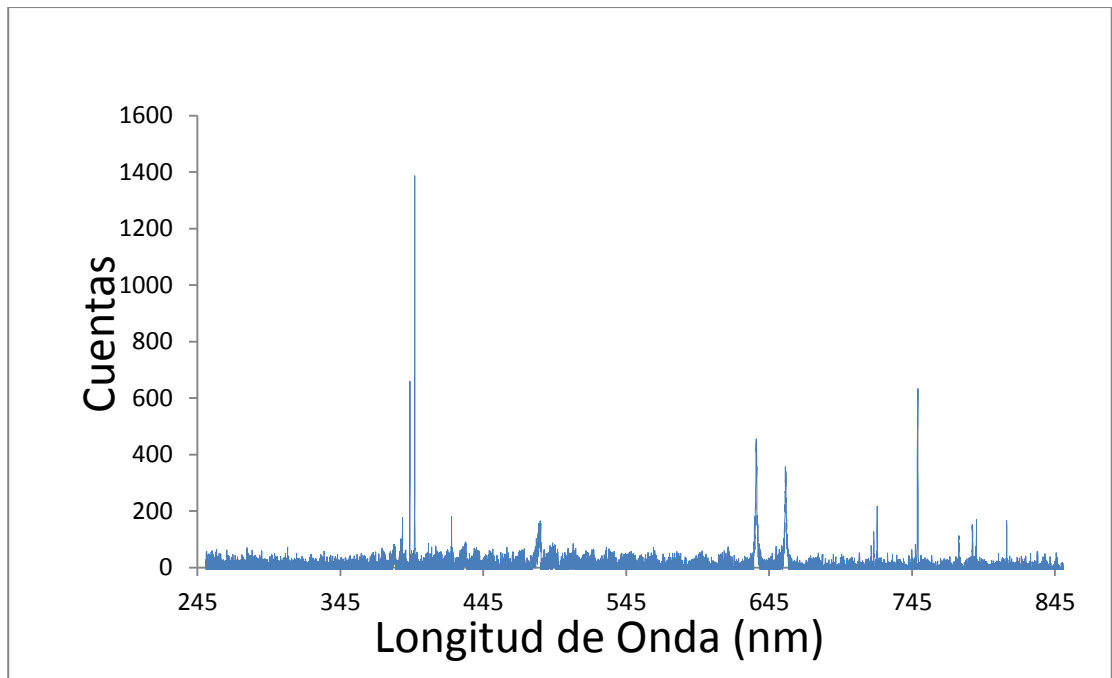


Figura 15: Espectro 15 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células con Cáncer.

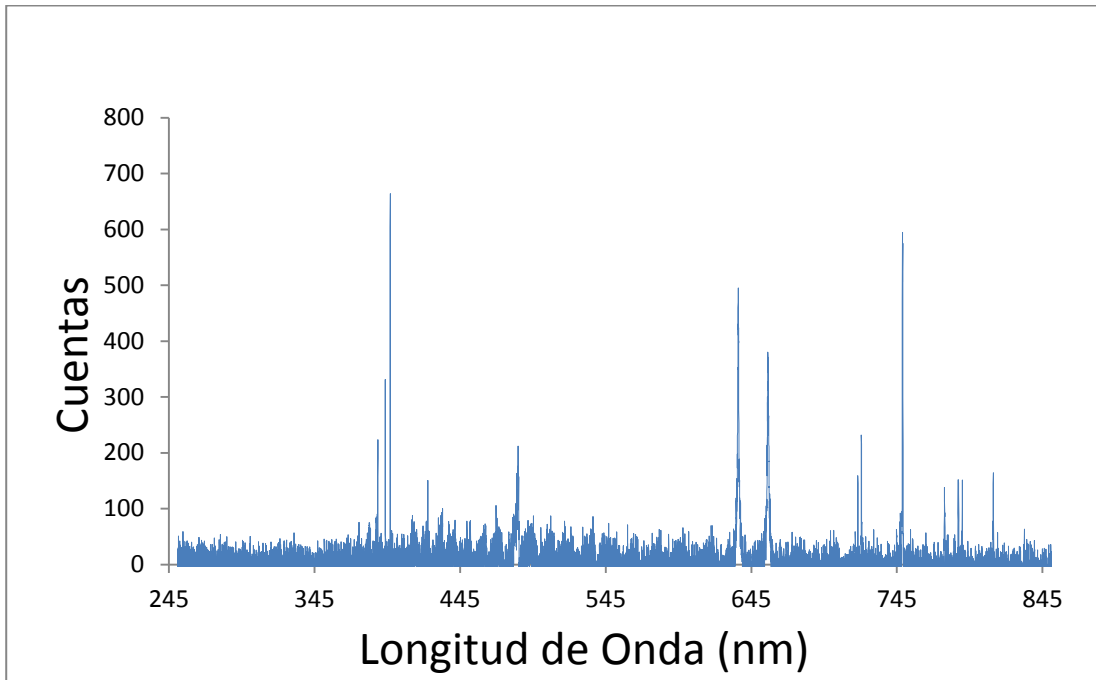


Figura 16: Espectro 16 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células con Cáncer.

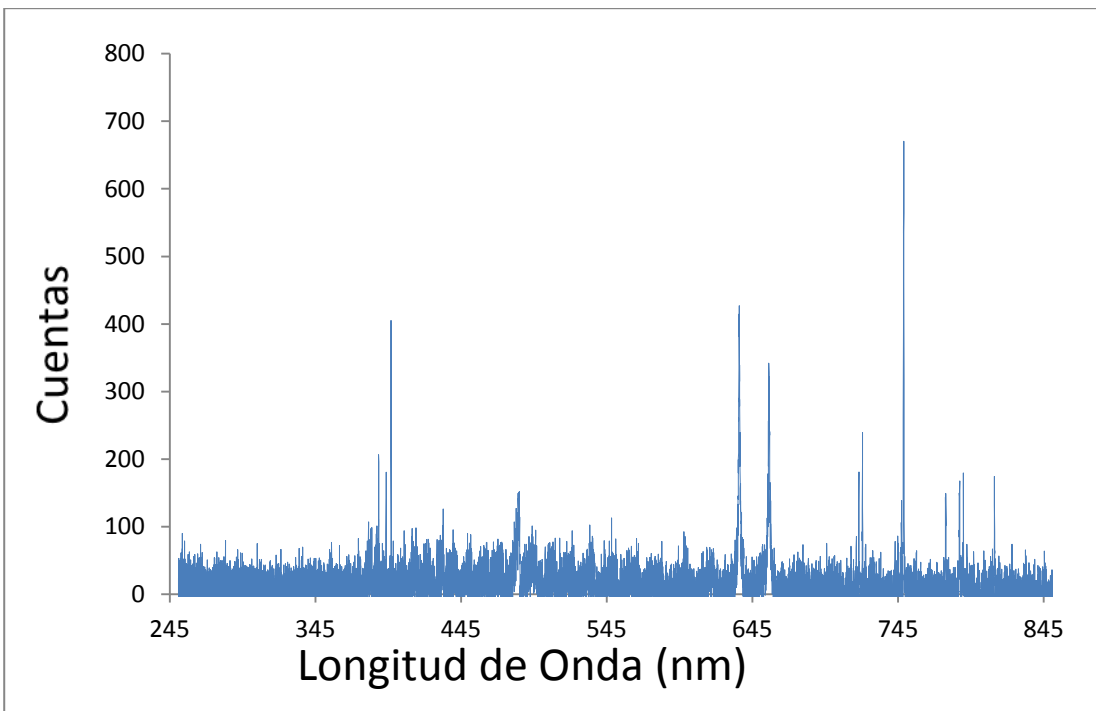


Figura 17: Espectro 17 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células con Cáncer.

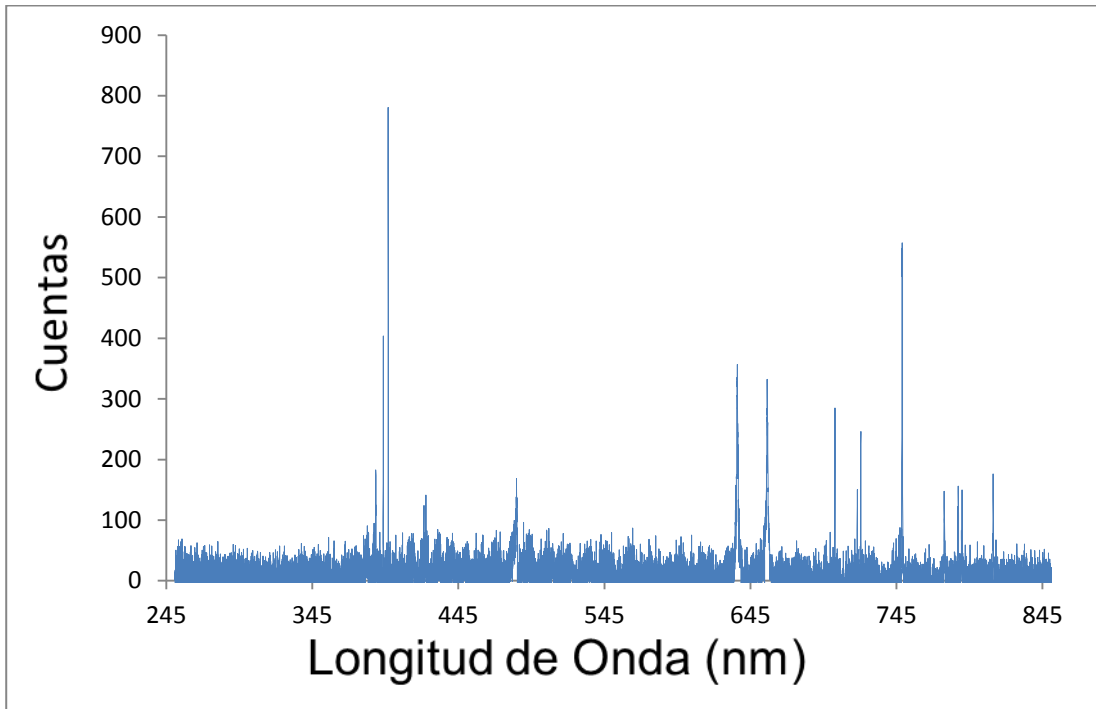


Figura 18: Espectro 18 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células con Cáncer.

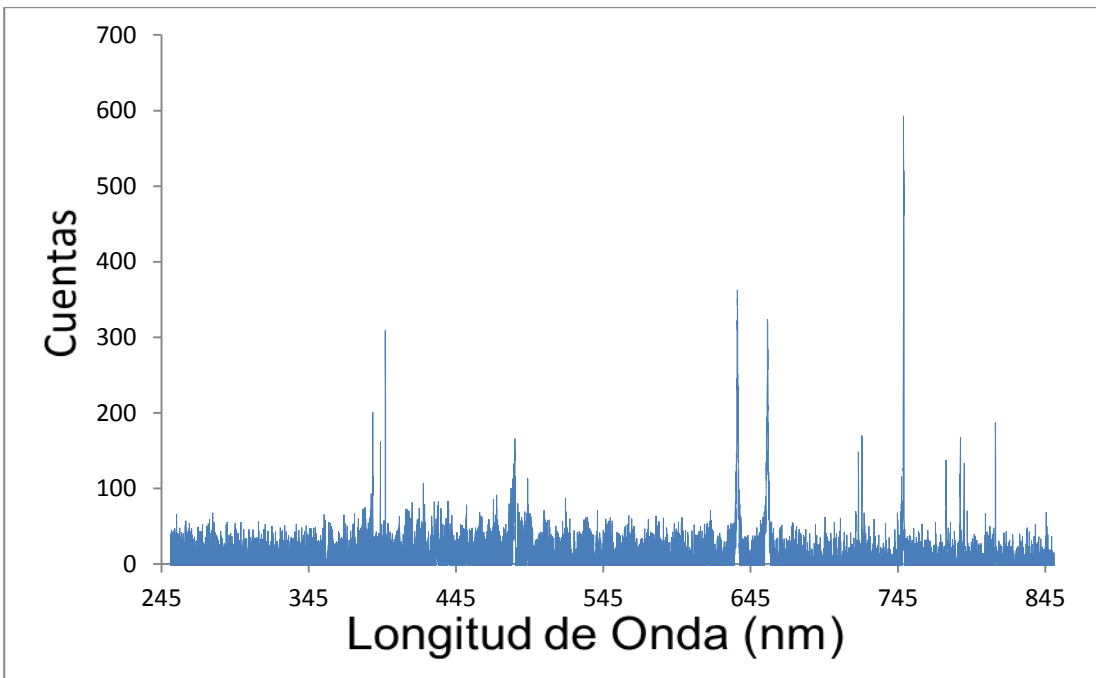


Figura 19: Espectro 19 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células con Cáncer.

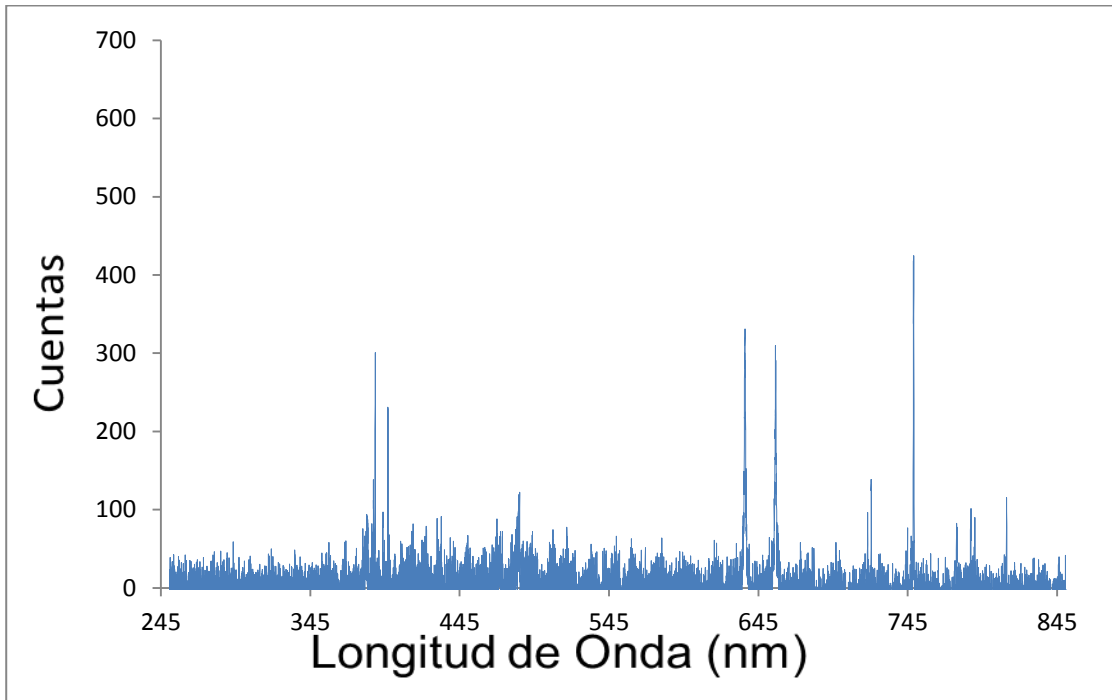


Figura 20: Espectro 20 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células con Cáncer.

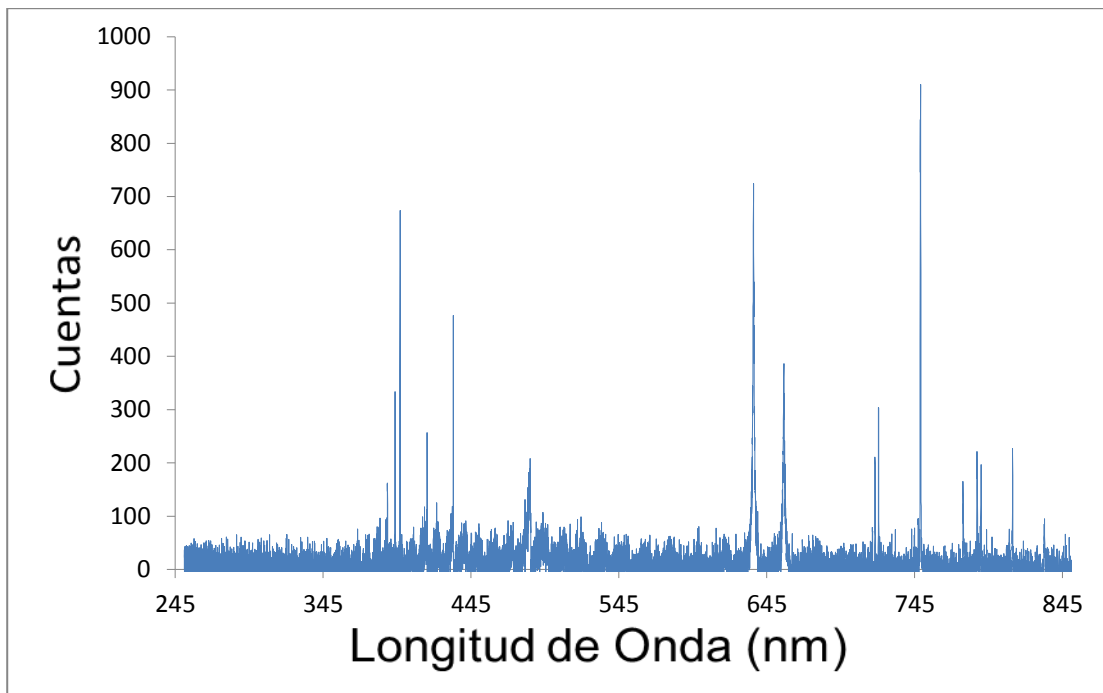


Figura 21: Espectro 1 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células Sanas.

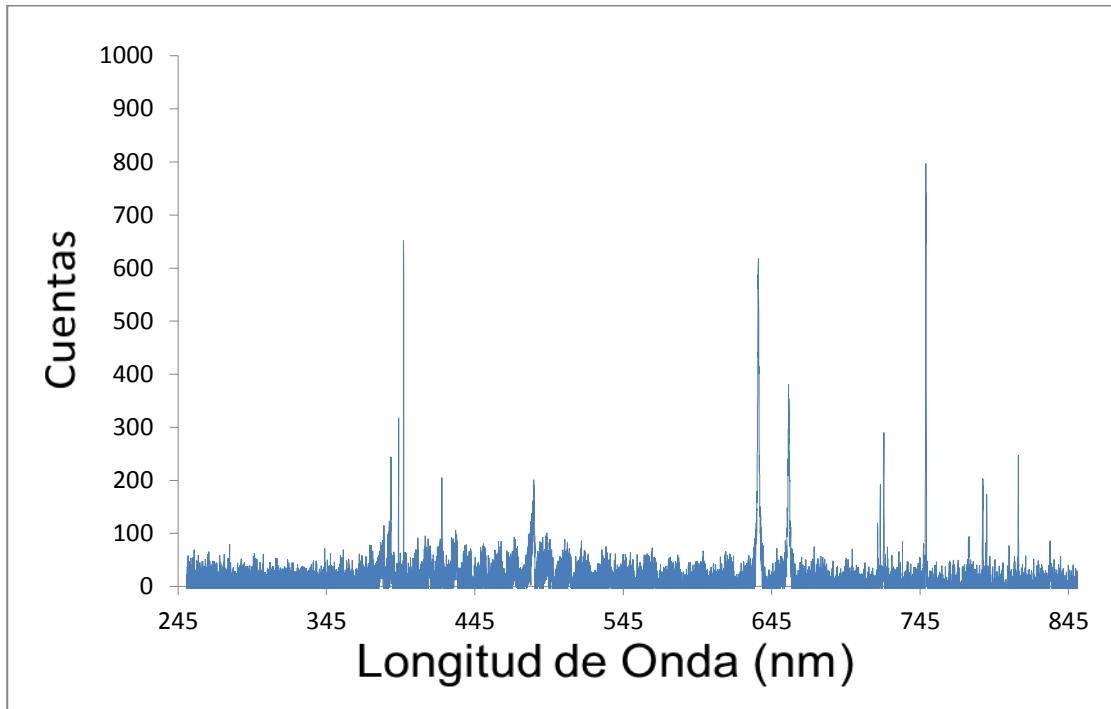


Figura 22: Espectro 2 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células con Sanas.

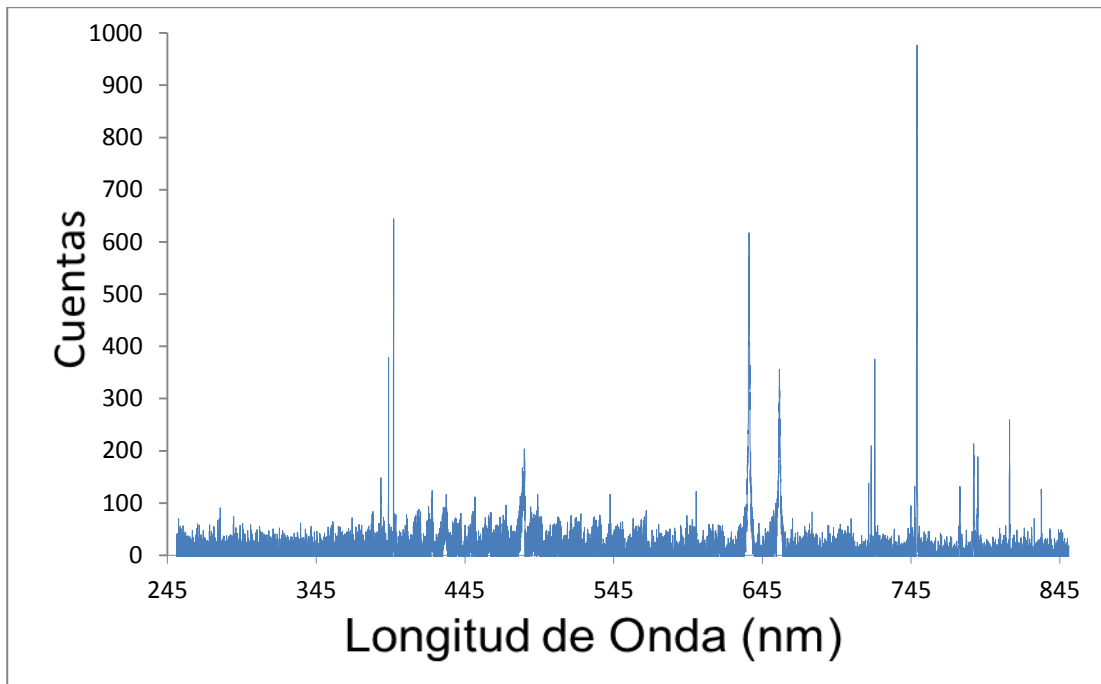


Figura 23: Espectro 3 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células Sanas.

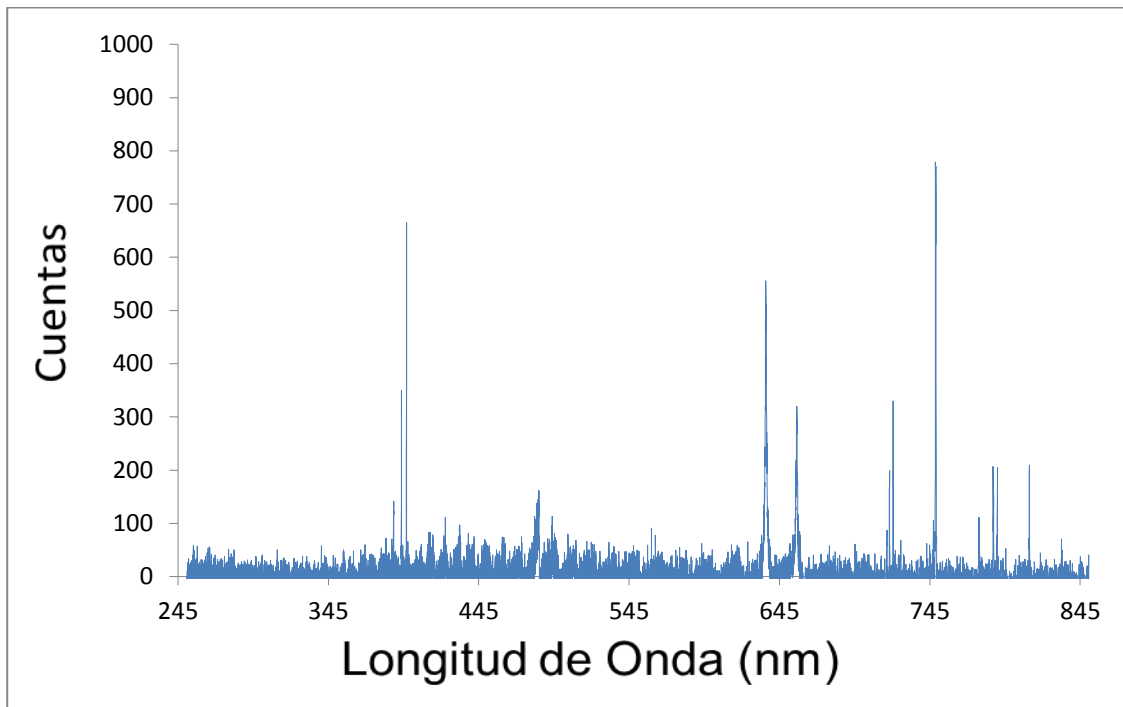


Figura 24: Espectro 4 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células Sanas.

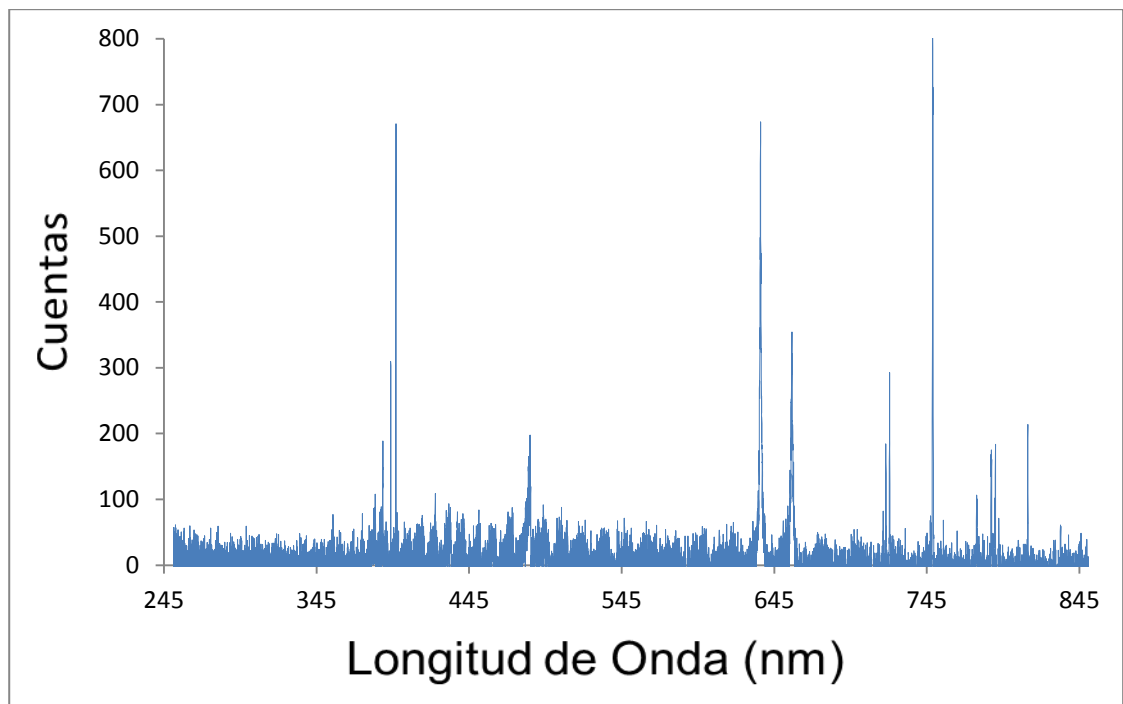


Figura 25: Espectro 5 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células Sanas.

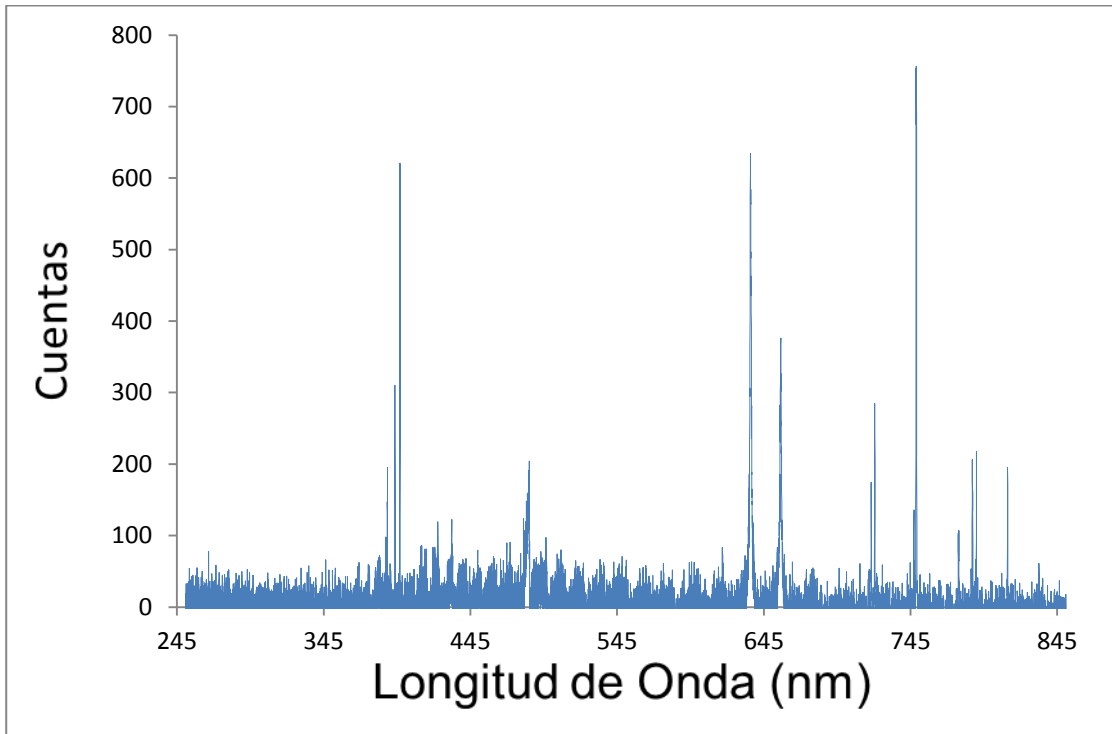


Figura 26: Espectro 6 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células Sanas.

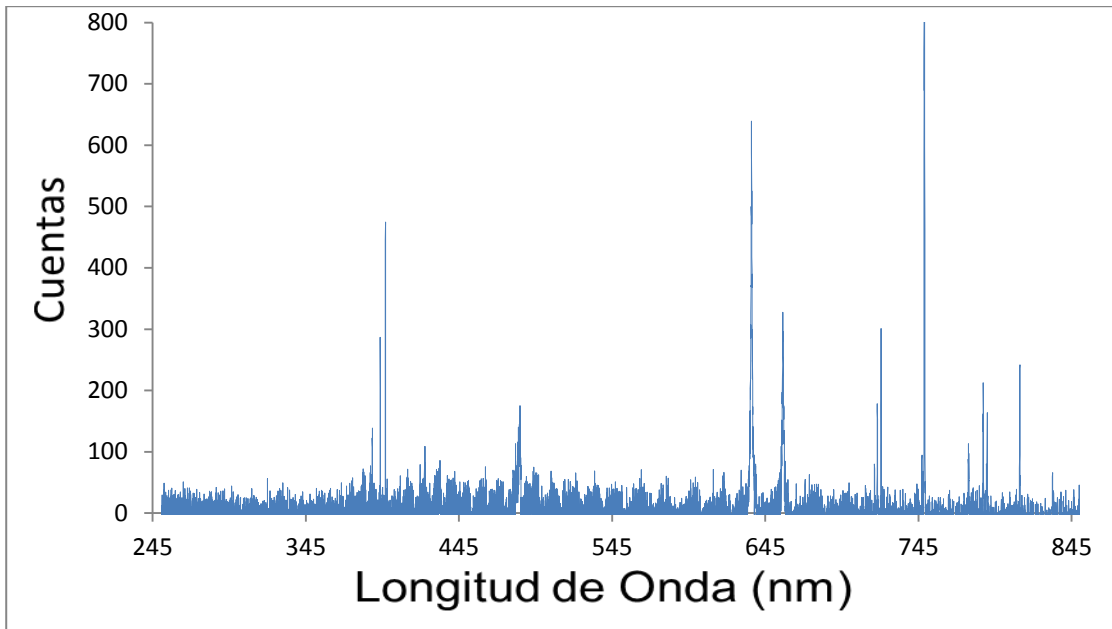


Figura 27: Espectro 7 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células Sanas.

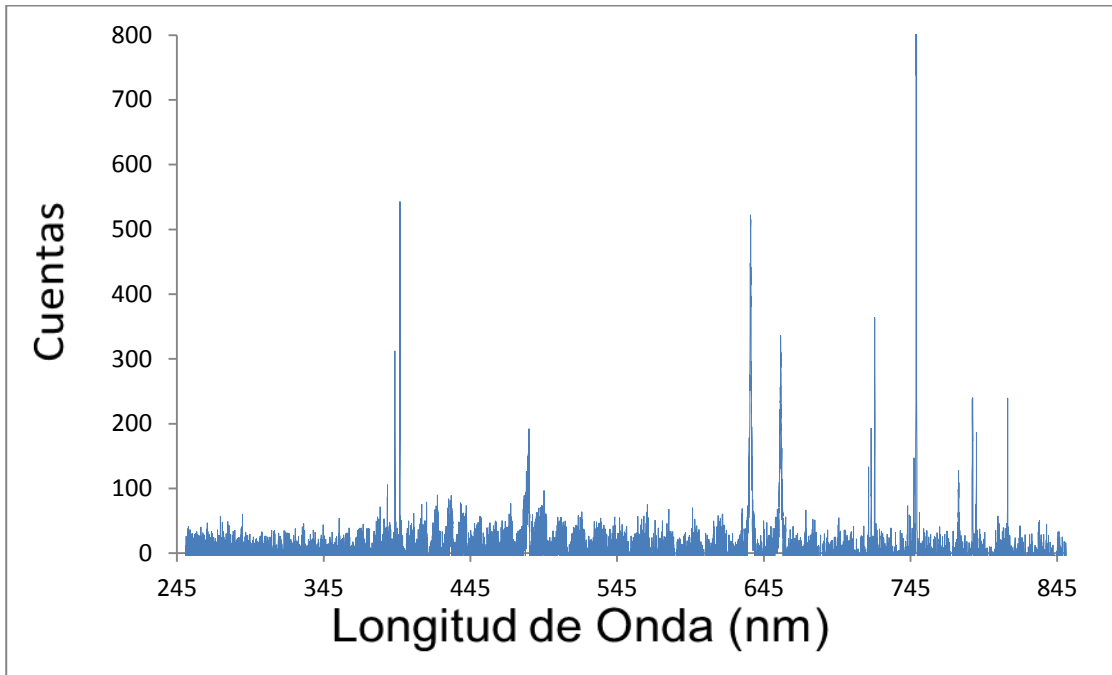


Figura 28: Espectro 8 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células Sanas.

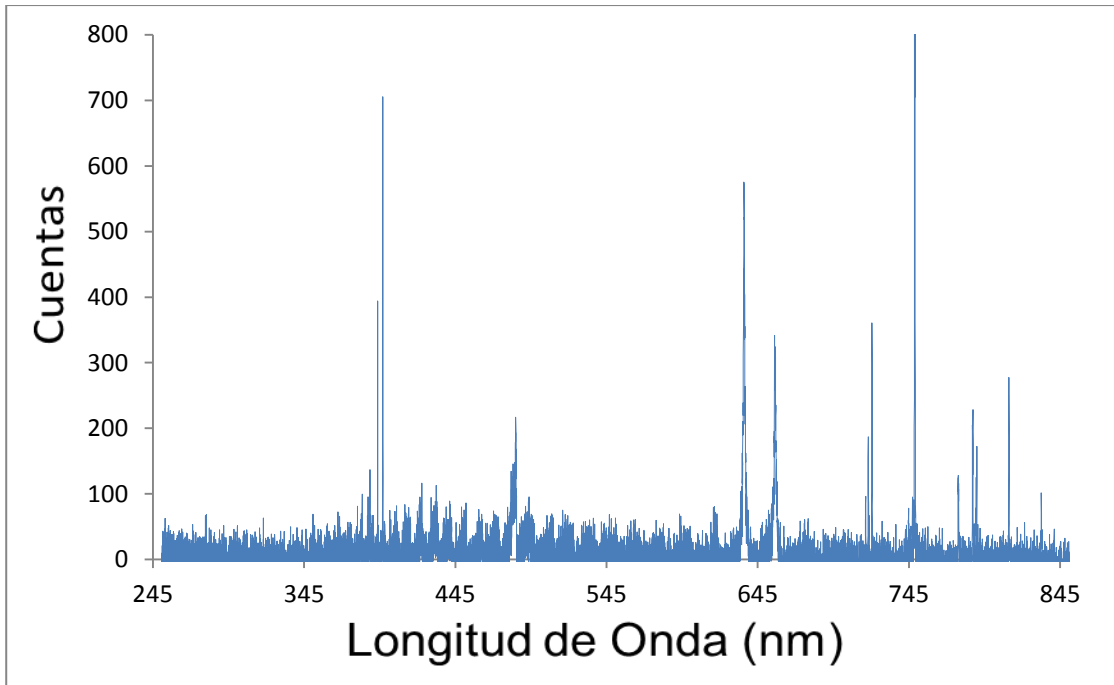


Figura 29: Espectro 9 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células Sanas.

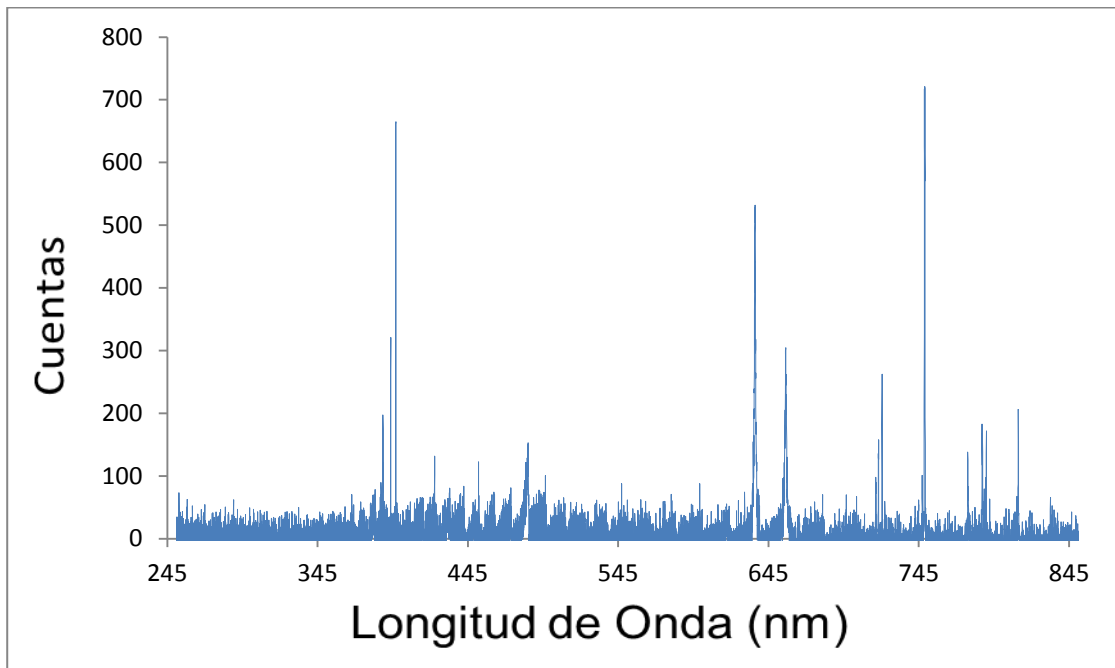


Figura 30: Espectro 10 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células Sanas.

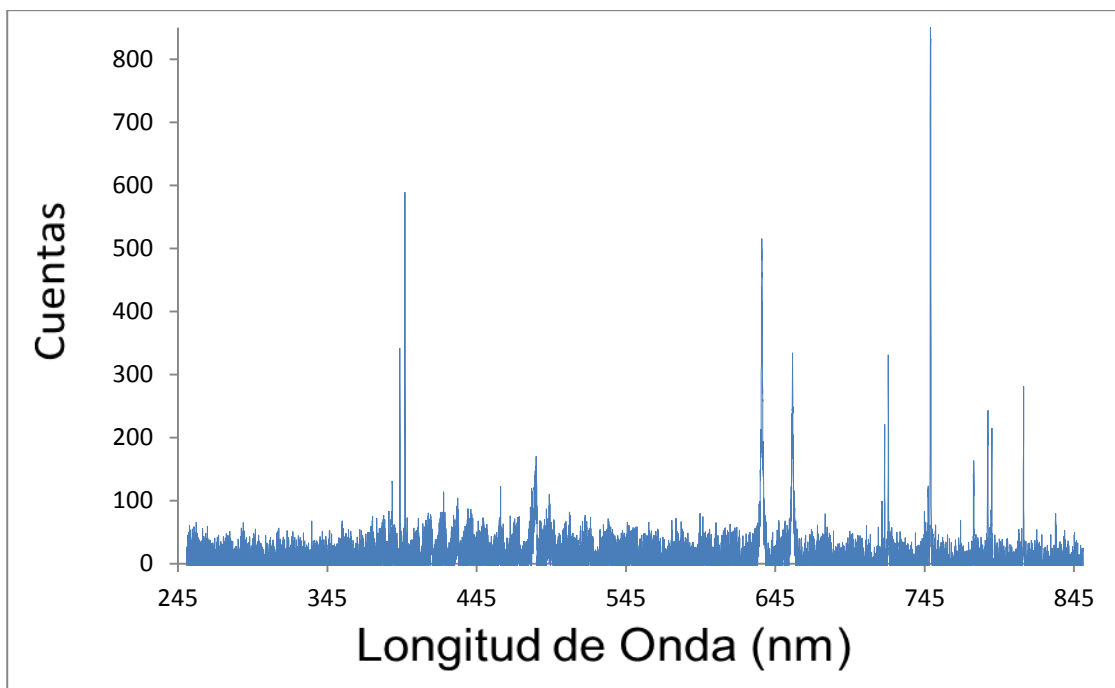


Figura 31: Espectro 11 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células Sanas.

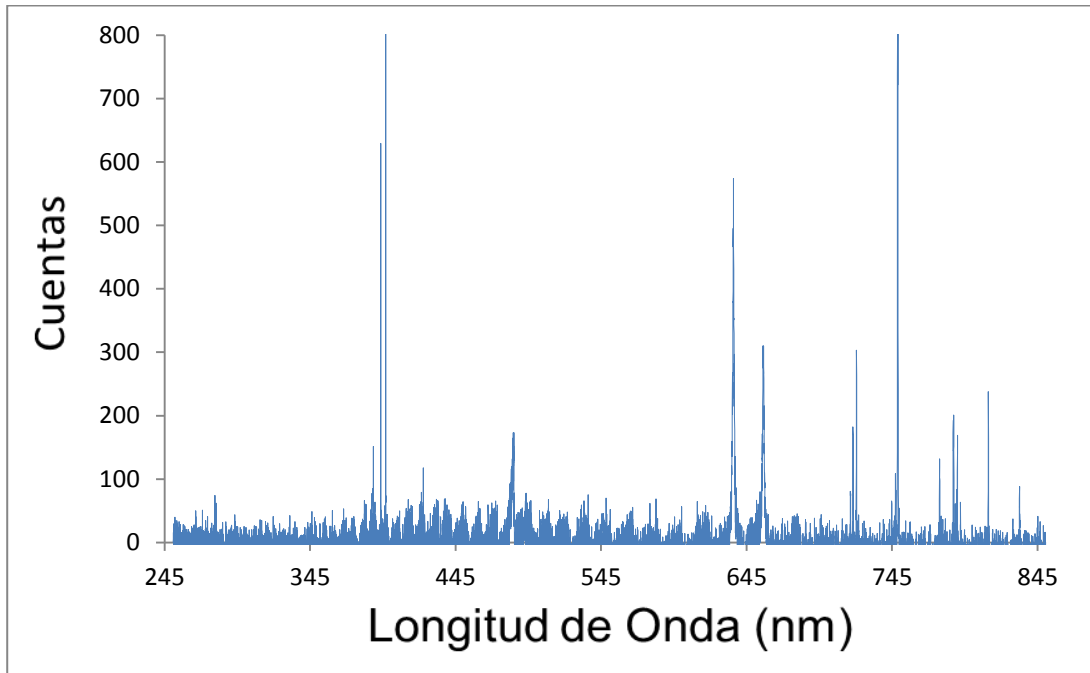


Figura 32: Espectro 12 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células Sanas.

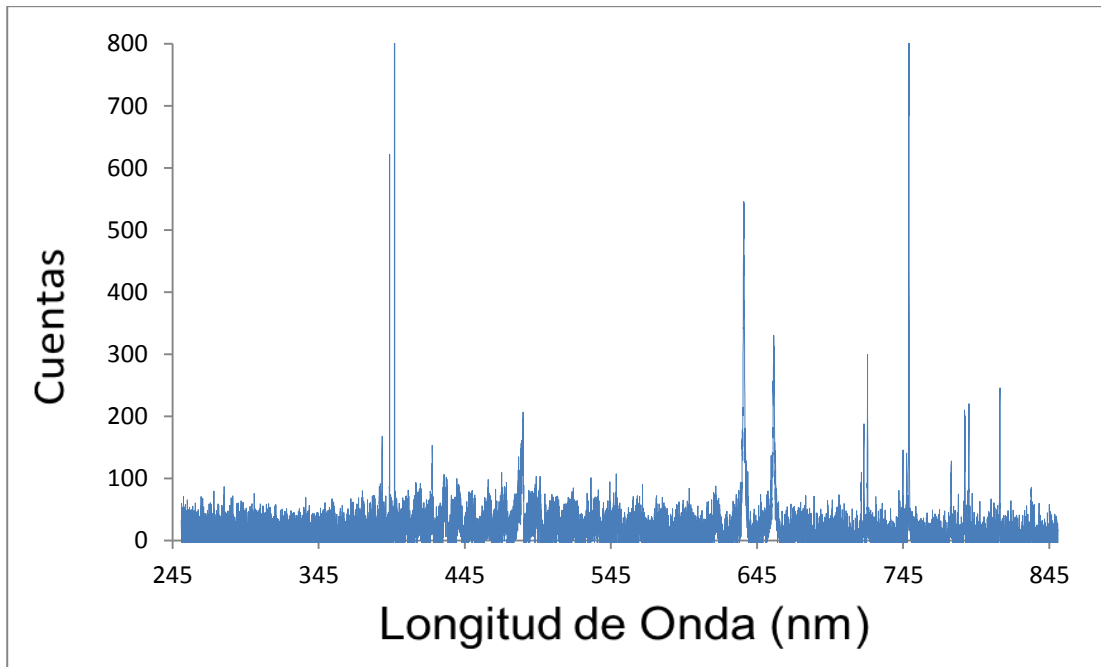


Figura 33: Espectro 13 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células Sanas.

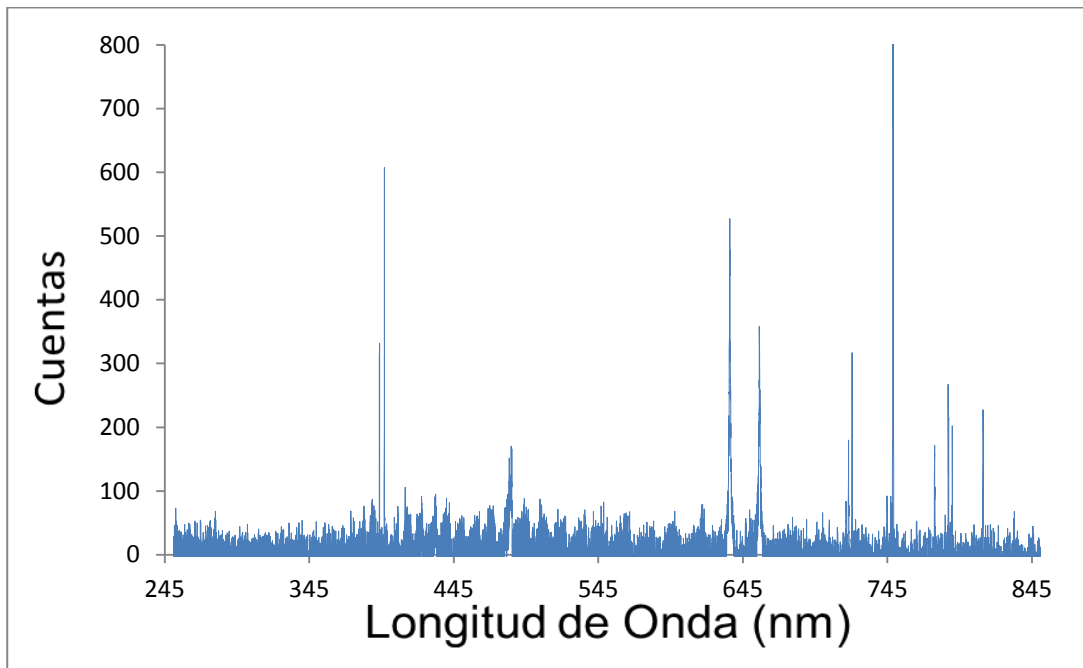


Figura 34: Espectro 15 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células Sanas.

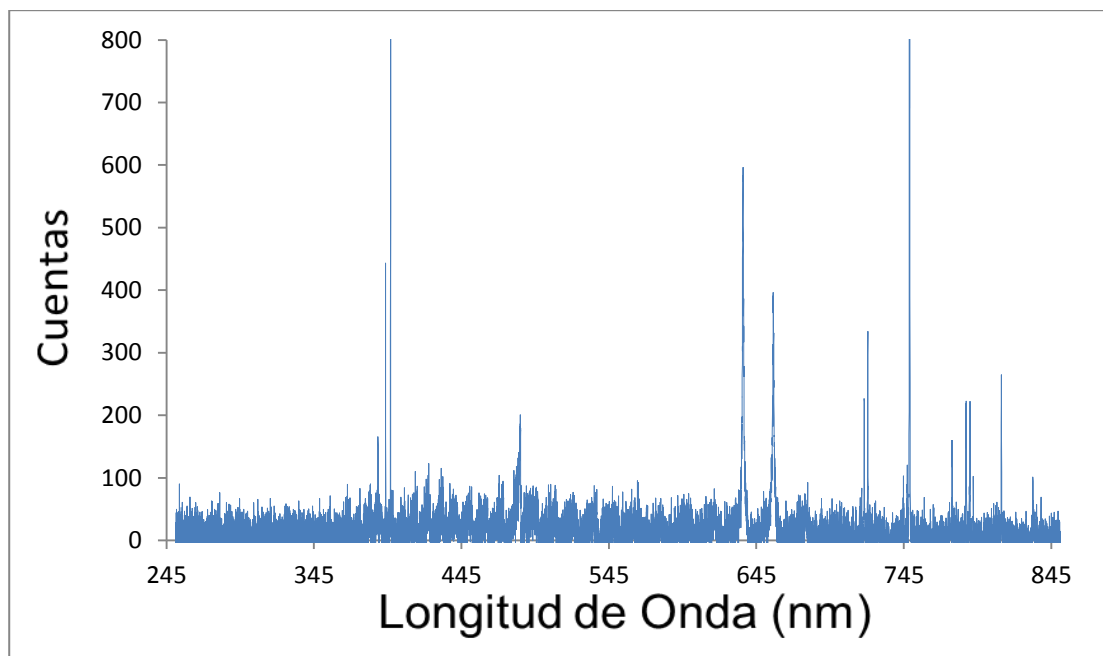


Figura 35: Espectro 16 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células Sanas.

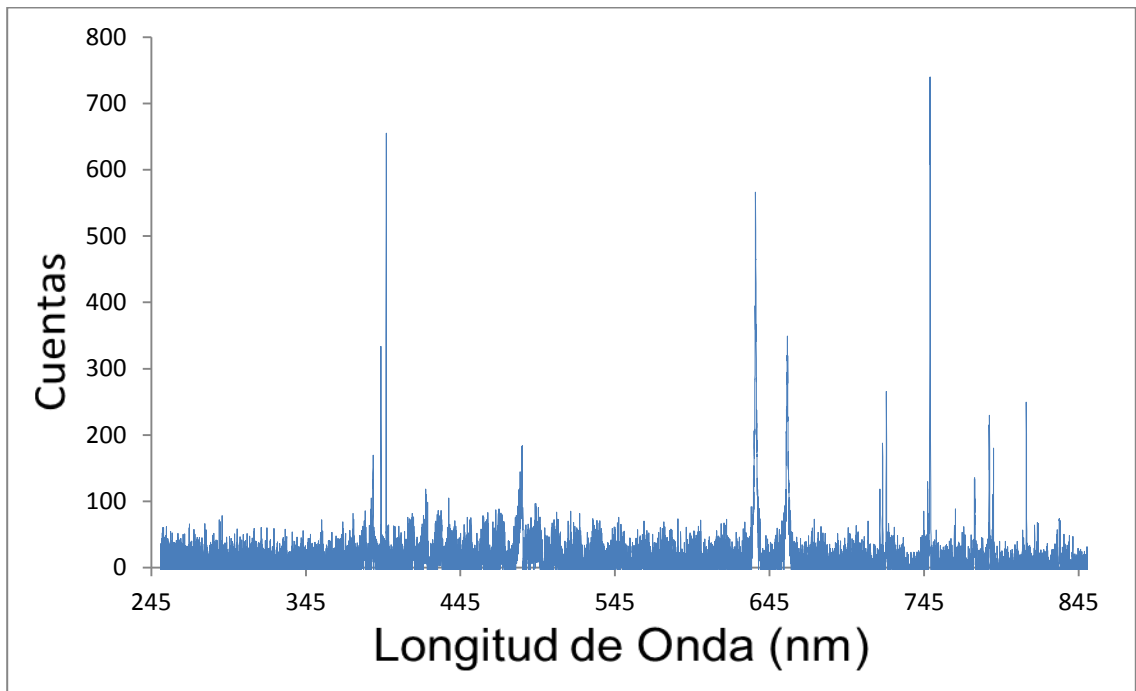


Figura 36: Espectro 17 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células Sanas.

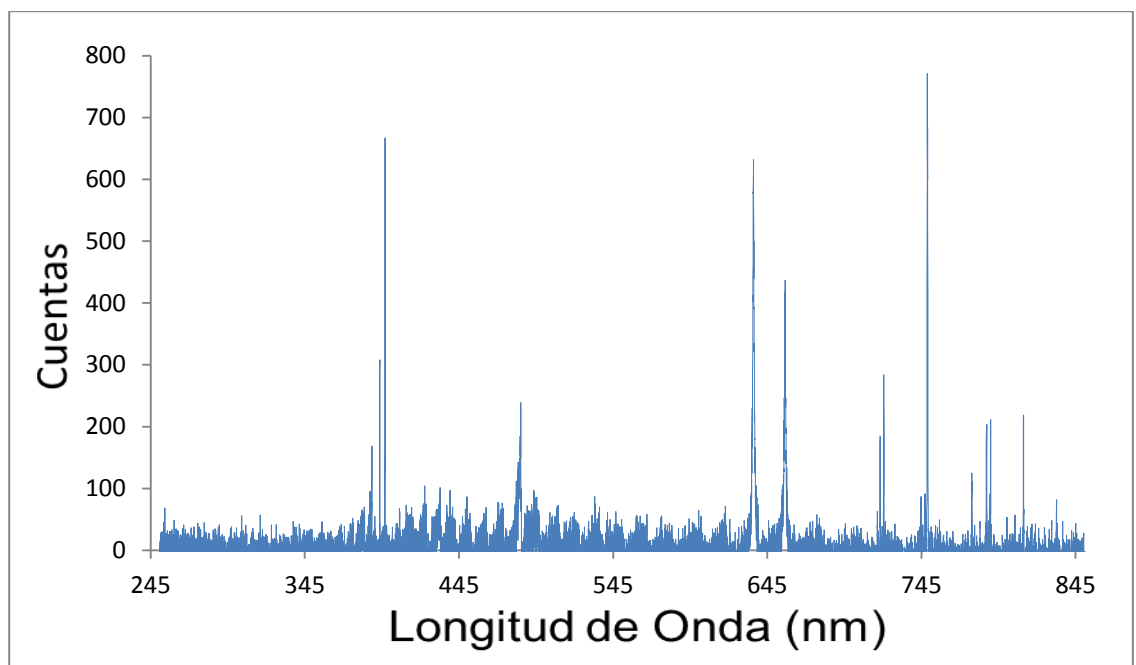


Figura 37: Espectro 18 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células con Cáncer.

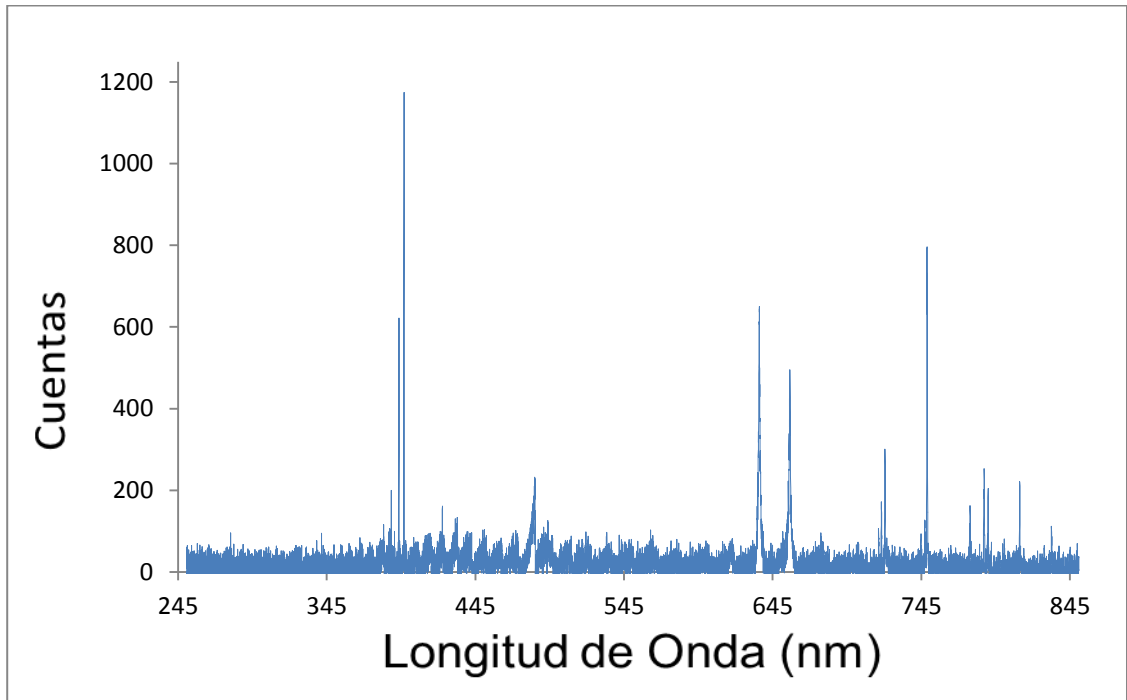


Figura 38: Espectro 19 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células Sanas.

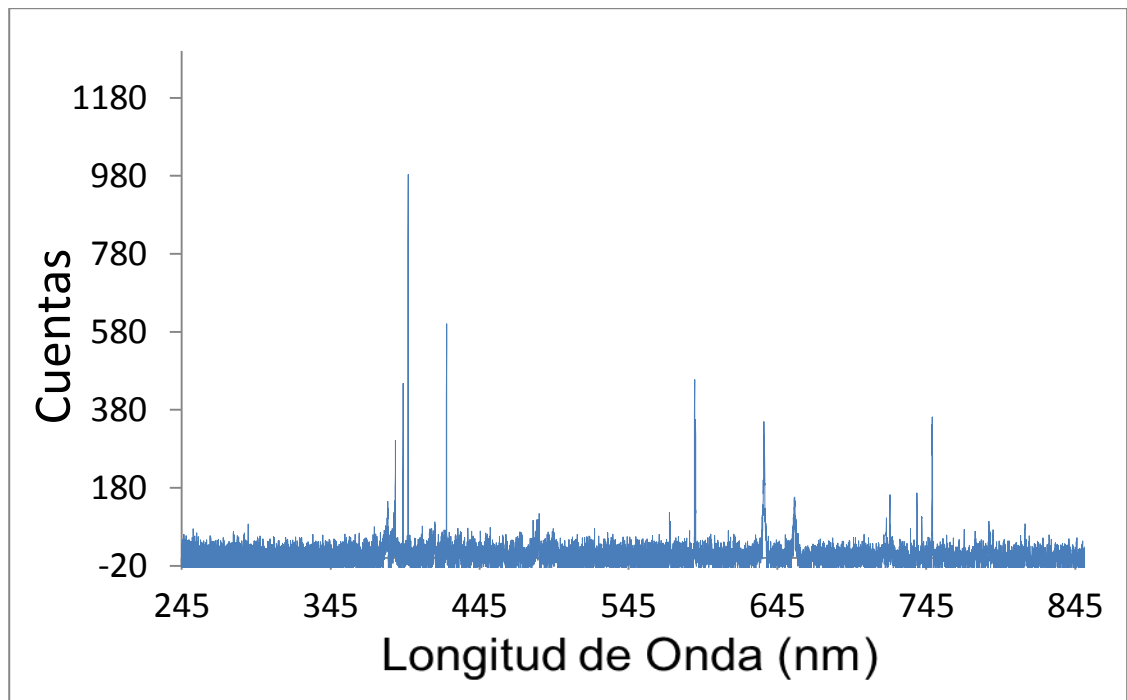


Figura 39: Espectro 20 Exéresis de Próstata con Mayor Densidad de Células Sanas.

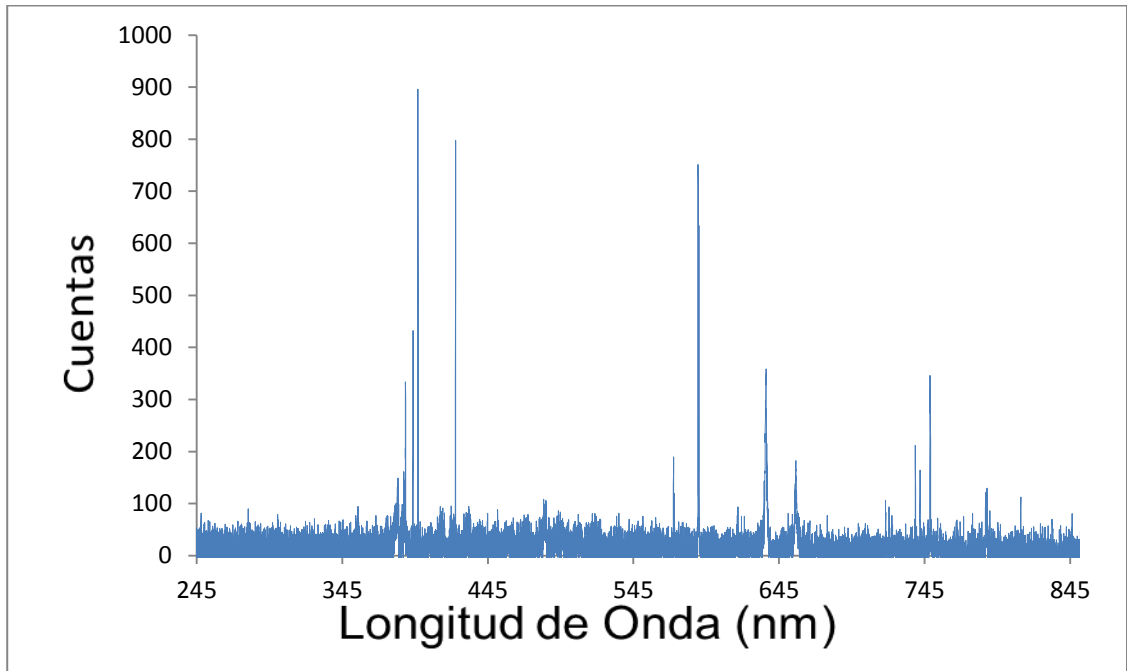


Figura 40: Espectro 2 Biopsia de Próstata

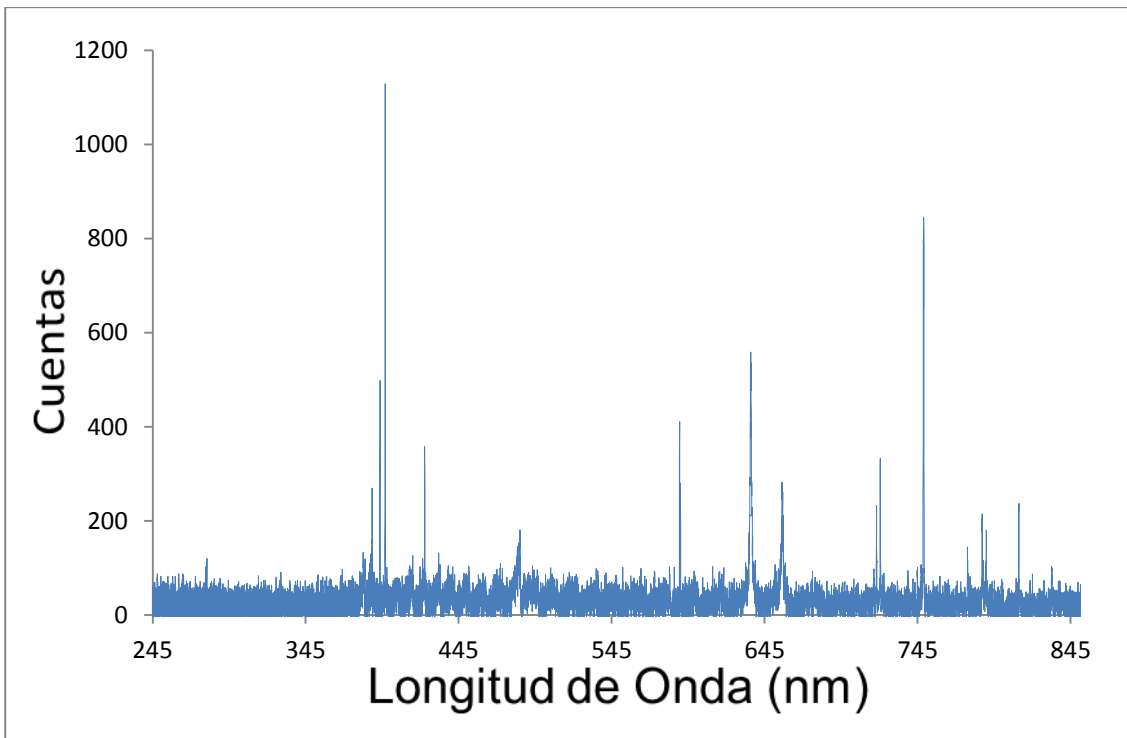


Figura 41: Espectro 3 Biopsia de Próstata.

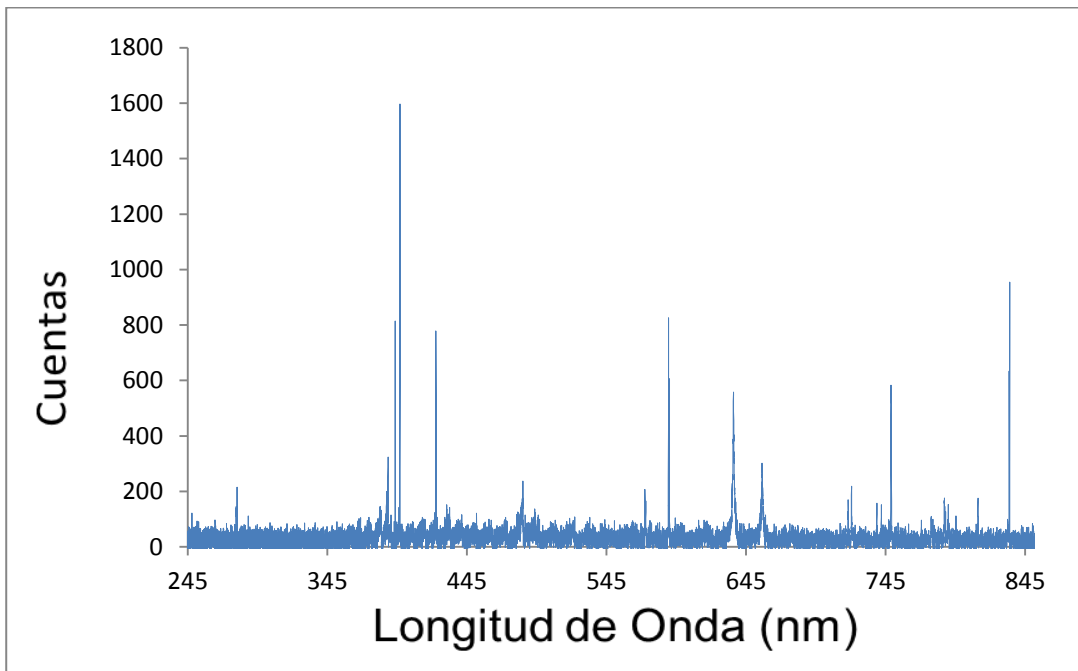


Figura 42: Espectro 4 Biopsia de Próstata.

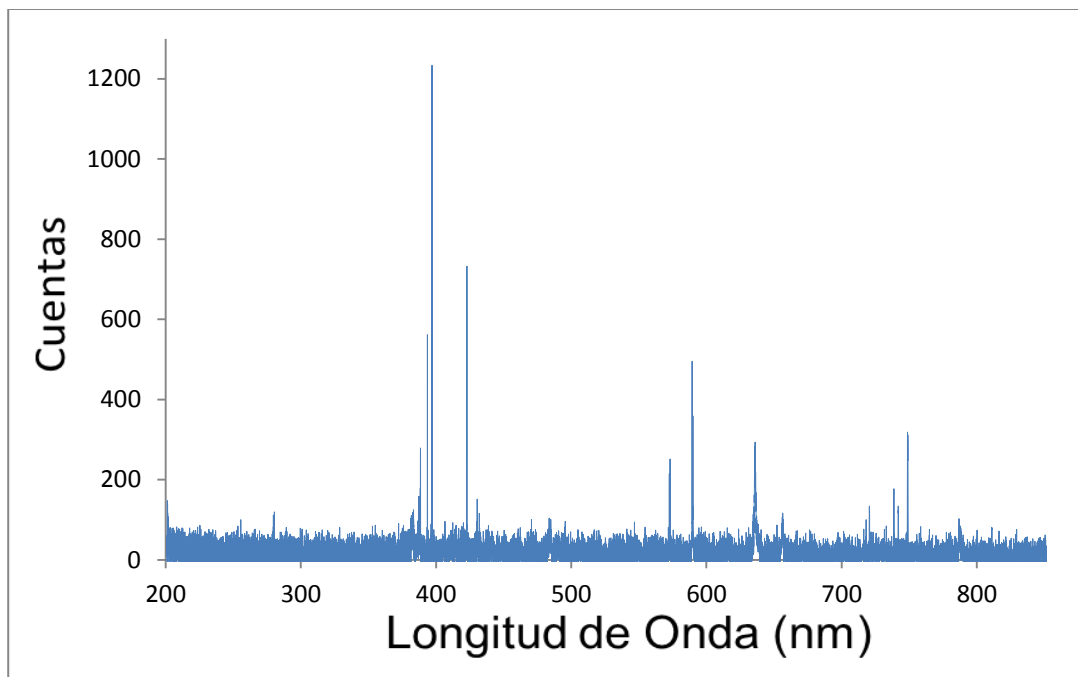


Figura 43: Espectro 5 Biopsia de Próstata.

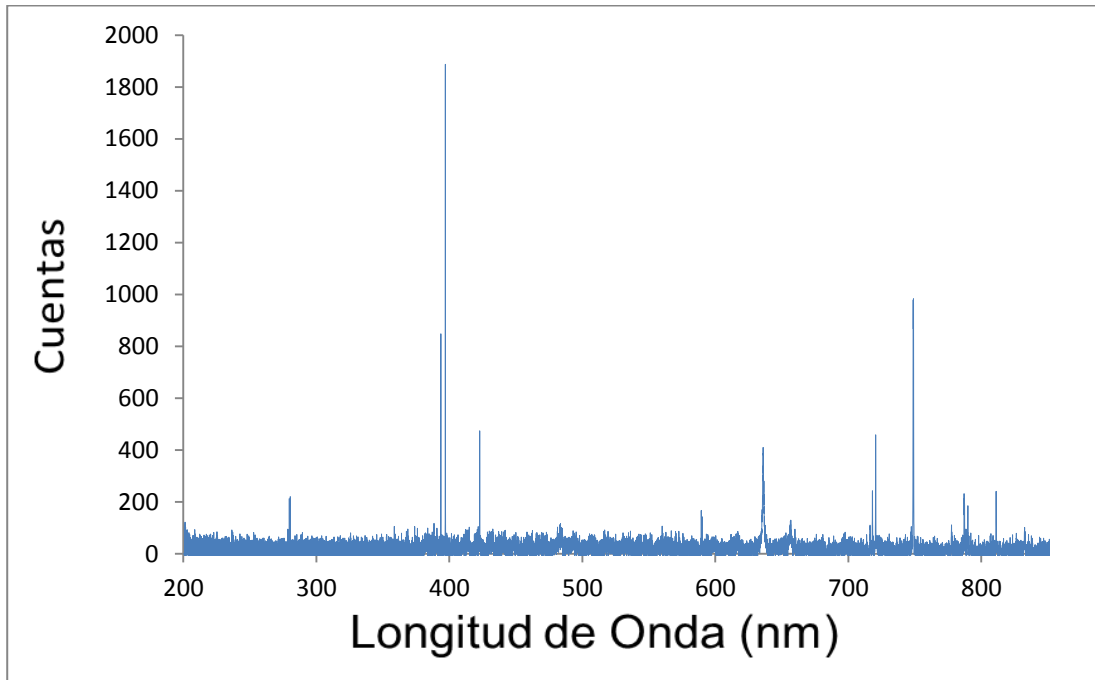


Figura 44: Espectro 6 Biopsia de Próstata.

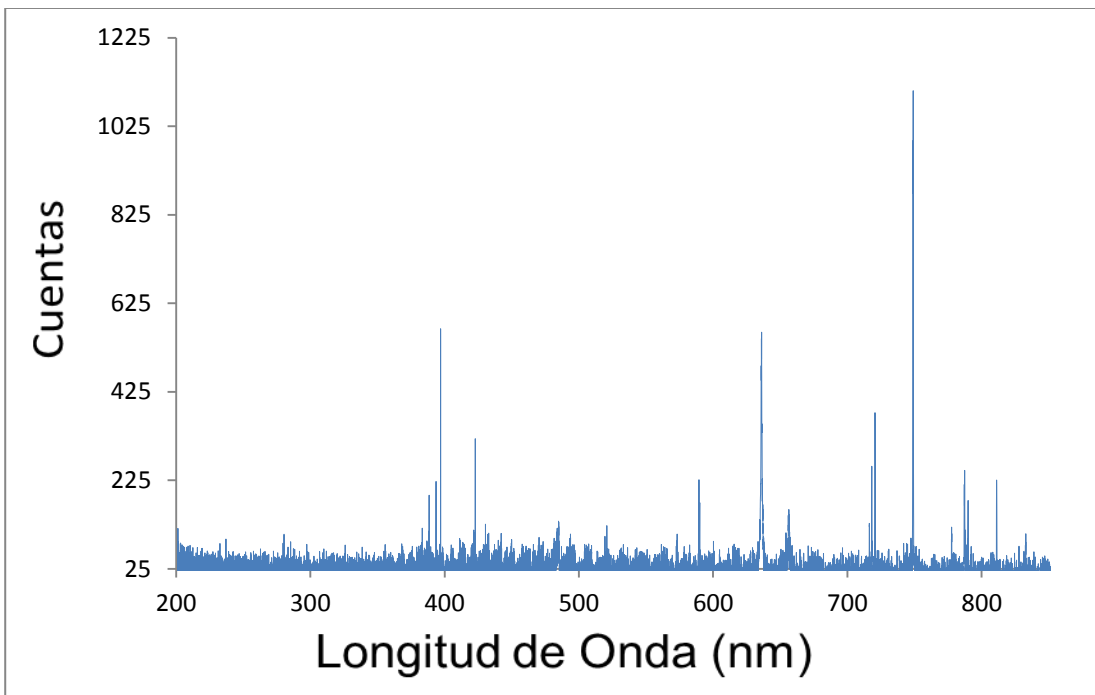


Figura 45: Espectro 7 Biopsias de Próstata.

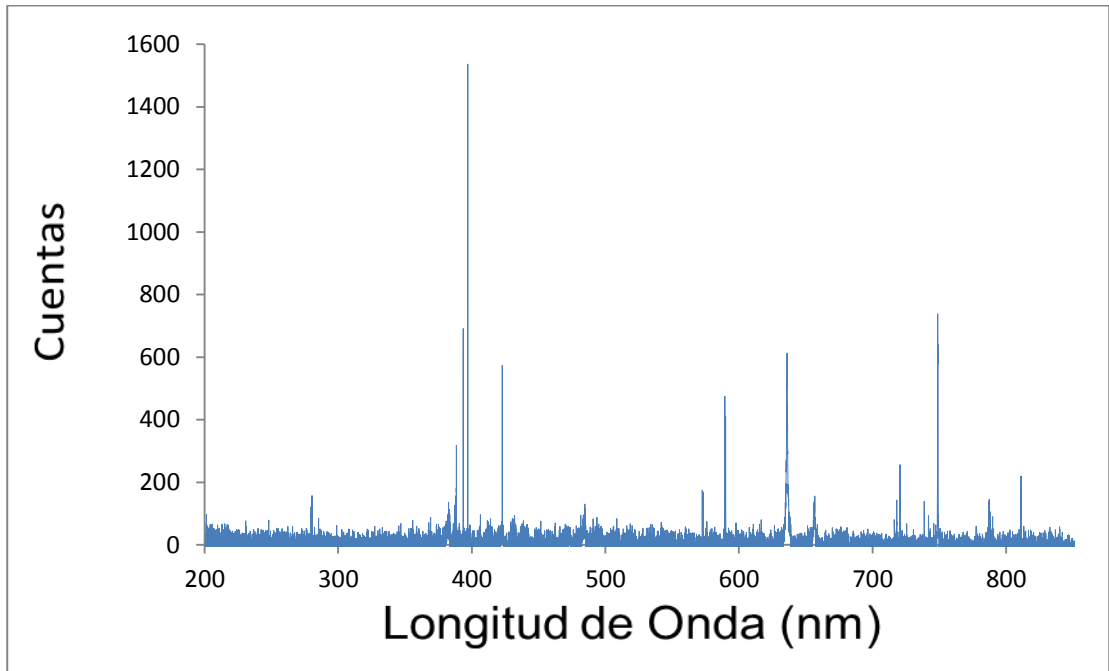


Figura 46: Espectro 8 Biopsia de Próstata.

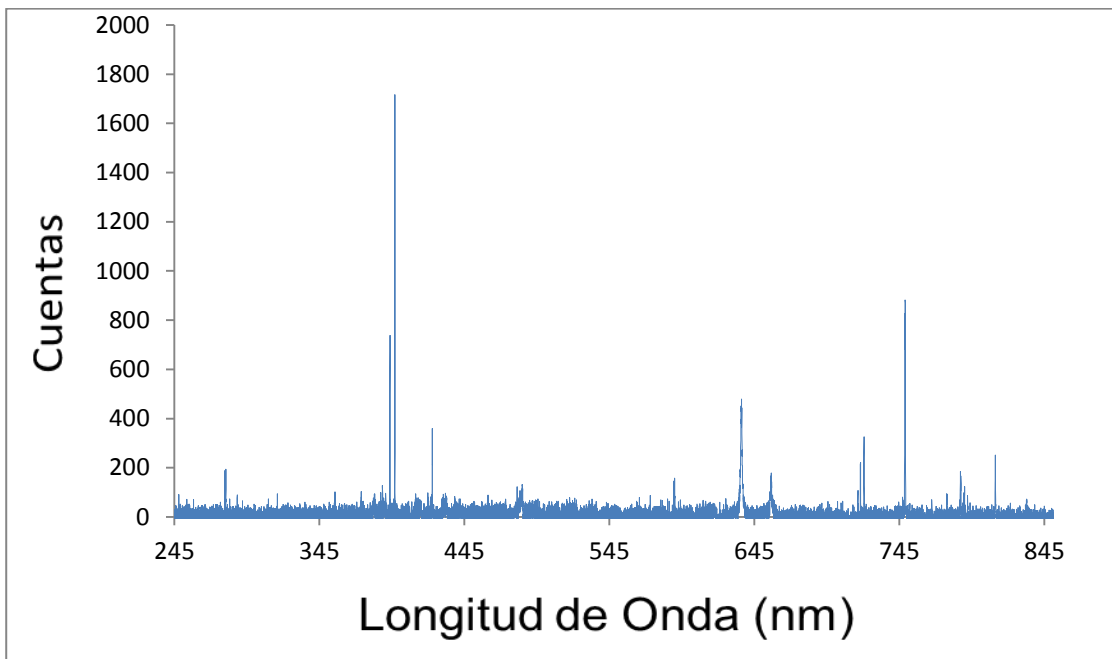


Figura 47: Espectro 9 Biopsia de Próstata.