



Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Facultad de Ingeniería

Centro de Investigación y Estudios de Posgrado

**Estudio de las propiedades mecánicas de células
cancerígenas mediante un ensayo de tensión por pinzas
ópticas duales**

T E S I S

Que para obtener el grado de:

Maestra en Ingeniería Mecánica

Presenta:

Rebeca de la Paz Díaz Santana Sainz

Asesor:

Dra. Beatriz Morales Cruzado

Co-Asesor:

Dr. Francisco Gerardo Pérez Gutiérrez

San Luis Potosí, S. L. P.

Agosto de 2017





UASLP

Universidad Autónoma
de San Luis Potosí

20 de julio de 2017

**ING. REBECA DE LA PAZ DÍAZ SANTANA SÁINZ
P R E S E N T E.**

En atención a su solicitud de Temario, presentada por los **Dres. Beatriz Morales Cruzado y Francisco Gerardo Pérez Gutiérrez**, Asesora y Co-asesor de la Tesis que desarrollará Usted, con el objeto de obtener el Grado de **Maestra en Ingeniería Mecánica**, me es grato comunicarle que en la Sesión del H. Consejo Técnico Consultivo celebrada el día 20 de julio del presente, fue aprobado el Temario propuesto:

TEMARIO:

"Estudio de propiedades mecánicas de células cancerígenas mediante un ensayo de tensión por pinzas ópticas duales"

Introducción.

1. Técnicas de medición de propiedades mecánicas de células
2. Fundamentos de pinzas ópticas
3. Implementación de pinzas ópticas holográficas
4. Ensayo de tensión de células por pinzas ópticas duales
5. Modelado matemático de ensayo de tensión de células

Conclusiones.

Referencias.

"MODOS ET CUNCTARUM RERUM MENSURAS AUDEBO"

A T E N T A M E N T E

M. I. JORGE ALBERTO PÉREZ GONZÁLEZ
DIRECTOR.

DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE INGENIERÍA
DIRECCION

Copia. Archivo.
*etn.



**FACULTAD DE
INGENIERÍA**

Av. Manuel Nava 8
Zona Universitaria • CP 78290
San Luis Potosí, S.L.P.
tel. (444) 826 2330 al39
fax (444) 826 2336
www.uaslp.mx

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE INGENIERÍA

Área de Investigación y Estudios de Posgrado

Aclaración

El presente trabajo que lleva por título:

“Estudio de las propiedades mecánicas de células cancerígenas mediante un ensayo de tensión por pinzas ópticas duales”

se realizó en el periodo enero de 2016 a agosto de 2017 bajo la dirección de la Dra. Beatriz Morales Cruzado y el Dr. Francisco Pérez Gutiérrez.

Originalidad

Por este medio aseguro que he realizado este documento de tesis para fines académicos sin ayuda indebida de terceros y sin utilizar otros medios más que los indicados.

Las referencias e información tomadas directa o indirectamente de otras fuentes se han definido en el texto como tales y se ha dado el debido crédito a las mismas.

El autor exime a la UASLP de las opiniones vertidas en este documento y asume la responsabilidad total del mismo.

Este documento no ha sido sometido como tesis a ninguna otra institución nacional o internacional en forma parcial o total.

Se autoriza a la UASLP para que divulgue este documento de Tesis para fines académicos.

Nombre y Firma del autor



Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a todas aquellas personas quienes han sufrido y sufren a causa del cáncer y a sus familias que día a día luchan por hacer su vida mejor. Todos conocemos a alguien cercano que ha padecido esta enfermedad y sabemos las dificultades que conlleva, sabemos que ver un rayito de luz en el camino significa mucho, por ello espero que este trabajo marque el principio de grandes descubrimientos, que estos pequeños pasos que se han dado y los grandes que quedan por hacer conlleven en algún momento a obtener una cura para darle una oportunidad de vida a quienes luchan con tanto esmero contra este padecimiento.

Agradecimientos

Agradezco primera e infinitamente a Dios por esta gran oportunidad, por ponerme en este camino que a veces no creí llegar a completar, por permitirme llegar a hacer algo por los demás y poner en mi vida a personas inolvidables e invaluable. El camino no ha sido fácil, pero con Él de la mano todo ha sido mejor y posible.

A la pequeña personita que tengo tanto que agradecer es a ti Emma, estos dos años que sé que no han sido fáciles para ti pero que en todo momento me demostraste el amor y me has dado el ánimo de nunca darme por vencida. A ti Emilia que espero con ansias, anhelo, amor y que has aguantado el ajetreo y estrés de estos últimos meses. A el amor de mi vida que en siempre ha creído en mí, que siempre ha estado atento y ha escuchado cada uno de mis días, siempre entendiéndome y aconsejándome, gracias Rogelio por ser mi gran roca. A mi Mami, Chula, Sara, Luis y Blanca, por apoyarme incondicionalmente en este reto, sobre todo el apoyo de estar con Emma y que yo tuviese el tiempo de dedicación a este proyecto. A mi suegro, mi suegra, Ricky y Laura, a Rafa y a ti Pa por estar siempre orgullosos de mí y creer en mí, y a toda mi familia que día a día siembra un granote de arena en mi vida.

A las personas que sin su gran labor de día a día en la investigación y en la docencia esto no sería posible. A ti Betty no tengo palabras para agradecer todo lo que has hecho por mí, aparte de ser una gran asesora de la cual aprendí muchísimo, sobre todo una gran sencillez y humildad, has sido una verdadera amiga, siempre pendiente de mí y siempre atenta y abierta a mis ocurrencias e ideas. A Erick con una gran pasión por tu trabajo y siempre disponible para ayudarme, mi gran admiración y agradecimiento. A mi co-asesor el Dr. Francisco, que es un excelente profesor, mentor y es una gran persona que siempre ha estado dispuesto a ayudarme y ha estado pendiente de mí. A ti Vane y a mis compañeros del laboratorio de Interacciones biomoleculares y cáncer del instituto de física por hacer que este proyecto fuera posible, y siempre dispuestos a explicarme y apoyarme en los experimentos.

A todos mis compañeros del laboratorio, sobre todo Nancy por los días que me dejaste adueñarme del laboratorio, todos esos días que nos desesperamos con el fantasma de las pinzas y los retos que hemos pasado, a mis compañeros de maestría, sobre todo Brenda y Robert, grandes amigos que pasamos horas y horas estudio estos 2 años, de diversión y platicas, gracias por siempre hacerme

sonreír es un honor tenerlos como amigos. A todos los profesores de la maestría por gran don y empeño de transmitir sus conocimientos y siempre disponibles para atender cualquier duda.

Y a la persona que me ayudo a levantarme cuando más lo necesite en este tiempo, con esta pequeña pero gran oración que llevare en mi corazón toda la vida. “Señor mi pasado a tu misericordia, mi presente a tu amor y mi futuro a tu providencia. Tu sabes Señor que lo único que tengo es el día de hoy para amarte y por ti, a quienes me has dado”.

Contenido

Resumen	7
Introducción	8
Objetivo General	10
Objetivos Específicos.....	10
Capítulo 1. Técnicas de medición de propiedades mecánicas de células	12
1.1 Descripción de las técnicas usuales para la medición de propiedades mecánicas de células	12
1.2 Estudio de propiedades mecánicas de células en diversas enfermedades.....	15
Conclusiones del capítulo	17
Capítulo 2. Fundamentos de pinzas ópticas.....	18
2.1 Introducción.....	18
2.2 Desarrollo y origen	18
2.3 Fundamentos	20
2.3.1 Componentes de una Pinza óptica	20
2.3.2 Atrapamiento por Pinzas Ópticas	22
2.4 Caracterización de pinzas ópticas.....	26
Conclusiones del capítulo	27
Capítulo 3. Implementación de pinzas ópticas holográficas.....	28
3.1 Introducción.....	28
3.2 Modulador espacial de Luz	28
3.3 Modulación de fase	32
3.3.1 Caracterización de MEL	32
3.4 Difracción de luz.....	35
3.4.1 Difracción de Orden Cero	41
3.5 Arreglo experimental.....	42
3.6 Calibración de pinzas ópticas	46
Conclusiones de capítulo.....	51
Capítulo 4. Ensayo de tensión de células por pinzas ópticas duales.....	53
4.1 Adhesión de partículas de poliestireno a células.....	53
4.1.1 Adhesión de partículas a Glóbulos Rojos.....	53
4.1.2 Cultivo y crecimiento de líneas celulares.....	58
4.1.3 Adherencia de partículas de poliestireno a células	59
4.2 Procedimiento de ensayo de tensión	61

4.3 Resultados	63
4.3.1 Propiedades mecánicas: Modulo de elasticidad y Coeficiente de Poisson.....	64
4.3.2 Resultados de Ensayo de Tensión Glóbulos Rojos.....	67
4.3.3 Resultados de Ensayo de Células Cancerosas.....	82
4.3.4 Resultados de constante elástica de resorte de glóbulos rojos y células	93
Conclusiones de Capítulo	97
Capítulo 5. Modelado matemático de ensayo de tensión de células.....	98
5.1 Modelo matemático de ensayo de tensión para Glóbulos Rojos	98
5.1.1 Desarrollo de modelos en <i>COMSOL multiphysics 4.2A</i>	102
5.2 Modelo matemático de ensayo de tensión para células cancerígenas	108
Conclusiones de capítulo.....	112
Conclusiones	113
Referencias	117

Lista de Figuras

Figura 1.1 Esquema de Microscopia por fuerza atómica (imagen adaptada de (Kulik, 2006)).....	13
Figura 1.2 Esquema de Estirado Óptico (imagen adaptada de (Lim, 2006)).....	14
Figura 1.3 Esquema de Pinzas Ópticas, estiramiento de célula con partícula adherida al vidrio (imagen adaptada de (Lim, 2006)).....	15
Figura 1.4 Esquema de Pinzas Ópticas con espejos Galvanométricos (imagen adaptada de (Sylvie Hénon, 1999)).....	15
Figura 2.1 Origen de Fuerzas de Gradiente y de Scattering (imagen adaptada de (Ashkin, 2000))..	19
Figura 2.2 Trampa 3D de dos haces Gaussianos (Ashkin, 2000).....	20
Figura 2.3 Comportamiento de fuerzas según la apertura numérica de objetivo de microscopio A) Objetivo de microscopio con apertura numérica pequeña B) Objetivo de microscopio de mayor apertura numérica.....	21
Figura 2.4 Esquema de Arreglo de Pinzas Ópticas.....	22
Figura 2.5 Esquema de una partícula cerca del foco del haz de láser (imagen adaptada de (Li, 2013))	23
Figura 3.1 a) Cristal Líquido Nemático, b) Cristal Líquido Nemático con Giro	30
Figura 3.2 Esquema de Cristal Líquido Ferroeléctrico	30
Figura 3.3 Esquema de elementos del MEL	31
Figura 3.4 Modulador Espacial de Luz de reflexión, modelo Leto Holoeye de cristal líquido nemático paralelo	32
Figura 3.5 Arreglo para Caracterización de MEL	33
Figura 3.6 Ejemplos de niveles de gris utilizados en la caracterización del MEL.....	33
Figura 3.7 a) Imagen de 2 los dos niveles de Gris b) Ejemplos de diferentes niveles de Gris	34
Figura 3.8 Curva de Caracterización de MEL	35
Figura 3.9 Ejemplo de difracción de luz.....	36
Figura 3.10 Propagación de un frente de onda plano que pasa a través de una rejilla $O(x,y)$ y se observa el patrón de difracción de campo lejano, λ representa la longitud de onda	37
Figura 3.11 Frente de onda $O(x,y)$ que pasa a través de una lente positiva y patrón de difracción observado a la distancia focal de la lente.....	37
Figura 3.12 Pantalla de MEL	38
Figura 3.13 Representación de Rejilla $O(x,y)$	38
Figura 3.14 Representación de transformada de Fourier de $O(x,y)$ y patrón de difracción de Fraunhofer $I'(x,y)$. Es claro que el orden cero de difracción es mucho más intenso que los otros....	39
Figura 3.15 Imagen en escala de gris de dos puntos brillantes sobre un fondo oscuro que servirán como puntos de atrapamiento en una pinza óptica holográfica.....	40
Figura 3.16 Holograma generado a partir de una imagen de 2 puntos brillantes con un fondo oscuro	41
Figura 3.17 Difracción de Orden Cero.....	41
Figura 3.18 Arreglo Experimental de POH.....	43
Figura 3.19 Lentes con caras planas encontradas (E Martín Barbosa, 2007)	44
Figura 3.20 Lentes con caras convexas encontradas (E Martín Barbosa, 2007).....	44
Figura 3.21 Posicionamiento óptimo del MEL (imagen adaptada de (E Martín Barbosa, 2007)).....	45
Figura 3.22 Posicionamiento de MEL por medio de un divisor de haz con el objetivo de tener un frente de onda plano (imagen adaptada de (E Martín Barbosa, 2007)).....	45
Figura 3.23 Regla de 100 μm	47
Figura 3.24 Gráfica de rigidez de la trampa en agua	48

Figura 3.25 Gráfica de rigidez de la trampa Medio de GR	49
Figura 3.26 Gráfica de rigidez de la trampa Medio de Celular.....	49
Figura 3.27 Gráfica de dos trampas de MEL en Medio de GR	50
Figura 3.28 Gráfica de dos trampas de MEL en Medio de Celular	51
Figura 4.1 Partículas de poliestireno adheridas a glóbulos rojos: vista de microscopio	56
Figura 4.2 Tratamiento de porta y cubre objetos.....	57
Figura 4.3 Muestra final para prueba de tensión	57
Figura 4.4 Muestra vista desde PO	58
Figura 4.5 Muestras de H1299 y c33a vista desde el microscopio	60
Figura 4.6 Muestra de H1299 vista en PO	61
Figura 4.7 Dos partículas atrapadas en el medio biológico para la calibración de POH	62
Figura 4.8 Localización de células con partículas para ensayo de tensión a) Glóbulo Rojo b) H1299	62
Figura 4.9 Acomodo de células en posición para ensayo de tensión a) Glóbulo Rojo b) H1299.....	63
Figura 4.10 Células Estiradas a) Glóbulo Rojo b) c33a.....	63
Figura 4.11 Diagrama esfuerzo deformación (imagen adaptada de (Villalba, 2017)).....	65
Figura 4.12 Modulo de Elasticidad y Coeficiente de Poisson de algunas células (Marita L. Rodriguez P. J., 2013). Descripción de técnicas: AFM: Microscopia por Fuerza Atómica, C: Compresión, MN: Micro aguja, MP: Aspiración por Micropipeta, MTC: Citometría Magnética por torsión, OT: Pinzas Ópticas, PT: Rastreo de partícula y S: Estiramiento.....	66
Figura 4.13 Gráfica de posición vs cuadro de imagen de dos GR distintos.....	69
Figura 4.14 Gráfica de posición de partícula sin GR vs posición de partícula con GR, de dos GR distintos	70
Figura 4.15 Gráfica de posición vs cuadro de imagen de GR estirado dos veces	71
Figura 4.16 Gráfica de posición de partícula sin GR vs posición de partícula con GR, GR estirado dos veces	71
Figura 4.17 Gráfica de Fuerza deformación de mismo GR estirado dos veces	72
Figura 4.18 GR no hinchado por completo	72
Figura 4.19 Gráfica de posición vs cuadro de imagen de GR no hinchado por completo.....	73
Figura 4.20 Gráfica de posición de partícula sin GR vs posición de partícula con GR de GR no hinchado por completo	73
Figura 4.21 Gráfica de Fuerza- Deformación de GR no hinchado por completo	74
Figura 4.22 Gráfica de Fuerza -Deformación de GR BetA	75
Figura 4.23 Gráfica de Fuerza -Deformación de GR BreA.....	76
Figura 4.24 Gráfica de Fuerza -Deformación de GR NanB	77
Figura 4.25 Partícula adherida en la parte frontal de la membrana del GR	77
Figura 4.26 Gráfica de esfuerzo-deformación de una liga considerando como un material hiperelástico Neo-hookeano (imagen adaptada de (Macosko, 1994)).....	77
Figura 4.27 Gráfica de Fuerza -Deformación de GR BreB	78
Figura 4.28 Gráfica de Fuerza -Deformación de GR BetD.....	78
Figura 4.29 Gráfica de Fuerza -Deformación de GR BetC.....	79
Figura 4.30 Gráfica de Fuerza -Deformación de experimento de Chuan Li et al. (Chuan Li Y. -P.-K., 2008)	79
Figura 4.31 Variación del módulo de elasticidad con respecto al radio de contacto r_c	81
Figura 4.32 Diámetro de célula H1299	83
Figura 4.33 Gráfica de Fuerza -Deformación h1299 1A	83
Figura 4.34 Gráfica de Fuerza -Deformación h1299 1B.....	84
Figura 4.35 Gráfica de Fuerza -Deformación h1299 2B	84

Figura 4.36 Gráfica de Fuerza -Deformación h1299 3B.....	85
Figura 4.37 Gráfica de Fuerza -Deformación c33a 1A.....	86
Figura 4.38 Gráfica de Fuerza -Deformación c33a 2A.....	86
Figura 4.39 Gráfica de Fuerza -Deformación c33a 3ª.....	87
Figura 4.40 Gráfica de Fuerza -Deformación c33a 4ª.....	87
Figura 4.41 Gráfica de Fuerza -Deformación c33a 1B.....	88
Figura 4.42 Gráfica de Fuerza -Deformación c33a 2B.....	89
Figura 4.43 Gráfica de Fuerza -Deformación c33a 4B.....	89
Figura 4.44 Gráfica de Fuerza -Deformación c33a 6B.....	90
Figura 4.45 Gráfica de Fuerza -Deformación c33a 5B.....	90
Figura 4.46 Gráfica de Fuerza -Deformación c33a 6B.....	91
Figura 4.47 Célula HeLa en ensayo de tensión.....	93
Figura 4.48 Gráfica de Glóbulo Rojo BetC 1 de constante elástica de resorte	94
Figura 4.49 Gráfica de Glóbulo Rojo BetA deformado dos veces a) Constante de resorte de 1er deformación b) Constante elástica de resorte de 2nda deformación	94
Figura 4.50 Gráfica de Glóbulo Rojo BreA 1 de constante elástica de resorte.....	95
Figura 4.51 Gráfica de Glóbulo Rojo NanB 2 de constante elástica de resorte.....	95
Figura 4.52 Gráfica de h1299 de constante elástica de resorte.....	96
Figura 4.53 Gráfica de c33a de constante elástica de resorte.....	97
Figura 5.1 Esquema de la estructura de la membrana del GR (imagen adaptada de (M. Dao, 2003)).....	98
Figura 5.2 Forma y dimensiones de GR (imagen adaptada de (Jeongho Kim, 2015)	99
Figura 5.3 Alargamientos principales	100
Figura 5.4 Geometría del modelo	103
Figura 5.5 Resultados de la comparación entre considerar un modelo hiperelástico con presión variable y otro sin presión variable.....	104
Figura 5.6 Interfaz de Material Hiperelástico en Comsol	104
Figura 5.7 Interfaz de Material lineal con opción de geometría no lineal.....	105
Figura 5.8 Mallado de la geometría	105
Figura 5.9 Estiramiento GR en simulación a) GR sin deformar b) GR deformado en último paso de desplazamiento	106
Figura 5.10 Curvas de esfuerzo deformación de modelo hiperelástico y de geometría no lineal... 106	
Figura 5.11 Comparativo de curva esfuerzo- deformación de modelos con datos experimentales BetA	107
Figura 5.12 Comparativo de curva esfuerzo- deformación de modelos con datos experimentales BrenB.....	107
Figura 5.13 Comparativo deformación -elongación de modelo hiperelástico con datos experimentales.....	108
Figura 5.14 Esquema de las partes principales de la célula (imagen adaptada de (Marita L. Rodriguez P. J., 2013)).....	110
Figura 5.15 Modelo de Tensegridad elástico (imagen adaptada de (Chua, 2017))	111
Figura 5.16 Estructura de tensegridad (imagen adaptada de (Chen, 2014)	111

Lista de Tablas

Tabla 4.1 Materia prima para protocolo de adherencia de partículas a Glóbulos Rojos	54
Tabla 4.2 Materia prima para protocolo de adherencia de partículas a Células.....	59
Tabla 4.3 Resultados de propiedades mecánicas, módulo de elasticidad y coeficiente Poisson de GR	81
Tabla 4.4 Resultados de propiedades mecánicas, módulo de elasticidad y coeficiente Poisson de h1299.....	85
Tabla 4.5 Resultados de propiedades mecánicas, módulo de elasticidad y coeficiente Poisson de c33a A.....	91
Tabla 4.6 Resultados de propiedades mecánicas, módulo de elasticidad y coeficiente Poisson de c33a B.....	92

Resumen

Actualmente el cáncer es una de las enfermedades que más ha atacado a la sociedad y contribuye a una de las principales causas de muerte en el mundo. El cáncer ha sido estudiado a partir de una serie de modelos biológicos, moleculares, microbiológicos y patológicos, pero hasta ahora existe muy poca investigación que abarque el estudio de las propiedades mecánicas de células con cáncer. Es sabido que en muchas enfermedades las propiedades mecánicas de células son alteradas y por ello se desencadena la enfermedad.

Los estudios realizados anteriormente han encontrado características patofisiológicas muy particulares, como que las células cancerígenas son más elásticas que las células sanas y la capacidad que tienen las células malignas y tumores para infiltrarse, invadir o metastaziar a otras partes del cuerpo en etapas avanzadas de la enfermedad (Marita L. Rodriguez P. J., Review on Cell Mechanics: Experimental and Modeling Approaches, 2013)

Se ha utilizado una serie de herramientas de la nanobiomecánica como son pinzas ópticas, microscopia por fuerza atómica, aspiración por micropipeta, pinzas magnéticas y estirador óptico, para medir las propiedades mecánicas de células cancerígenas, estas herramientas tienen algunas desventajas (Marita L. Rodriguez P. J., Review on Cell Mechanics: Experimental and Modeling Approaches, 2013). Por ello, en este trabajo se utilizan sistemas de pinzas ópticas que son herramientas esenciales en la manipulación y atrapamiento de células biológicas y en caracterizaciones biomecánicas, ya que son no destructivas, no invasivas y no hacen contacto mecánico.

En particular en este trabajo de investigación se muestra la implementación de pinzas ópticas holográficas para la medición experimental de las propiedades mecánicas, que son el módulo de elasticidad y el coeficiente de Poisson, de glóbulos rojos sanos, células cancerígenas de pulmón y células cancerígenas de cérvix. Esta herramienta utiliza un modulador espacial de luz que permite manipular dinámicamente, a manera de ensayo de tensión, dos partículas de poliestireno que se encuentran adheridas, en extremos opuestos, a la membrana de la célula, y con base a estos resultados se desarrolla un modelo de la célula que es capaz de reproducir el comportamiento mecánico de la célula ante cargas y/o deformaciones conocidas.

Introducción

El cáncer se define como una serie de enfermedades que se caracterizan por el crecimiento y propagación de células anormales a varias partes del cuerpo y que destruyen tejidos sanos (Lim, 2006). Si la propagación no es controlada puede causar la muerte. Cuando ocurre esta propagación se le llama metástasis e involucra la separación de las células desde el tumor y éstas penetran a los vasos sanguíneos para luego implantarse y crecer en tejidos normales.

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, se sabe que una de cada siete muertes es debida al cáncer. El cáncer causa aún más muertes que el SIDA, la tuberculosis y la malaria combinados. Es la segunda causa de muerte en países de mayor desarrollo económico (en primera instancia están las enfermedades cardiovasculares) y la tercera en países de medio a bajo desarrollo económicos (en primer lugar, se encuentran las enfermedades cardiovasculares seguido por enfermedades infecciosas y por parásitos). En el 2012 se reportaron 14.1 millones de casos nuevos de cáncer a nivel mundial (sin incluir casos de cáncer en la piel). (American Cancer Society. Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition., 2015)

Para el 2030 se pronostica que se llegará a los 21.7 millones de casos nuevos de cáncer y alrededor de 13 millones de muertes por cáncer debido al crecimiento de población y a la longevidad. (American Cancer Society. Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition., 2015)

No existe aún la cura para el cáncer, pero existen muchos tratamientos que en etapas muy tempranas pueden eliminarlo y en etapas más avanzadas sólo controlarlo. La mayoría de estos tratamientos (radiaciones, quimioterapia, etc.), al mismo tiempo que atacan las células malignas, también destruyen o afectan las células sanas, por esto existen efectos secundarios que son muy molestos para los pacientes. En el caso de las cirugías, puede suceder que sólo ataquen una parte de la enfermedad. La causa del cáncer es aún desconocida, sin embargo, existen factores de riesgo capaces de desencadenar esta enfermedad como es el fumar, exposición al sol, factores ambientales, abuso de alcohol, mala alimentación, entre otros.

Oncológicamente las células sanas y las malignas tienen diferentes características. Diferencias en el crecimiento, morfología, interacción célula - célula y membrana y en la estructura del citoesqueleto (Lekka 1999). Estos aspectos que diferencian a las células malignas y sanas debieron haber causado cambios en las propiedades mecánicas, muchos estudios sólo han tenido un enfoque en los aspectos biológicos, moleculares, microbiológicos, inmunológicos y patológicos en vez de su perspectiva

mecánica, la que podría tener grandes aportaciones a los tratamientos de enfermedades en especial para la cura del cáncer.

Estudios recientes en fisiopatología de un gran número de enfermedades sugieren que su etiología (origen de las enfermedades) puede ser debido a cambios en las propiedades estructurales o mecánicas, así como de la mecanotransducción de las células, que convierte el estímulo mecánico en una secuencia química a partir de la distorsión membranal (Lim, 2006). Si una célula malinterpreta una señal mecánica o se encuentra en un medio anormal, su ciclo normal se interrumpe y surge la enfermedad. (Marita L. Rodriguez P. J., 2013). Por ello la gran importancia del estudio de las propiedades mecánicas de las células. El poder conocer las características y propiedades de las células sanas y de las enfermas, para después compararlas obteniendo así las propiedades mecánicas que han sido alteradas, conllevará a la comprensión física del fenómeno, y al descubrimiento de medicamentos que ayuden a estas células a regresar a sus propiedades normales y sanarlas. En el caso del cáncer, se podría tener una detección temprana de la enfermedad, desarrollar algún tipo de medicamento que afecte sólo a las células malignas, o bien no perjudique a las sanas y entender los mecanismos físicos responsables de la metástasis para atacarlos. (O.S. Li 2008).

En este trabajo se estudiarán las propiedades mecánicas (módulo de Elasticidad y Coeficiente de Poisson) de glóbulos rojos y algunas líneas celulares con cáncer, H1299, c33a y HeLa, esto se realizará por medio de un arreglo experimental de pinzas ópticas holográficas que utiliza un modulador espacial de luz para crear trampas múltiples y dinámicas. En este caso, se crearán dos trampas que se separarán y que servirán para atrapar a dos partículas de poliestireno, que se encuentran adheridas a los extremos de la célula, y a su vez desplazar las partículas, estirar la célula y así realizar el ensayo de tensión. También se desarrollará un modelo que reproduce el comportamiento de la célula en el ensayo de tensión.

Este trabajo de tesis se divide en los siguientes capítulos:

En el primer capítulo se dan a conocer las herramientas de la biomecánica con las que se han estudiado algunas propiedades mecánicas de diferentes tipos de células, así como las ventajas y desventajas de utilizarlas. Se describe también la importancia del estudio de las propiedades mecánicas de las células, algunas enfermedades que han sido estudiadas y los beneficios que ha traído este estudio.

En el segundo capítulo se desarrolla el marco teórico necesario para comprender la interacción de la luz con la materia y los diversos medios que permiten el atrapamiento óptico, para ello se presentan el origen, los fundamentos del funcionamiento de las Pinzas Ópticas y su caracterización.

En el tercer capítulo se describe la teoría sobre las Pinzas Ópticas Holográficas (POH), su componente principal, que es el Modulador Espacial de Luz (MEL), y el concepto de difracción a partir del que se comprenderá el funcionamiento de este tipo de pinzas. Se presenta el arreglo de POH desarrollado en el laboratorio con el que se realizaron los experimentos de ensayo de tensión de las células y se describe el procedimiento para realizar el ensayo de tensión

En el cuarto capítulo se detallan las características de las células estudiadas, su cultivo y los protocolos desarrollados para la adherencia de las partículas de poliestireno a las células. En este capítulo también se presentan y discuten los resultados del ensayo de tensión de las distintas células.

En el quinto capítulo se presentan los modelos matemáticos que representan a cada célula, se da una descripción de las partes de las células, su funcionamiento y de los materiales que son utilizados en el modelo.

Por último, se presentan las conclusiones de este trabajo y el trabajo futuro que se propone realizar para continuar con esta línea de investigación.

Objetivo General

Estudiar las propiedades mecánicas de células cancerígenas y células sanas por medio de pinzas ópticas holográficas.

Objetivos Específicos

- Desarrollar un arreglo de pinzas ópticas holográficas en el laboratorio de Termofluidos de la UASLP.
- Atrapar por medio de las pinzas ópticas holográficas dos partículas de poliestireno.
- Manipular en forma separada las dos partículas de poliestireno por medio de pinzas ópticas holográficas dinámicas.
- Adherir partículas de poliestireno a células cancerígenas y células sanas.
- Deformar la célula por medio de las pinzas ópticas holográficas.

- Calcular el módulo de elasticidad de las células cancerígenas y células sanas.
- Calcular coeficiente de Poisson de las células cancerígenas y células sanas
- Comparar la rigidez de las células sanas con células enfermas.
- Desarrollar un modelo de la célula con estructuras mecánicas complejas, capaz de reproducir el comportamiento mecánico de la célula ante cargas y/o deformaciones conocidas.

Capítulo 1. Técnicas de medición de propiedades mecánicas de células

En el desarrollo del estudio de las propiedades mecánicas de las células se han utilizados diversas herramientas de la nanobiomecánica. A continuación, se mencionan algunas de estas herramientas, así como el tipo de células que se estudiaron en cada caso.

1.1 Descripción de las técnicas usuales para la medición de propiedades mecánicas de células

Microscopía de fuerza atómica: Es una técnica para detectar fuerzas del orden de nanonewtons. Es capaz de registrar la topografía de una muestra con alta resolución de imagen, mediante una punta afilada llamada cantiléver o punta de prueba (Lim, 2006). Las mediciones se pueden realizar en el medio acuoso en el que se encuentran las células. Esta herramienta permite mediciones directas de la interacción entre la punta del cantiléver y la superficie de la célula. El análisis cuantitativo de las propiedades elásticas de la célula es posible, al analizar curvas de fuerza-distancia, y de esta manera obtener la información deseada (M. Lekka, 1999). Básicamente, la punta de prueba entra en contacto con la superficie de la célula, ejerciendo una presión puntual, con una fuerza cada vez mayor, el dato de elasticidad se obtiene al hacer una relación de la fuerza ejercida con la distancia que recorre la punta, al estar en contacto con la célula (figura 1.1).

La desventaja de este método es el alto costo del equipo y consumibles necesarios, ya que la punta (cantiléver) se debe cambiar en cada prueba. Este equipo es muy delicado porque trabaja con objetos muy pequeños y frágiles que se pueden dañar fácilmente. Ningún artículo reporta que la fuerza aplicada haya sido en distintos puntos de la célula, con esto podemos concluir que en los estudios reportados las fuerzas han sido aplicadas sólo en un punto de la célula o en una región muy limitada (es muy probable debido a que no se pueden escanear áreas muy grandes con esta técnica) y esto provoca mediciones inexactas.

Algunas de las células que han sido estudiadas por esta herramienta son células con cáncer y sanas de vejiga, melanoma, próstata, mama y colon. (Malgorzata Lekka, 2012)

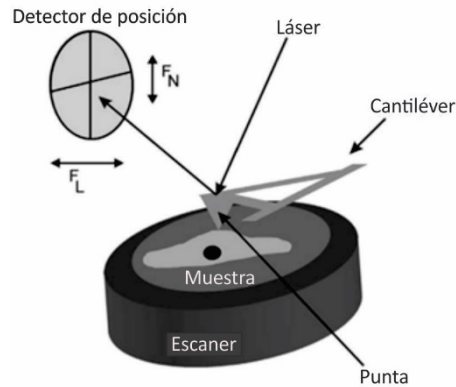


Figura 1.1 Esquema de Microscopía por fuerza atómica (imagen adaptada de (Kulik, 2006))

Estirador óptico: El estirador óptico ha sido desarrollado recientemente para el estudio de una sola célula suspendida entre dos láseres Gaussianos contra propagándose, una correcta alineación de los láseres y el perfil de intensidad del haz gaussiano permiten atrapar la célula en el centro de los haces. Cuando la luz incide sobre la superficie de la célula, por el índice de refracción de la célula habrá un cambio de momentum que produce una fuerza en el interior de la superficie de la célula, también la luz reflejada producirá otro cambio de momentum en la superficie externa de la célula, estas dos fuerza que actúan en las superficies de la célula permitirán estirar la célula al aumentar la potencia de los láseres. (Jochen Guck, 2001). (Figura 1.2)

La ventaja de esta técnica es que la fuerza se induce por toda la superficie de la célula, a diferencia de otros métodos en donde la fuerza es puntual. Las desventajas que este método tiene es que se requieren dos láseres para la deformación, estos láseres deben tener la misma longitud de onda, para que exista un atrapamiento los láseres deben de estar correctamente alineados, el índice de refracción del objeto debe ser mayor que el índice de refracción del medio y el tamaño del haz debe ser mayor que el tamaño del objeto que se atrape (Jochen Guck, 2001). En el 2005 Wottawah, *et al.* (Wottawah, 2005), utilizaron el estirador óptico para estudiar fibroblastos suspendidos, y encontraron que las células cancerígenas de ratones se deformaban 50% más que las células sanas. (Lim, 2006) Estos resultados fueron consistentes con los estudios anteriores usando succión por micropipeta y AFM. En otro estudio Lincoln *et al.* (Lincoln, 2002), utilizaron esta herramienta con células cancerígenas humanas de mama y encontraron que se estiran 5 veces más que las células sanas, y que las células metásticas se deforman dos veces más que las células no metásticas.

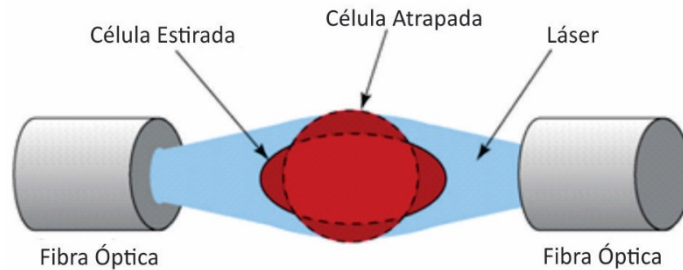


Figura 1.2 Esquema de Estirado Óptico (imagen adaptada de (Lim, 2006))

Pinzas ópticas. Hasta el momento se han reportado tres métodos que utilizan pinzas ópticas para el estudio de propiedades mecánicas de células cancerígenas.

- 1) Succión por micropipeta. Este método se ha venido utilizando en la medición de propiedades mecánicas de diferentes tipos de célula. En este método se atrapa una partícula adherida a la célula por medio de pinzas ópticas, y por medio de una micropipeta se aplica una presión negativa a la célula y la cantidad de succión dentro de la pipeta como función del tiempo se determina utilizando técnicas de video (Ward KA, 1991). Este método no es muy complicado, la gran desventaja es el control de la fuerza de succión de la micropipeta. Con esta herramienta han sido estudiados Glóbulos Rojos (GB) y fibroblastos.

- 2) Por adhesión de vidrio. Se adhieren partículas de poliestireno a la membrana de la célula, una de estas partículas se adhiere al vidrio por medio de sales y la del otro extremo se atrapa por medio de una pinza óptica que se va moviendo y de esta manera se estira la célula (figura 1.3). La desventaja de esta técnica es el movimiento browniano de las partículas que se acumulan cerca del vidrio y por lo tanto en la vecindad de célula, lo que provoca una fluctuación en las mediciones, al igual que en el método anterior, esta herramienta ha sido utilizada para estudiar GR.

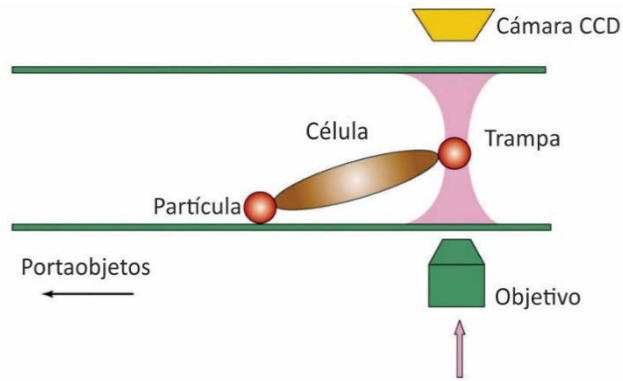


Figura 1.3 Esquema de Pinzas Ópticas, estiramiento de célula con partícula adherida al vidrio (imagen adaptada de (Lim, 2006))

- 3) Por espejos galvanométricos: Se crean dos haces de luz y se manipulan por medio de dos espejos galvanométricos que giran, estos dos puntos generados atrapan a dos partículas de poliestireno que se encuentran adheridas en dos extremos de la célula y por medio de los espejos galvanométricos es posible separar los dos haces y así estirar la célula (figura 1.4). Las células estudiadas por este método han sido glóbulos rojos (Sylvie Hénon, 1999).

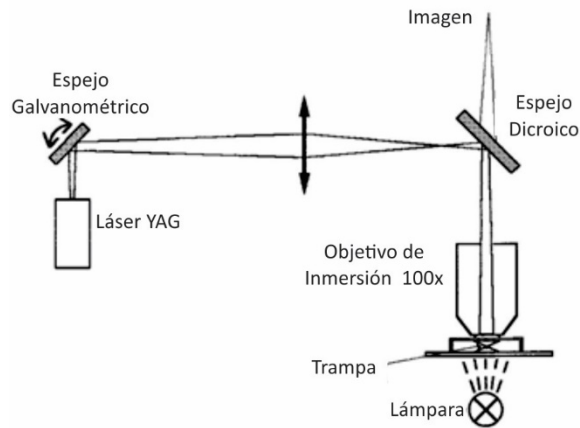


Figura 1.4 Esquema de Pinzas Ópticas con espejos Galvanométricos (imagen adaptada de (Sylvie Hénon, 1999))

1.2 Estudio de propiedades mecánicas de células en diversas enfermedades

Existen ya una serie de estudios de algunas enfermedades que se enfocan meramente en las propiedades mecánicas de las células afectadas y se han tenido descubrimientos muy prometedores.

Uno de estos casos es el estudio de la Malaria, en esta enfermedad se ocasiona una afectación a los Glóbulos Rojos (GR) debido a que son infectados por a una picadura de Mosquito Anopheles

infectado, también puede transmitirse a través de transfusiones de sangre de personas infectadas o por utilizar agujas o jeringas contaminadas.

Por medio de pinzas ópticas con aspiración por micropipeta, se estudiaron las propiedades mecánicas de los glóbulos rojos infectados y se encontró que tienen una rigidez mayor a los glóbulos rojos sanos, así como un aumento en su citoadhesión (pegajosidad) (Lim, 2006), según avanza la enfermedad estas dos características aumentan. Estos resultados demuestran la relevancia de la biomecánica en el estudio de la malaria, lo que ha ayudado a entender mejor qué ocurre en la enfermedad. Esto también ayudará en el desarrollo de nuevas estrategias de estudio para evaluar cuantitativamente el efecto de los medicamentos que se están desarrollando para prevenir o inhibir la rigidez y citoadhesión de las células.

Se tiene también el caso de Amniocentesis o bien Anemia Falciforme, que es una enfermedad hereditaria de la sangre que conlleva a problemas de circulación debido a una alteración en la estructura molecular de la hemoglobina. Los glóbulos rojos son afectados y presentan una forma semilunar anormal, también se vuelven más rígidos y pegajosos. Las propiedades mecánicas de los glóbulos rojos en esta enfermedad se han estudiado por medio de pinzas ópticas y succión por micropipeta. La característica de rigidez y pegajosidad que se encontró en los GR infectados provoca una obstrucción en las venas y no permiten que llegue oxígeno a tejidos y órganos.

Para esta enfermedad, Lim *et al.* estudiaron los efectos de la hidroxiurea, que es un medicamento anti-tumor, comúnmente usado para tratar anemia falciforme. En pacientes que han estado en tratamiento de hidroxiurea por 6 meses, se encontró que los GR afectados tienen casi las mismas características que los glóbulos rojos sanos (vuelven a tener elasticidad). (Lim, 2006)

Podemos concluir que el estudio de las propiedades mecánicas de las células en distintas enfermedades es de gran importancia y ayuda a comprender los cambios que ocurren en las células en las distintas enfermedades, al comparar células enfermas con sanas. Los cambios que ocurren en las distintas etapas de cada enfermedad ayudarán a su diagnóstico temprano, así como el estudio de las células ayudará a administrar nuevos medicamentos e indicar la eficiencia de los mismos.

En el caso de células cancerígenas, se han realizado algunos estudios midiendo las propiedades mecánicas y se ha encontrado, en algunos casos, que las células cancerígenas tienen mayor elasticidad que las células sanas de su mismo tipo. Tal es el caso del estudio de las propiedades

elásticas de células epiteliales de vejiga, en el que se encontró que las células sanas tienen un módulo de Young de un orden de magnitud mayor que el de las células cancerígenas. (M. Lekka, 1999). En otro estudio realizado en el 2005 por Wottawah et al., se encontró que los fibroblastos de ratón son 50% más deformables que los fibroblastos sanos. Lincoln *et al.* estudiaron células cancerígenas de mama y encontraron que se estiraban 5 veces más que las sanas.

Conclusiones del capítulo

En este capítulo se demuestra la afectación de la estructura celular causada por la existencia de alguna enfermedad y los beneficios que se han logrado con el estudio de las propiedades mecánicas de las células afectadas. Esto da pauta a una necesidad de estudio ardua de propiedades mecánicas de una de las enfermedades más comunes y que más ha afectado a la sociedad, que es el cáncer.

No existe, en la literatura consultada, un estudio muy amplio de las propiedades mecánicas de células cancerígenas, y las herramientas utilizadas en los pocos estudios que hay tienen deficiencias importantes. Por lo tanto, en la presente tesis se propone una nueva herramienta que permite un estudio más eficiente de esta enfermedad, que son las pinzas ópticas holográficas. En los siguientes capítulos se demuestra el desarrollo de esta herramienta y los resultados que se han obtenido en el estudio de distintas células.

Capítulo 2. Fundamentos de pinzas ópticas

2.1 Introducción

Las pinzas ópticas (PO) utilizan la luz para atrapar y manipular objetos microscópicos mediante la presión de radiación de un haz fuertemente enfocado y el cambio de momentum asociado a la refracción de los fotones. La fuerza aplicada sobre una partícula microscópica depende linealmente de su desplazamiento desde el centro de la trampa como ocurre con un sistema de resorte simple y su magnitud es del orden de nanoNewtons, por lo que los desplazamientos van desde decenas de nanómetros hasta decenas de micrómetros.

Las PO se han convertido en una herramienta muy versátil y utilizada en un sinnúmero de aplicaciones en distintos campos de investigación, especialmente han sido esenciales en la manipulación y atrapamiento de células biológicas y en caracterizaciones biomecánicas. Algunas ventajas que ofrece esta herramienta son la manipulación de partículas de micro y nano escalas, no requiere el contacto directo con el objeto para su manipulación y permite trabajar en medios líquidos. (Hu Zhang, 2006).

Es importante conocer el origen, principio y desarrollo que han tenido las Pinzas Ópticas (PO), debido a que en el siguiente capítulo se darán a conocer las Pinzas Ópticas Holográficas (POH), que será la herramienta con la que se trabajará en la experimentación, son una modificación de las POI, pero parten del mismo principio.

2.2 Desarrollo y origen

La presión de radiación se dedujo teóricamente por James C. Maxwell en 1873 basada en la teoría de presión de radiación del campo electromagnético, de la que escribió: *“En un medio en el que las ondas se propagan, existe una presión de radiación en dirección normal a la onda, numéricamente igual a la energía por unidad de volumen”* (Miles J. Padgett, 2010). En 1876 Bartoli llega a la misma conclusión que Maxwell, pero en un contexto de termodinámica, a dicha presión de radiación se le llamo la fuerza de Maxwell-Bartoli.

Anteriormente ya se conocía que la luz ejercía una presión sobre la materia cuando Kepler en 1619 sugirió que un flujo de partículas provenientes del sol causaban la desviación de la cola de un cometa, la que siempre apunta en dirección opuesta al sol (Hetch, 2002), más tarde en 1746 Euler trata de explicar teóricamente las fuerzas de presión de un haz de luz, al suponer una onda de luz

como oscilaciones longitudinales (Lebedev, 1901).

Se realizaron algunos intentos experimentales para observar la presión de radiación, pero éstos fueron obstaculizados por los efectos térmicos y no fue hasta 1901 que la teoría de Maxwell fue comprobada experimentalmente por Lebedev, y Nicolas y Hull, detectando la presión de radiación en objetos macroscópicos y gases absorbentes, el fenómeno fue considerado como existente pero no muy útil hasta la creación del láser por Charles H. Townes en 1960.

Una década después de la construcción del primer láser, Arthur Ashkin, quien es considerado el pionero en la manipulación y atrapamiento óptico, realizó sus primeros experimentos estudiando las fuerzas de presión de radiación de un haz de láser enfocado para mover y atrapar partículas transparentes de tamaños micrométricos. Se identificaron dos tipos de fuerza, la fuerza de scattering (presión de radiación) y la fuerza de gradiente, a partir de tener una esfera de índice de refracción alto colocado cerca del eje de un haz Gaussiano. Considerando que existen un par de rayos a y b (como se muestra en la figura) que inciden de manera simétrica sobre la esfera, y cuando son refractados, dan lugar a fuerzas F_a y F_b en la dirección del cambio de momentum, se puede observar que la fuerza F_a es mayor que la fuerza F_b . Considerando los rayos que atraviesan a la esfera, se puede descomponer la fuerza total, en la fuerza de dispersión o de scattering F_{scat} , que es la fuerza que encontramos en dirección de propagación de la luz, y la fuerza de gradiente F_{grad} que es la fuerza que surge transversalmente hacia la región de mayor intensidad.

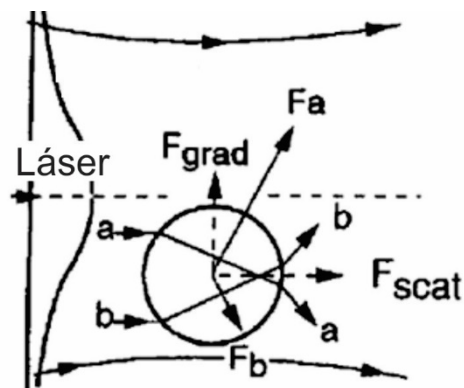


Figura 2.1 Origen de Fuerzas de Gradiente y de Scattering (imagen adaptada de (Ashkin, 2000))

Para ese tiempo no se sabía que se podían crear trampas tridimensionales estables las que tienen un equilibrio en un punto en el espacio. Más tarde Ashkin desarrolló una trampa que involucraba 2 haces Gaussianos encontrados (Figura 2.2) y enfocados en los puntos a y b , en donde la partícula es

empujada a un punto de equilibrio E donde las fuerzas de dispersión o de scattering de ambos haces se cancelan (Ashkin, 2000).

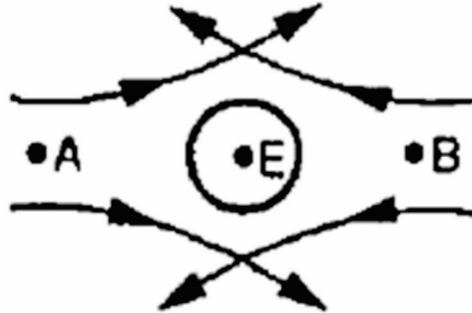


Figura 2.2 Trampa 3D de dos haces Gaussianos (Ashkin, 2000)

Años más tarde, en 1986, Ashkin logró levitar gotas de aceite y microesferas de vidrio en el aire y en el vacío. A partir de entonces, se han construido trampas estables de partículas dieléctricas con gradientes de fuerza de un haz de luz fuertemente enfocado y la técnica se ha utilizado para atrapar y manipular virus y bacterias. (Li, 2013)

2.3 Fundamentos

2.3.1 Componentes de una Pinza óptica

Para comprender los fundamentos del atrapamiento de las PO es importante conocer los principales componentes en un arreglo óptico que influyen en el atrapamiento.

Láser

El láser utilizado en una PO, debe ser un láser con gran estabilidad en potencia, comúnmente en las PO se utilizan láseres de haz Gaussiano debido a que su enfoque favorece a la fuerza de gradiente y así se produce una trampa eficiente (Miles J. Padgett, 2010). Las demás características del láser (potencia, longitud de onda) dependerán directamente de la aplicación de las PO.

Objetivo de Microscopio

Uno de los elementos de mayor importancia en un arreglo de PO es el objetivo de microscopio, que permite enfocar el láser, el tipo de objetivo que se elija determina la eficiencia del atrapamiento. Existen dos variantes que delimitarán la profundidad a la que puede ocurrir el atrapamiento que son la distancia de trabajo del objetivo y el tipo de inmersión ya sea de aceite, agua o glicerol. La

aberración esférica que pueda existir en la trampa dependerá del medio en el que se trabaja y el tipo de inmersión del objetivo. Otra característica importante es la apertura numérica del objetivo de microscopio, que se define por:

$$NA = n \sin \theta, \quad (2.1)$$

donde n es el índice de refracción del medio donde se encuentra el objetivo de microscopio y θ es la mitad del ángulo máximo de la apertura, básicamente la apertura numérica indica la capacidad de recepción de luz y la resolución del objetivo de microscopio, entre mayor sea la apertura numérica, la imagen formada será de mejor calidad y favorecerá el atrapamiento. Al utilizar una apertura numérica de objetivo pequeña la partícula se desplazará fuera de la trampa, cuando la apertura es mayor la partícula es atraída hacia la trampa. (Figura 2.3)

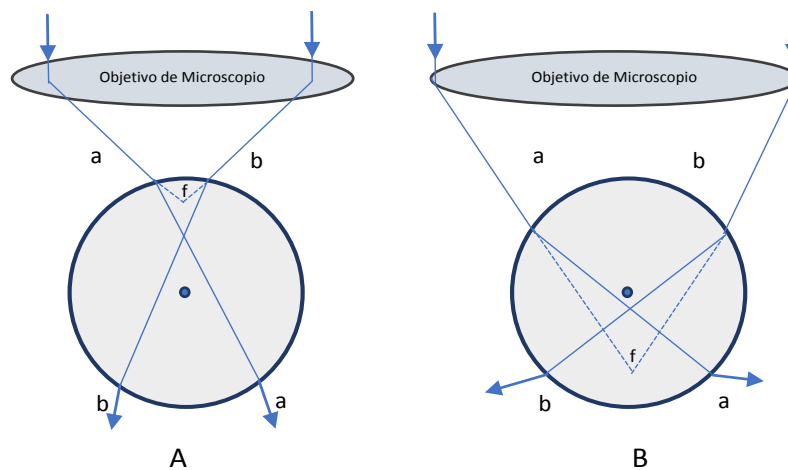


Figura 2.3 Comportamiento de fuerzas según la apertura numérica de objetivo de microscopio A) Objetivo de microscopio con apertura numérica pequeña B) Objetivo de microscopio de mayor apertura numérica.

Detección de posición

Existen una serie de alternativas para la detección de la posición de la partícula que brindan información óptima para la calibración de las PO.

Una de ellas es la detección de posición basada en videomicroscopía, donde una cámara es posicionada a la salida del sistema, la posición por video permite la creación de imágenes que detectarán la posición de una partícula atrapada, se han empleado una serie de algoritmos y programas que permiten obtener la calibración. Se requiere de un sistema de iluminación adecuado para el uso de esta técnica de detección.

Otros dispositivos utilizados son los detectores de cuadrante, que monitorean la posición de la

partícula atrapada a través de los cambios en la señal que llega al detector. Tienen una ventaja en la velocidad de adquisición de datos y por lo tanto aumenta la resolución temporal en la detección, sin embargo, solo son capaces de seguir a una partícula individual.

A continuación, en la figura 2.4 se muestra un esquema de una PO con los componentes mencionados.

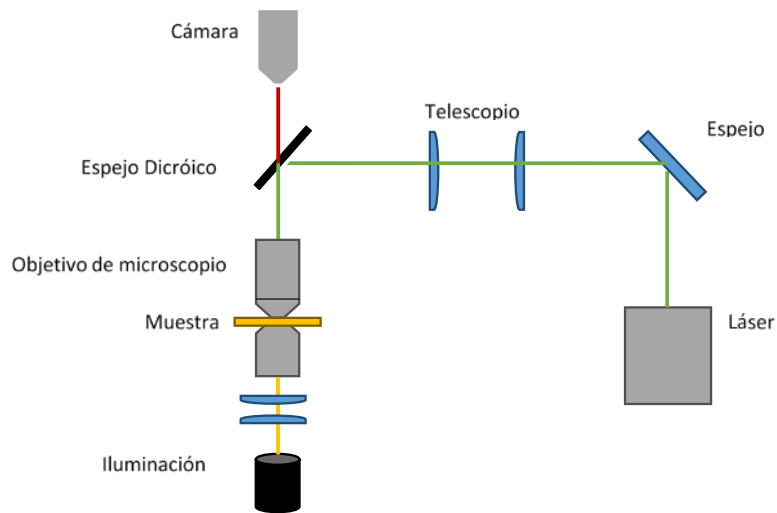


Figura 2.4 Esquema de Arreglo de Pinzas Ópticas

2.3.2 Atrapamiento por Pinzas Ópticas

Como se mencionó anteriormente la fuerza óptica de un haz de luz enfocado (presión de radiación) sobre una partícula se divide en dos tipos:

- Fuerza de Scattering o dispersión que es proporcional a la intensidad del láser.
- Fuerza de gradiente que es proporcional al gradiente de intensidad del láser.

La fuerza de gradiente es aquella fuerza que permite el atrapamiento de la partícula, mientras que la fuerza de scattering tiende a empujar a la partícula fuera de la trampa en la dirección axial. Para que exista un atrapamiento estable es necesario que la fuerza de gradiente sea mayor que la fuerza de scattering.

Estas fuerzas dependerán de la longitud de onda del haz, del tamaño de la partícula y de la apertura numérica del objetivo de microscopio que se usa para enfocar el haz de luz.

En el atrapamiento de partículas se consideran principalmente dos regímenes: el régimen de Rayleigh y el régimen de Mie o de rayos ópticos, éstos dependerán de la longitud de onda de la luz comparada con el tamaño de las partículas.

Régimen de Rayleigh

Comprende partículas muy pequeñas comparadas con la longitud de onda (usualmente $R < \lambda_0/10$). Donde R es el radio de partícula y λ_0 la longitud de onda del láser, y por lo tanto se considera que las cargas dentro de la partícula se comportan como dipolos ante la presencia del campo electromagnético. En este régimen, la fuerza sobre la partícula se puede calcular analíticamente con teoría de scattering de Rayleigh (Hecht, 2002).

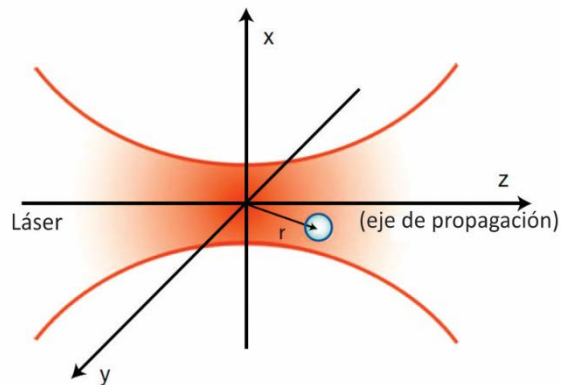


Figura 2.5 Esquema de una partícula cerca del foco del haz de láser (imagen adaptada de (Li, 2013))

Como se muestra en la figura 2.5, se tiene una partícula que es iluminada por el láser a lo largo del eje z en dirección positiva. La partícula tiene un radio R y un índice de refracción n_p y el haz de láser con potencia P , es un haz Gaussiano polarizado linealmente con una cintura de haz de radio ω_0 en el foco.

El frente de onda del haz gaussiano es plano en el foco, y su cintura (radio a $\frac{1}{e^2}$) se propaga de acuerdo con:

$$\omega(z) = \omega_0 \left[1 + \left(\frac{\lambda_m d z}{\pi \omega_0^2} \right)^2 \right]^{1/2}, \quad (2.2)$$

donde

$$\lambda_{md} = \frac{\lambda_0}{n_{md}}, \quad (2.3)$$

es la longitud de onda del láser en el medio, siendo n_{md} el índice de refracción del medio donde se encuentra suspendida la partícula.

El criterio de Rayleigh (z_R), es definido como la distancia en la que el radio del haz se extiende por un factor de $\sqrt{2}$, y esta dado por:

$$z_R = \frac{\pi\omega_0^2}{\lambda_{md}} \quad (2.4)$$

La distribución de la intensidad del haz es:

$$I(x, y) = I_0 e^{-2(x^2+y^2)/\omega^2} = \frac{2P}{\pi\omega^2} e^{-2(x^2+y^2)/\omega^2}. \quad (2.5)$$

La apertura numérica del haz gaussiano se define como:

$$NA = \frac{\lambda_0}{\pi\omega_0} = n_{nd} \frac{\lambda_{md}}{\pi\omega_0}. \quad (2.6)$$

La fuerza de gradiente que se ejerce sobre la partícula es:

$$\vec{F}_{grad}(\vec{r}) = [\vec{p}(\vec{r}, t) \cdot \nabla] \vec{E}(\vec{r}, t) = \frac{2\pi n_{md} R^3}{c} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \nabla I(\vec{r}), \quad (2.7)$$

donde $\vec{p}(\vec{r}, t)$ es el dipolo inducido de la partícula debido a un campo eléctrico instantáneo del láser $\vec{E}(\vec{r}, t)$, m es el índice de refracción relativo entre la partícula y el medio en el que se encuentra:

$$m = \frac{n_p}{n_{md}}, \quad (2.8)$$

donde n_p es el índice de refracción de la partícula y c es la velocidad de la luz en el vacío.

La fuerza de gradiente es conservativa y por lo tanto forma un potencial de atrapamiento que está dado por:

$$V(\vec{r}) = -\frac{2\pi n_{md} R^3}{c} \left(\frac{m^2-1}{m^2+2} \right) I(\vec{r}). \quad (2.9)$$

La fuerza de scattering que ejerce el láser sobre la partícula es:

$$\vec{F}_{scat}(\vec{r}) = \hat{z} \left(\frac{n_{md}}{c} \right) C_{scat} I(\vec{r}) = \hat{z} \frac{128\pi^5 R^6}{3c\lambda_0^4} \left(\frac{m^2-1}{m^2+2} \right)^2 n_{md}^5 I(\vec{r}), \quad (2.10)$$

en donde C_{scat} es la sección transversal de dispersión, que depende del tamaño de la partícula y su índice de refracción.

La fuerza total ejercida sobre la partícula es $\vec{F}(\vec{r}) = \vec{F}_{scat}(\vec{r}) + \vec{F}_{grad}(\vec{r})$. Para que exista una trampa estable la fuerza mínima a lo largo del eje z debe ser negativa, de otra manera la fuerza del láser siempre empujará a la partícula y no la atrapará. (Li, 2013)

La fuerza de scattering es dirigida en la dirección de propagación de luz y tiene una dependencia con el radio de la partícula de R^6 , por lo que al ser la partícula más pequeña la fuerza de scattering se hace mucho menor que la fuerza de gradiente que es proporcional a R^3 , esto permite tener una fuerza mínima negativa en eje z .

Régimen de Mie o de rayos ópticos

El régimen de Mie comprende partículas muy grandes comparadas con la longitud de onda ($R > 10\lambda_0$), donde por simplicidad, se usa la refracción de la luz y las fuerzas son calculada desde el punto de vista de la óptica de rayos.

Los fotones que son reflejados debido a la superficie de la partícula la empujarán hacia adelante, si la fuerza es mayor que la fuerza de resorte debida a la refracción no habrá atrapamiento y la microesfera será empujada fuera de foco. La reflexión de la superficie dependerá de la relación del índice de refracción (m) entre la microesfera y el medio donde se encuentra sumergida (ecuación 2.8). Entre mayor sea m habrá mayor superficie de reflexión y será más difícil atrapar a la microesfera. Para aumentar la fuerza del resorte, el láser debe estar fuertemente enfocado por medio del objetivo de microscopio con apertura numérica grande. (Li, 2013)

Régimen Mie-Lorenz

Cuando el tamaño de partícula es cercano a la longitud de onda de atrapamiento del láser se utiliza la teoría generalizada de Lorenz-Mie, que se basa en cálculos complejos de teoría electromagnética, auxiliándose de herramientas computacionales para obtener resultado numérico de las fuerzas. (Li, 2013)

2.4 Caracterización de pinzas ópticas

Para poder medir la magnitud de las fuerzas que actúan sobre las partículas, es necesaria la calibración de la trampa óptica y la calibración del sistema de detección de posición. (Alexander Rohrbach, 2007). Debido a que estas fuerzas no pueden ser medidas directamente es necesario determinar la rigidez de la trampa^{1*} y encontrar el desplazamiento de la posición de la partícula atrapada, teniendo estas dos componentes podemos encontrar la fuerza aplicada por medio de la ley de Hooke:

$$F = -kx, \quad (2.11)$$

donde k es la rigidez de la trampa y x es el desplazamiento (Miles J. Padgett, 2010).

Existe una serie de procedimientos para la calibración de pinzas ópticas con distintas ventajas y desventajas, sin embargo, éstos se pueden clasificar en dos métodos: Equipartición y Densidad Espectral de Potencias.

Para el desarrollo de este trabajo se usó el método basado en el teorema de equipartición. Este método utiliza las fluctuaciones de la partícula debidas a la energía térmica para obtener la constante de rigidez de la trampa k .

$$\frac{1}{2}k_b T = \frac{1}{2}k \langle x^2 \rangle \quad (2.12)$$

donde k_b es la constante de Boltzmann ($k_b = 1.38 \times 10^{-5} \frac{pN \cdot \mu m}{K}$), T la temperatura absoluta y x es el desplazamiento de la partícula desde su posición de equilibrio en la trampa. La energía cinética de la partícula es $\frac{1}{2}k_b T$ y se encuentra distribuida por igual en todos los grados de libertad. $\langle x^2 \rangle$ es la varianza de todos los desplazamientos de la partícula respecto a la posición de equilibrio de la trampa y está relacionada directamente con el espectro de potencia.

Como se ha mencionado antes, el seguimiento de la partícula se puede hacer mediante videomicroscopía, ésta técnica consiste en grabar un video de la partícula atrapada durante cierto

^{1*}Equivalente a la constante elástica de resorte de la ley de Hook, representa que tan fuerte o rígida es la trampa de la pinza óptica.

tiempo, se extraen los cuadros (frames) del video, posteriormente se determina la trayectoria de la partícula atrapada mediante el uso de un algoritmo de reconocimiento de imágenes y se calcula la varianza $\langle x^2 \rangle$ en las direcciones x y y .

La calibración de la pinza óptica consiste en obtener la rigidez de la trampa variando la potencia del láser, la que debe tener un incremento lineal al aumentar la potencia. Una ventaja de este método es que no depende del arrastre viscoso de la partícula y la calibración es posible aun variando la viscosidad ((Miles J. Padgett, 2010), (Alexander Rohrbach, 2007)), con este método también es posible obtener la rigidez de más de una trampa.

Conclusiones del capítulo

En este capítulo se estudió el principio de interacción de la luz con la materia y el origen del surgimiento de las PO, al igual que el desarrollo que han tenido a través de los años, lo que permite entender los conceptos fundamentales del atrapamiento óptico. Así también se estudiaron los elementos principales que intervienen en un arreglo óptico de pinzas ópticas y que permiten un atrapamiento estable en 3D, la calibración de las pinzas ópticas juega un papel fundamental en la obtención de las fuerzas de atrapamiento.

Capítulo 3. Implementación de pinzas ópticas holográficas

3.1 Introducción

La ciencia avanza y se tienen nuevas necesidades en distintos campos de investigación de la ingeniería, biotecnología, nanotecnología y manufactura, lo que requiere de la generación de herramientas con nuevas funciones y mayores capacidades, este es el caso de las Pinzas Ópticas (PO) que tienen limitaciones para nuevos requerimientos, por ello surge el desarrollo de un nuevo tipo de configuración de PO que son las Pinzas Ópticas Holográficas (POH). Con ellas se pueden generar múltiples trampas ópticas capaces de atrapar en 3 dimensiones, cada trampa puede tener características específicas y pueden ser trampas dinámicas controladas, estas son ventajas que con otros tipos de métodos de espectro de luz no se logra tener, ya que son capaces de modificar el frente de onda. (E Martín Barbosa, 2007)

Este tipo de PO son llamadas holográficas debido a que se genera un holograma computacionalmente que es desplegado por medio de un elemento óptico difractivo (EOD) que es el Modulador Espacial de Luz (MEL).

Antes de presentar el arreglo experimental desarrollado es importante conocer a fondo algunos componentes, conceptos y especificaciones de las POH. A continuación, se detallará el funcionamiento del MEL que es el componente principal de las POH y que tiene la capacidad de generar las trampas deseadas por medio de la modulación de fase de luz. Se presenta el desarrollo del concepto de difracción de luz, la difracción es el fenómeno de estudio más importante en este capítulo, se detalla la caracterización de POH y la calibración de las trampas en distintos medios que serán utilizados en nuestro experimento.

3.2 Modulador espacial de Luz

El modulador espacial de luz (MEL) es un dispositivo optoelectrónico que se utiliza para modular la fase y/o amplitud de una onda electromagnética controlando la orientación local de las moléculas de cristal líquido contenidas en su interior (E Martín Barbosa, 2007).

Existen muchos tipos de MEL que pueden ser divididos generalmente por el tipo de aspecto de la luz que modulan o el modo en que trabajan: reflexión o transmisión, la mayoría de los MEL son de pantalla de cristal líquido.

Por la variable o aspecto de luz que modulan, se refiere a la propiedad de la luz o frente de onda que puede ser modulada, ya sea amplitud, fase o polarización, esto se logra al propagarse la luz dentro de un medio ópticamente activo (el cristal líquido) (E Martín Barbosa, 2007). Sin embargo, la modulación de fase y/o amplitud son los más utilizados, la variable de polarización puede ser previamente convertida o modificada por medio de elementos ópticos (polarizadores), la polarización es una propiedad de la luz en la que existe una diferencia entre fases de la onda electromagnética, dependiendo de esta diferencia de fase existen diferentes estados de polarización.

Los moduladores de amplitud modifican de manera controlada la amplitud de la luz que atraviesa el modulador, básicamente cambian la intensidad de la luz en distintos puntos, este tipo de modulación es utilizada en pantallas de celulares, relojes digitales y proyectores.

Los moduladores de fase tienen una ventaja en eficiencia debido a que no hay pérdida en la intensidad de luz, en este tipo de modulación se varía la diferencia de fase entre píxeles, sólo trabaja con luz coherente y se utilizan como divisores de haz, en holografía, en distintas configuraciones de láser, corrección de frente de onda, etc. (Burman, 2010).

Los moduladores que trabajan por reflexión permiten mejores resoluciones y un factor de llenado mayor, básicamente reflejan la luz de manera controlada y tienen un mejor tiempo de respuesta que los de transmisión. (E Martín Barbosa, 2007).

La mayoría de las pinzas ópticas holográficas trabajan con moduladores de fase y consisten en una pantalla de cristal líquido que tiene propiedades tanto de sólidos como de líquidos, las moléculas que la componen son pequeños elipsoides que tienen distintas configuraciones. Este tipo de pantallas son de bajo costo y pueden ser de tipo nemático o ferroeléctrico.

Los MEL nemáticos son anisotrópicos (diferentes índices de refracción en diferentes direcciones cristalográficas) y uniáxicos en los que la dirección del eje óptico coincide con la dirección del eje del cristal (Castaño, 2012). Generalmente las moléculas de cristal líquido nemático se encuentran acomodadas en forma paralela (Figura 3.1a), esta configuración se da debido a que el cristal líquido se encuentra en medio de placas previamente pulidas en la misma dirección, las moléculas cercanas a las placas toman la orientación del pulido y así sucesivamente las intermedias toman la misma orientación. Es posible cambiar el giro de las moléculas en los cristales líquidos nemáticos, a este

tipo de cristal líquido se le llama nemático con giro, lo que se hace es colocar el cristal líquido entre dos placas de cristal previamente pulidas pero una pulida en dirección horizontal y la otra en vertical, las moléculas cercanas a los vidrios cambian su dirección para igualarse con las del vidrio pulido, las moléculas intermedias tienen un giro gradual (figura 3.1b). Como el vidrio no se puede estar puliendo continuamente en la dirección de interés, el mismo efecto se obtiene aplicando campos eléctricos que obligan a las moléculas a tomar cierta orientación.

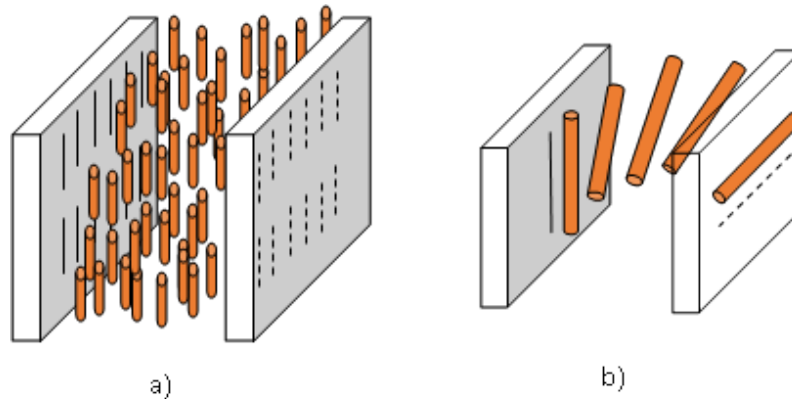


Figura 3.1 a) Cristal Líquido Nemático, b) Cristal Líquido Nemático con Giro

Los moduladores ferroeléctricos se encuentran acomodados por capas y dependiendo de la capa, las moléculas se encuentran acomodadas en cierta orientación. (Figura 3.2).

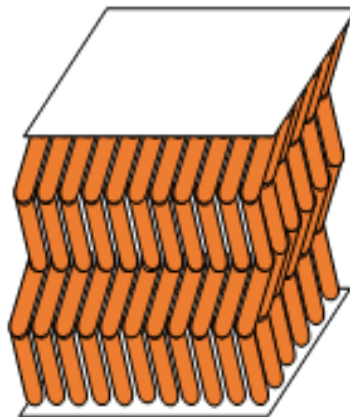


Figura 3.2 Esquema de Cristal Líquido Ferroeléctrico

Para entender el funcionamiento del MEL se conocerán a continuación los elementos que lo componen (Figura 3.3).

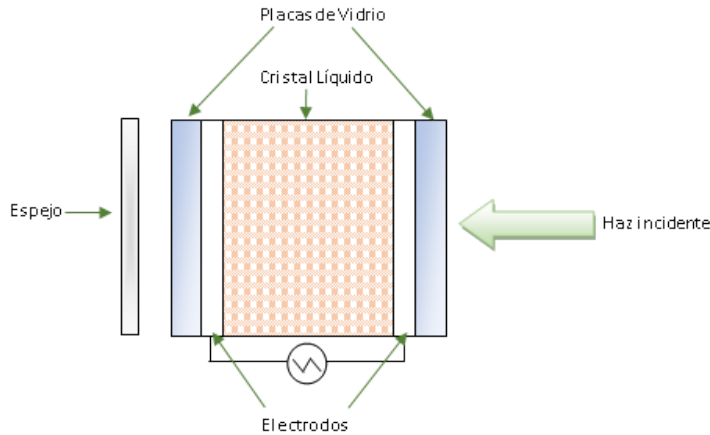


Figura 3.3 Esquema de elementos del MEL

El cambio en la orientación de las moléculas de cristal líquido es modificado por un campo eléctrico que se genera a través de electrodos transparentes, estos inducen un voltaje suficiente para permitir el cambio de orientación, se encuentran situados entre las placas de vidrio en donde está contenido el cristal líquido, comúnmente para asegurar la alineación de las moléculas de los extremos, los conductores se cubren con una capa de poliamida pulida. (Gabriel C. Spalding, 2008)

El MEL con el que trabajamos en el laboratorio (figura 3.4) es un MEL modelo Leto de la marca Holoeye con resolución de 1920×1080 *pixeles*, con una pantalla LCOS (Liquid Crystal on Silicon) nemática paralela de reflexión, cuenta con 256 (8 bits) niveles de gris y un área activa de 12.5×7.1 *mm*, el tamaño mínimo de pixel es de $6.4 \mu m$, separación interpixel de $0.2 \mu m$ y tiene un factor de llenado del 93 %. Cada pixel es una celda de moléculas de cristal líquido funcionando a través de campos eléctricos y dependiendo de la intensidad de los campos resulta un cambio en el nivel de gris que se despliega, es decir el cambio de fase depende de la intensidad del campo eléctrico aplicado.



Figura 3.4 Modulador Espacial de Luz de reflexión, modelo Leto Holoeye de cristal líquido nemático paralelo.

3.3 Modulación de fase

La luz que incide sobre el modulador espacial de luz consiste en un frente de onda electromagnético con ciertas características como longitud de onda, fase inicial, amplitud, etc. El nivel de gris inducido por la orientación de las moléculas de cristal líquido dentro de un pixel depende de las características del frente de onda incidente, es decir, la respuesta del modulador será diferente para cada arreglo óptico y fuente de luz. Por tal razón, antes de usar un MEL es necesario realizar una caracterización.

La caracterización del modulador espacial consiste en determinar los valores de la amplitud y fase que resultan de aplicar diferentes voltajes (en nuestro caso sólo de fase). Para un modulador de 8 bits, se pueden aplicar hasta 256 diferentes voltajes para cualquier pixel. Regularmente el modulador espacial de luz se encuentra conectado a la tarjeta gráfica de la computadora, y el usuario alimenta el MEL al desplegar imágenes (hologramas) en la pantalla. Los diferentes niveles de gris de la imagen (que van de $g_l = 0$ a 255) son convertidos en voltajes dentro del modulador. (E Martín Barbosa, 2007).

La fase inducida por una celda de cristal líquido sobre un frente de onda incidente en general no guarda una proporción lineal con el voltaje aplicado sobre la celda. Esto quiere decir que, si se aplica un voltaje V a la celda, y se obtiene que la variación de fase es π , un voltaje de $2V$ en general no induce una variación de fase de 2π (Ocegueda Miramontes, 2010).

3.3.1 Caracterización de MEL

En esta sección se presentan el proceso y los resultados obtenidos para la caracterización del MEL.

Se implementó el siguiente arreglo óptico para lograr la caracterización del modulador (figura 3.5). La fuente de iluminación es un láser que se expande por medio de un telescopio formado por dos lentes de tal forma que cubra el área activa del MEL, los espejos sirven para dirigir el haz de luz hacia el MEL con un ángulo de incidencia pequeño (esto favorece que el frente de onda sea aproximadamente plano).

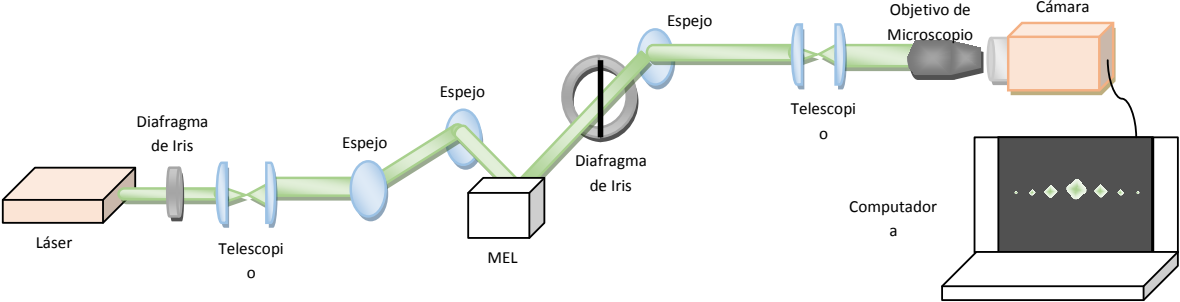


Figura 3.5 Arreglo para Caracterización de MEL

Después del MEL se coloca un obstáculo vertical que permite dividir el frente de onda en dos para distinguir entre dos niveles de gris distintos que se despliegan en el modulador y que equivalen a dos distintos voltajes. En la figura 3.6 se muestran las diferentes combinaciones de niveles de gris que se desplegaron en el modulador.

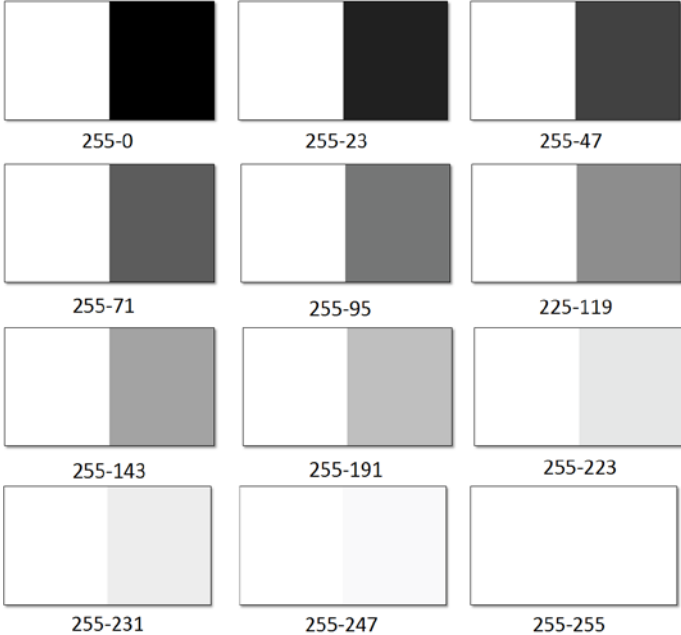
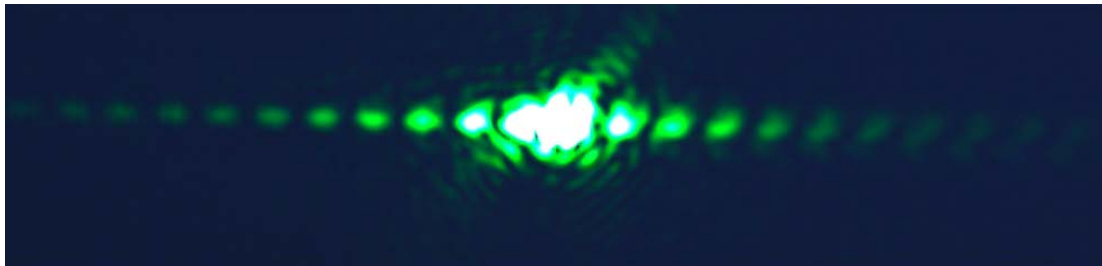
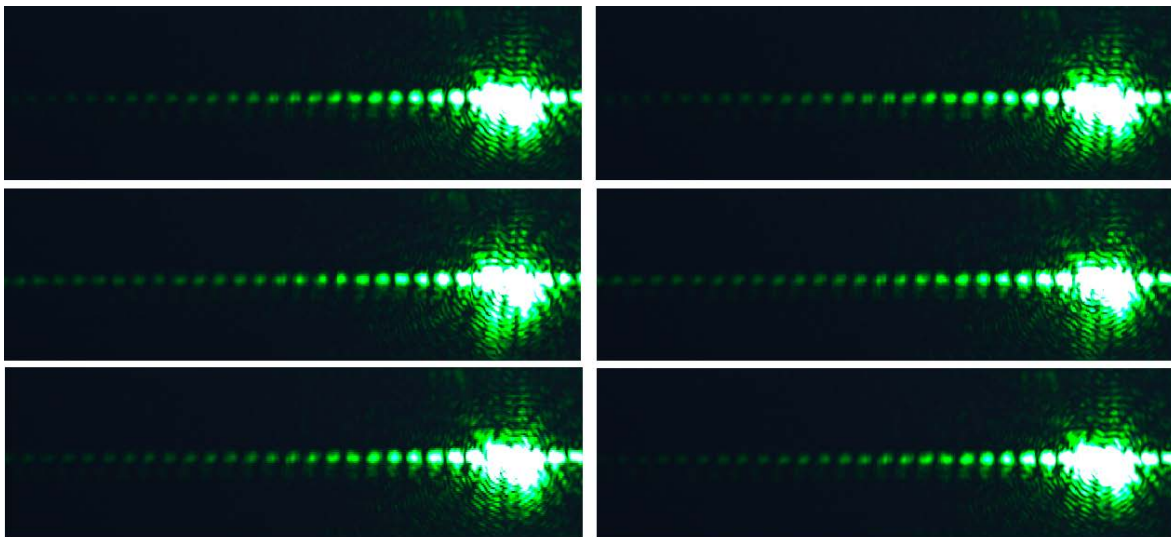


Figura 3.6 Ejemplos de niveles de gris utilizados en la caracterización del MEL

A continuación, se tiene un telescopio para agrandar la mancha del láser, en la entrada de la cámara se coloca un objetivo de microscopio, y la cámara conectada a la computadora, con la que se logran ver las siguientes imágenes (figura 3.7).



a



b

Figura 3.7 a) Imagen completa de los dos niveles de Gris b) Ejemplos de diferentes niveles de Gris

Se puede observar que se generan diferentes franjas y que se van recorriendo una distancia determinada dependiendo del tono de gris. Se guardan las distintas imágenes de acuerdo con cada nivel de gris, la distancia entre cada punto se mide para calcular la fase de cada voltaje con la siguiente ecuación:

$$\Delta\psi = \frac{(\Delta x)(2\pi)}{\lambda}, \quad (3.1)$$

donde $\Delta\psi$ es el cambio de fase, Δx es la distancia que se movió la franja al desplegar el nivel de gris respecto del blanco ($g_i=255$) y λ es la distancia entre las franjas.

Se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 3.8:

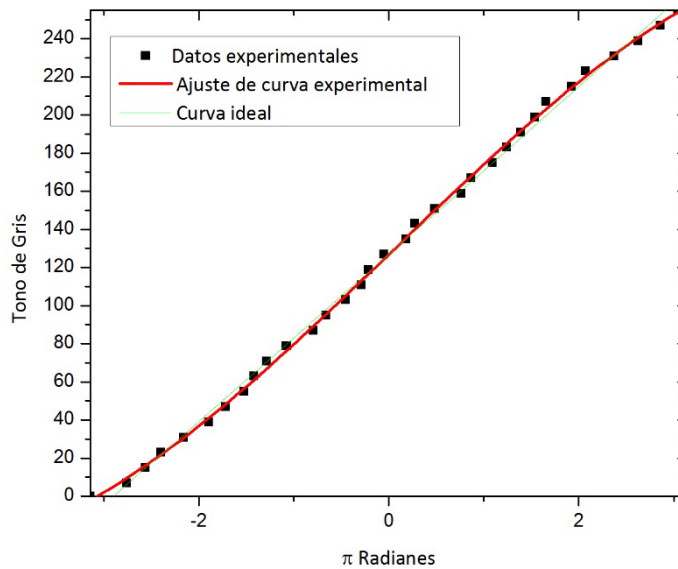


Figura 3.8 Curva de Caracterización de MEL

Se encontró que no se tiene un comportamiento perfectamente lineal en el cambio de fase respecto del nivel de gris. Si bien esta diferencia probablemente no produzca un cambio sustancial en los hologramas a desplegar, se decidió usar la evidencia experimental para determinar los niveles de gris a desplegar dependiendo del valor de fase requerido. Por esta razón, se realizó un ajuste de la curva con una ecuación cúbica que fue la mejor aproximación.

$$y = 126.87 + 47.81x + 0.05x^2 - 0.672x^3$$

Esta ecuación sirve para alimentar al algoritmo de generación de hologramas que se desplegarán exclusivamente en nuestro MEL y para el arreglo experimental tal y como se encuentra en el laboratorio.

3.4 Difracción de luz

El elemento óptico difractivo (EOD), en este caso el MEL, funciona con el principio óptico de difracción. La difracción es un fenómeno óptico producido por medio de un obstáculo donde se superponen ondas; este obstáculo “altera” la amplitud y fase de la onda en una región del espacio y produce una onda con una distribución de intensidad particular. Un ejemplo muy sencillo para entender la difracción es hacer incidir un haz de luz en una rejilla de dos ranuras, el tamaño de las ranuras es igual o menor que la longitud de onda de la fuente de luz. El frente de onda inicial se convierte en dos frentes de onda exactamente iguales (coherentes) al pasar por la rendija, las ondas

secundarias se propagan e interfieren (se superponen), lo que genera un patrón de luz con franjas brillantes y oscuras como se muestra en la figura 3.9.



Figura 3.9 Ejemplo de difracción de luz

El patrón de difracción de luz se puede estudiar usando óptica de Fourier bajo dos aproximaciones: de campo cercano conocida como difracción de Fresnel o de campo lejano llamada difracción de Fraunhofer. La segunda aproximación se utiliza comúnmente debido a que en campo lejano el frente de onda se puede considerar plano y por lo tanto las matemáticas se simplifican.

Dependiendo del tipo o forma de interferencia que exista se pueden tener diferentes patrones de luz, una forma sencilla de controlar estos patrones es por medio de un MEL que actúa como un obstáculo moldeable. Para entender cómo trabaja el MEL por difracción se expondrán a continuación tres casos de difracción analizados por medio de la óptica de Fourier:

El primero es una onda plana propagándose en el espacio, pasa por una rejilla (placa con aperturas rectangulares en una dirección) y a cierta distancia z se logra ver el patrón de difracción de Fraunhofer, como se muestra en la figura 3.10.

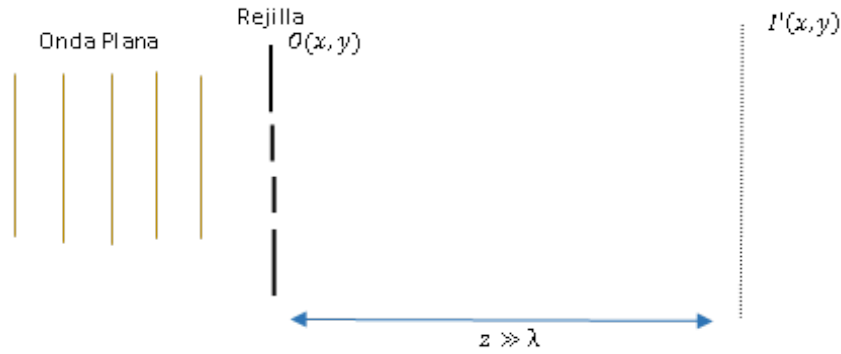


Figura 3.10 Propagación de un frente de onda plano que pasa a través de una rejilla $O(x,y)$ y se observa el patrón de difracción de campo lejano, λ representa la longitud de onda.

La onda plana incidente se puede representar por la ecuación 3.2

$$I(x, y) = A(x, y)e^{i\delta(x,y)}, \quad (3.2)$$

donde A es la amplitud de la onda y δ es su fase. La función $O(x, y)$ representa la función de transmisión de la rejilla. Se encuentra que el patrón de difracción observado a una distancia suficientemente grande obedece una distribución de luz que es proporcional a la transformada de Fourier de la señal $O(x, y)$, como se puede ver en la ecuación 3.3

$$I'(x, y) \propto \mathcal{F}(O(x, y)) \quad (3.3)$$

En el segundo arreglo se supone cualquier tipo onda incidente que pasa por un objetivo de microscopio o una lente y se observa el patrón generado a la distancia focal de la lente (figura 3.11). Se ha demostrado que el patrón de difracción corresponde a la transformada de Fourier de la señal de entrada.

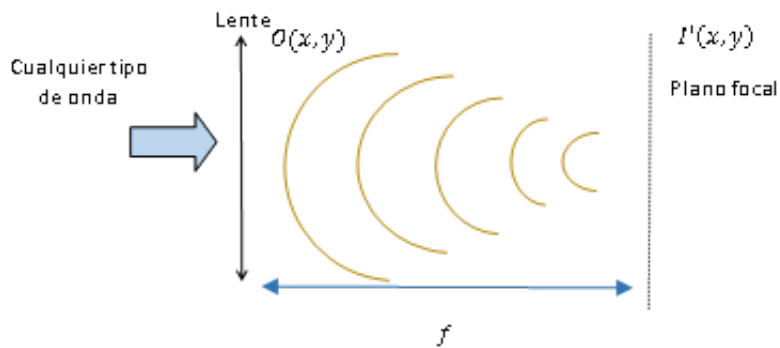


Figura 3.11 Frente de onda $O(x,y)$ que pasa a través de una lente positiva y patrón de difracción observado a la distancia focal de la lente.

El tercer caso, es un frente de onda que pasa a través de una rejilla bidimensional, es decir una placa con aperturas rectangulares en ambas direcciones, como se observa en la figura 3.12, este es el caso del modulador espacial de luz que consiste en una pantalla de cristal líquido compuesta por una serie de áreas activas y áreas no activas (las áreas activas son los pixeles).

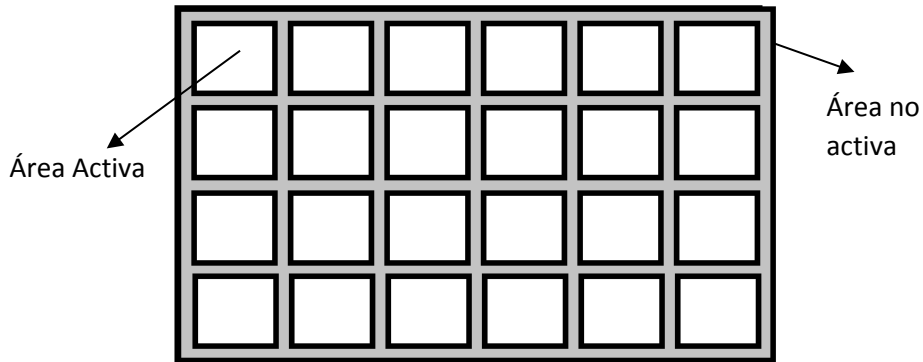


Figura 3.12 Pantalla de MEL

Suponemos una onda inicial $I(x,y)$ que se propaga en el espacio y que pasa por una rejilla descrita por la expresión $O(x) = \text{Rect}\left(\frac{x}{L}\right) \otimes \text{comb}\left(\frac{x}{a}\right)$, que es una convolución entre las funciones rectángulo y peine, como se puede ver en la figura 3.13.

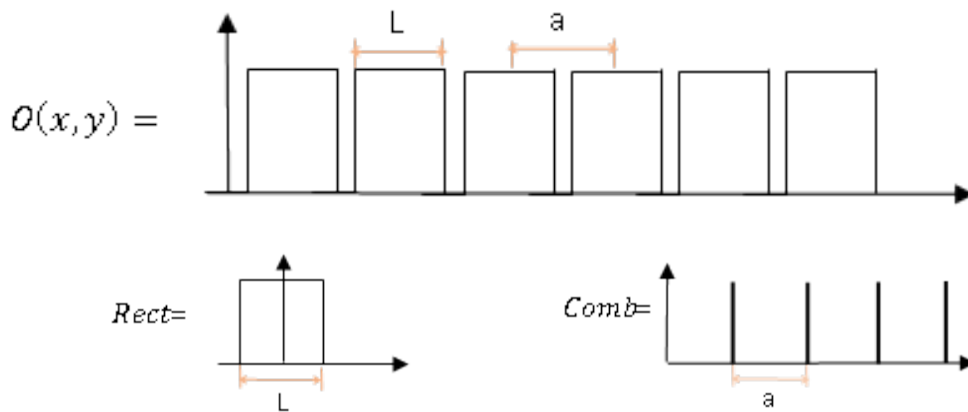


Figura 3.13 Representación de Rejilla $O(x,y)$

Como se mencionó en el primer caso, el patrón de difracción de Fraunhofer de la rejilla coincide con la transformada de Fourier de la rejilla. En este caso, al aplicar la transformada de Fourier obtenemos:

$$\mathcal{F}(O(x)) = \text{sinc}(Lu)\text{comb}(au). \quad (3.4)$$

A una distancia suficientemente grande, se genera el siguiente patrón de difracción:

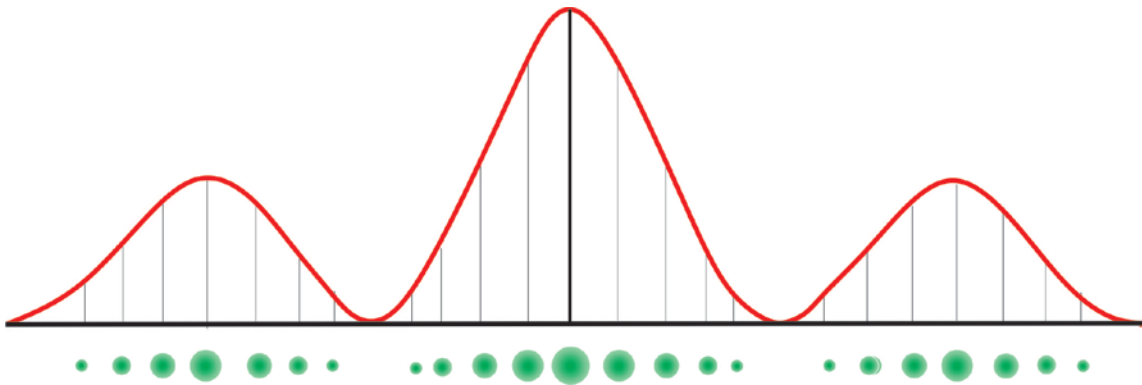


Figura 3.14 Representación de transformada de Fourier de $O(x, y)$ y patrón de difracción de Fraunhofer $I'(x, y)$. Es claro que el orden cero de difracción es mucho más intenso que los otros.

Las pequeñas manchas que se observan en la figura 3.14 son los distintos órdenes de difracción. Lo mismo ocurre cuando la pantalla de cristal líquido del MEL está encendida y desplegando una imagen de un solo nivel de gris, que es lo que se observó en la caracterización del MEL.

Para generar múltiples trampas con el MEL se utiliza una lente positiva (o un objetivo de microscopio) y en su plano focal se observará la distribución de luz correspondiente a la transformada de Fourier de la imagen que se despliegue en el MEL. En este caso, el campo o frente de onda incidente $I(x, y) = A(x, y)e^{i\delta(x, y)}$ será modulado en fase, la amplitud $A(x, y) = A_0$ se mantendrá constante. En el punto focal de la lente, el frente de onda tiene un perfil de la forma $I'(x, y) = \mathcal{F}(e^{i\delta(x, y)})^2$, esta transformada de Fourier debe ser la distribución de luz que se desea tener en el plano de observación, lo que implica que en el modulador se debe desplegar una imagen que corresponda a la transformada inversa de Fourier de la distribución deseada, que es conocida como holograma. Para saber cómo es el holograma requerido, es necesario conocer la transformada inversa de la imagen inicial que se quiere desplegar.

El MEL modelo LETO que se utilizó en el desarrollo del presente trabajo cuenta con un software básico para la generación de hologramas, sin embargo, la resolución que ofrece es muy pobre y por lo tanto fue imposible generar distribuciones de luz puntuales del orden de micras. Por esta razón el Dr. Víctor Ruiz, investigador del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada) nos proporcionó un algoritmo computacional capaz de calcular la transformada de Fourier de una imagen en escala de grises y genera el holograma óptimo para el MEL. Existe una serie de técnicas para encontrar la modulación de fase necesaria para tener un holograma correcto.

El método del programa del Dr. Víctor Ruíz está basado en el “Algoritmo Adaptativo-Aditivo”, descrito por Soifer, Kotlyar y Doskolovich, éste es un método iterativo, que proporciona la fase necesaria para generar un patrón de intensidad deseado en el plano de observación ((Eric R. Dufresne, 2001), (Victor Soifer, 1997)). Principalmente en este algoritmo se supone una fase arbitraria $\delta(x, y)$ y a un frente de onda arbitrario $I(x, y) = A_0 e^{i\delta(x, y)}$, se le aplica la transformada de Fourier; de la distribución resultante, se obtiene cierta intensidad en plano de observación, se calcula el error comparando la intensidad de los distintos pixeles en la imagen de entrada, y por medio de una constante se altera el frente de onda. Se obtiene la transformada inversa del nuevo frente. A este nuevo frente se le asigna una nueva amplitud. Esto completa una primera iteración, en las siguientes iteraciones se mejorarán las estimaciones para la fase requerida δ . El ciclo es repetido hasta que el error en cierta iteración converja con una tolerancia aceptable.

El programa proporcionado por el Dr. Ruiz fue desarrollado en Matlab, se alimenta de la imagen que se requiere transformar; esta imagen es generada en Corel Draw y se exporta en escala de grises con extensión BMP, un ejemplo de estas imágenes de entrada se puede observar en la figura 3.15.

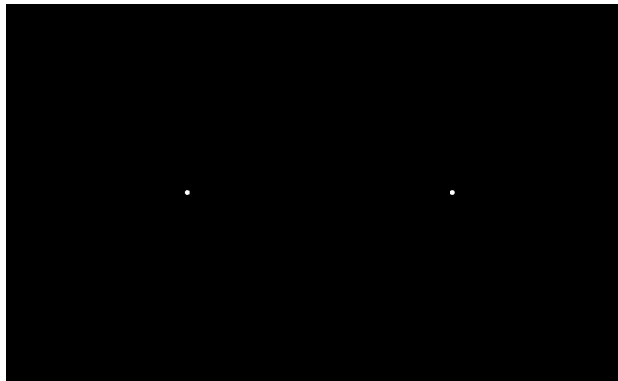


Figura 3.15 Imagen en escala de gris de dos puntos brillantes sobre un fondo oscuro que servirán como puntos de atrapamiento en una pinza óptica holográfica.

Al programa para generar hologramas se le dan valores específicos de acuerdo con el tipo de modulador y las especificaciones de nuestro arreglo (dimensiones de la pantalla activa de MEL, longitud de onda de láser, niveles de gris, tolerancia requerida, distancia de trabajo del objetivo de microscopio, etc.), uno de los parámetros óptimos para asegurar la generación de un buen holograma es la ecuación que se obtuvo de la caracterización del modulador, ya que gracias a ésta se irá determinado la fase que se requiera según el nivel de gris. De acuerdo con la complejidad del holograma es conveniente aumentar el número de iteraciones. Tomando en cuenta lo anterior, el holograma de la imagen que se presentó en figura 3.15 es el siguiente (figura 3.16):

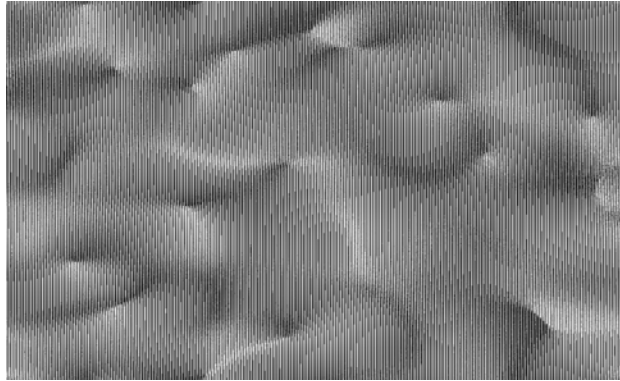


Figura 3.16 Holograma generado a partir de una imagen de 2 puntos brillantes con un fondo oscuro.

3.4.1 Difracción de Orden Cero

La luz que no es difractada por la pantalla de cristal líquido produce un haz de luz de difracción de orden cero (DOC) en el eje óptico del plano de Fourier. Este haz se genera principalmente por las partes inactivas del modulador (espacios muertos al margen de cada pixel, reflexión en la parte de la ventanilla de la pantalla etc.). Esta difracción de orden cero es un problema para muchas aplicaciones, debido a que este punto es muy brillante. (Jinyang Liang, 2012). La figura 3.17 ilustra este fenómeno.

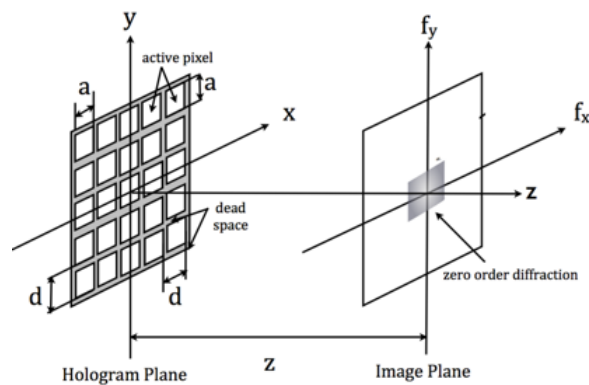


Figura 3.17 Difracción de Orden Cero

Algunas acciones tomadas para disminuir este orden cero en nuestro arreglo fueron las siguientes:

1. Se coloca un diafragma de iris en el inicio del arreglo de POH para corregir cualquier deformación de la mancha del láser que pueda llegar a afectar en zonas no activas fuera de la pantalla activa del MEL. La parte inactiva de MEL es el contorno de las celdas activas (píxeles).

2. Se cuidó que el tamaño de la mancha de luz que incide sobre la pantalla fuera de tal diámetro que no sobrellenara la pantalla, ni quedara en los límites de la pantalla activa (Gabriel C. Spalding, 2008).
3. El software controlador del MEL permite realizar una calibración de parámetros básicos, en el que es posible ajustar diferentes niveles de brillo y contraste mediante diferentes voltajes de operación, se buscaron los parámetros óptimos para los que la difracción de orden cero fuera menor.
4. Para el experimento con GR era necesario eliminar el orden cero de difracción, pero no se logró mediante la calibración de parámetros, por lo que se hicieron imágenes y hologramas donde los dos puntos no estuvieran alineados con la difracción de orden cero, y que se desplazaran a una altura de $5 \mu m$ del centro, lo que evita que la difracción de orden cero interactúe con la célula.

3.5 Arreglo experimental

El arreglo experimental implementado en el laboratorio se muestra en la figura 3.18.

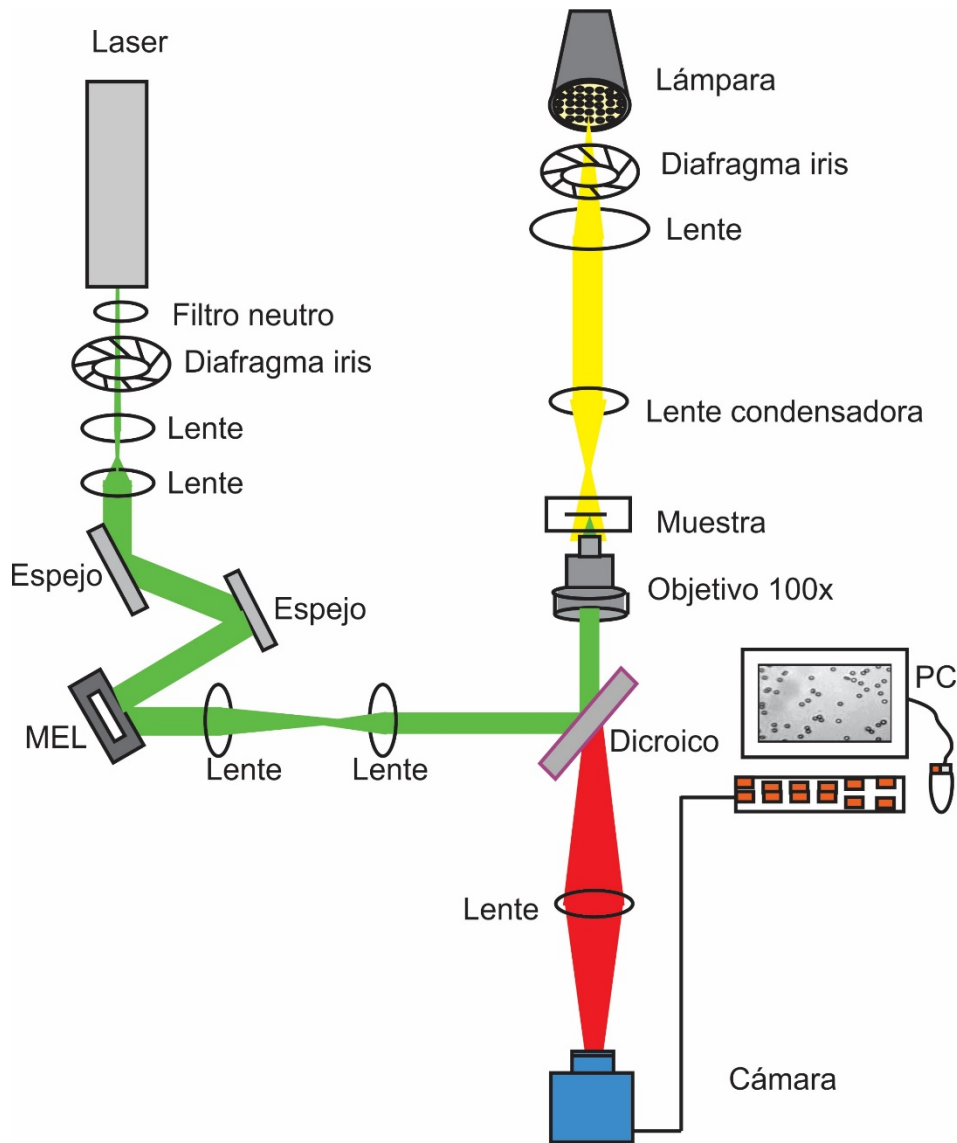


Figura 3.18 Arreglo Experimental de POH

Al inicio del arreglo se encuentra un láser verde marca QUANTUM de 532nm de longitud de onda, el haz de láser pasa primeramente por un filtro neutro de densidad 1.0 que reduce la potencia emitida por el láser en un 90%, este filtro ayuda a desviar la luz reflejada y así evitar que entre al láser y lo dañe, por otro lado, también ayuda para aprovechar la región estable en intensidad del láser que se encuentra después de 50 mW de potencia. Seguido de éste, se encuentra un diafragma de iris con el que se corrige cualquier desperfecto que tenga la mancha del láser. El haz después entra a un primer telescopio cuya función es agrandar la mancha del láser, en este caso se amplifica de 2 mm a 5.8 mm para rellenar la pantalla del MEL, el telescopio consta de dos lentes plano convexas, la primera lente de 35 mm y la segunda lente de 100 mm , es de suma importancia cuidar que la distancia entre lentes d siempre cumpla con lo siguiente: $d = f_1 + f_2$ (suma de la longitud

focal de cada lente), el no respetar esto provoca que la luz no esté colimada y que a lo largo del camino óptico el tamaño de mancha del láser vaya creciendo o disminuyendo. Las lentes del telescopio están acomodadas de tal manera que las caras planas de estas queden encontradas para evitar aberración esférica. Las figuras 3.19 y 3.20 muestran el diagrama de mancha en el plano focal de un arreglo óptico de dos lentes en la configuración recomendada y la configuración opuesta, respectivamente.

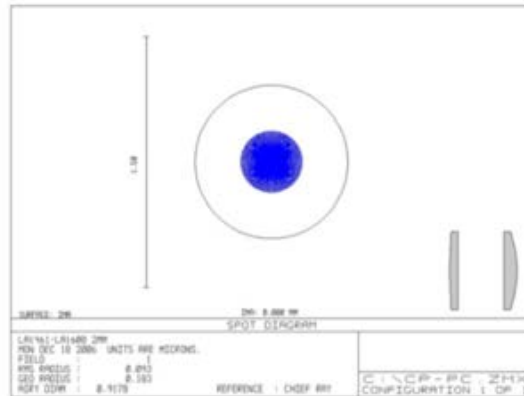


Figura 3.19 Lentes con caras planas encontradas (E Martín Barbosa, 2007)

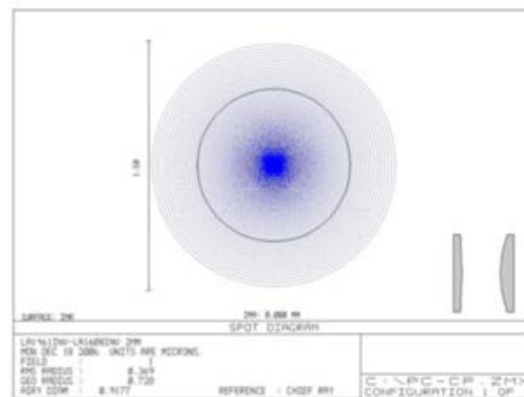


Figura 3.20 Lentes con caras convexas encontradas (E Martín Barbosa, 2007)

Después del telescopio de amplificación se encuentran dos espejos acomodados de tal manera que el haz de luz incide sobre el MEL y forme un ángulo menor a 45° con respecto al haz que sale del MEL (figura 3.21), se ha demostrado que este ángulo de posicionamiento es óptimo para en el correcto funcionamiento del MEL, ya que el frente de onda es aproximadamente plano.

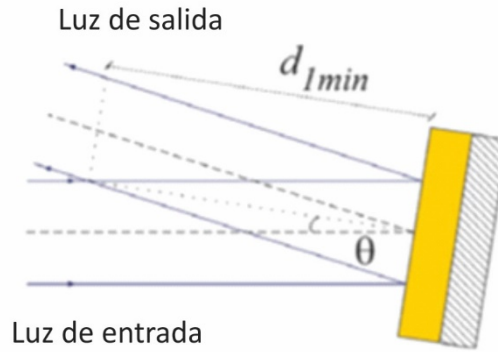


Figura 3.21 Posicionamiento óptico del MEL (imagen adaptada de (E Martín Barbosa, 2007))

Existe otra forma de colocar el modulador para asegurar una onda plana incidente, que es por medio de un divisor de haz de cubo como el que se muestra en la figura 3.22, éste se coloca en una posición perpendicular al eje óptico y redirecciona al haz modulado hacia afuera por medio del divisor de haz, sin embargo el camino que la luz tiene que recorrer con el divisor puede llegar a producir una pérdida de luz incidente de hasta del 75% (E Martín Barbosa, 2007).

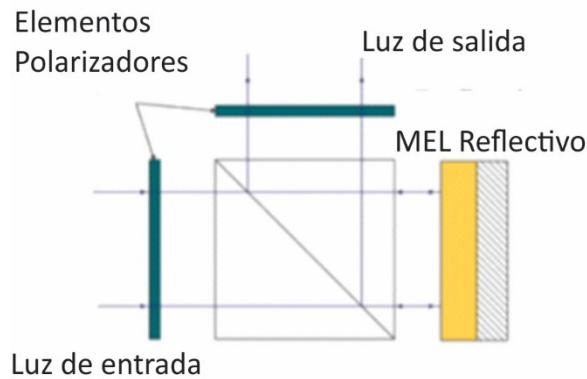


Figura 3.22 Posicionamiento de MEL por medio de un divisor de haz con el objetivo de tener un frente de onda plano (imagen adaptada de (E Martín Barbosa, 2007))

Después del MEL se tiene un segundo telescopio cuyas funciones son asegurar el sobrellenado en la apertura del objetivo de microscopio, lo que mejora el atrapamiento y maximiza la eficiencia de la luz al conseguir una configuración $4f$ (Gabriel C. Spalding, 2008). Esta configuración es llamada así debido a que la distancia del MEL a la primera lente (llamada lente de Fourier) debe ser la distancia del foco de la primera lente f_1 , entre la primera y segunda lente, la distancia focal debe ser, como mencionado anteriormente $d = f_1 + f_2$, para asegurar que la luz este colimada, y por último la distancia de la segunda lente a la entrada del objetivo debe ser f_2 , con esto se cumple la configuración $4f$. Las lentes de este telescopio tienen distancias focales de 100 mm y 150 mm

respectivamente. Las ventajas de la configuración $4f$ son:

1. El telescopio proyecta un holograma en la entrada del objetivo, lo que asegura que cualquier deflexión del haz generado por el holograma dinámico no provoque cambios significativos del haz a la salida del objetivo de microscopio.
2. El hecho de que el holograma y la apertura de entrada del objetivo están en los planos de imagen conjugada también provoca que la imagen en el plano focal este casi libre se aberraciones (Richard D. L. Hanes, 2009).

A la salida del telescopio se coloca un espejo dicróico DMLP605 de Thorlabs, que refleja la luz con longitud de onda menor a 600 nm (verde) y transmite la luz con longitud de onda mayor a 600 nm (roja), lo que permitirá ver lo que ocurre en el plano de atrapamiento por medio de la cámara. La luz verde es direccionada dentro de un objetivo de microscopio E Plan marca Nikon de $100\times / 1.25$ de inmersión en aceite y una distancia de trabajo de 0.23 mm , se encuentra el plano de atrapamiento de partículas inmersas en un medio líquido. Esta mezcla se vierte sobre un portaobjetos, se tapa con un cubreobjetos y se sella con pegamento epóxico. La muestra se coloca en posición horizontal respecto del eje de iluminación de la lámpara, lo que ayuda a que la gravedad no afecte el comportamiento de las células que son considerablemente más pesadas que las partículas adheridas a éstas. Se cuenta también con un condensador que permite concentrar la luz que viene de la lámpara y forma parte del sistema de iluminación, entre la lámpara y el condensador se coloca un diafragma de iris para controlar la iluminación. Como nos interesa observar el plano de atrapamiento con una cámara, el mismo objetivo de microscopio forma la imagen del plano de interés a una distancia muy corta, esta imagen se puede llevar a la cámara mediante el uso de una lente simple. La cámara marca Pixelink es conectada a una computadora que cuenta con un programa que permite el ajuste de visibilidad, la toma de videos a velocidades (cuadros por segundo) específicas y toma de imágenes.

3.6 Calibración de pinzas ópticas

Para asegurar un atrapamiento estable de las POH, primeramente, se realizó la calibración utilizando el MEL como un espejo, es decir sin conectarlo a la corriente, y así utilizar el arreglo como una PO individual, se realizó la calibración en los distintos medios en los que se realizarían los distintos experimentos de ensayo de tensión para asegurar que el índice de refracción, según cada muestra favorecerá el atrapamiento. Las distintas muestras fueron partículas en agua, medio de Glóbulos

Rojos (GR) y medio celular.

Para realizar esta calibración se atrapa una partícula de poliestireno de diámetro de $2 \mu m$, que es la que se utiliza en el experimento de tensión, posteriormente se graba una serie de videos de 2000 *cuadros* para distintas potencias del láser: $10 mW$, $15 mW$, $20 mW$ y $25 mW$ medidas después del filtro neutro. Por medio del programa Virtual Dub (de acceso libre) se extraen los 2000 *cuadros*. En el programa Trackpy desarrollado en lenguaje Python usando la interfaz Spyder, implementado por el Dr. Erick Sarmiento durante su estancia en el laboratorio de termofluidos de la UASLP, realiza el rastreo del posicionamiento de las partículas. Este programa genera un archivo de la posición en x y y del centroide de la partícula en cada cuadro, siguiendo los algoritmos descritos por Grier (Crocker, 1996). Para encontrar la constante de rigidez, con las coordenadas de la posición, se calcula la varianza de la posición de la partícula atrapada, que como se menciona en el teorema de equipartición explicado en el capítulo 2 es $\langle x^2 \rangle$, este resultado está dado en pixeles y se convierte a micrómetros de acuerdo a la equivalencia entre micras y pixeles. Esta equivalencia se calculó previamente colocando una regla de $100 \mu m$ en la posición de la muestra de nuestro arreglo, se toma una imagen de la regla y con el programa Image J (de acceso libre) se mide la distancia entre las divisiones de la regla, en este caso 14.4 pixeles equivalen a una micra.



Figura 3.23 Regla de $100 \mu m$

La rigidez de la trampa se calcula de la siguiente manera:

$$k = \frac{k_b T}{\langle x^2 \rangle}, \quad (3.5)$$

donde $T = 298 K$ es la temperatura ambiente absoluta en el laboratorio, $k_b = 1.38 \times 10^{-5} \frac{pN \cdot \mu m}{K}$ es la constante de Boltzmann y $\langle x^2 \rangle$ es el promedio del cuadrado de la desviación estándar o

varianza de la posición de la partícula atrapada.

Los resultados de la rigidez de la trampa, por cada potencia en las direcciones x y y (rigidez en cada dirección k_x y k_y) en los distintos medios, se muestran en las figuras 3.24, 3.25 y 3.26 respectivamente:

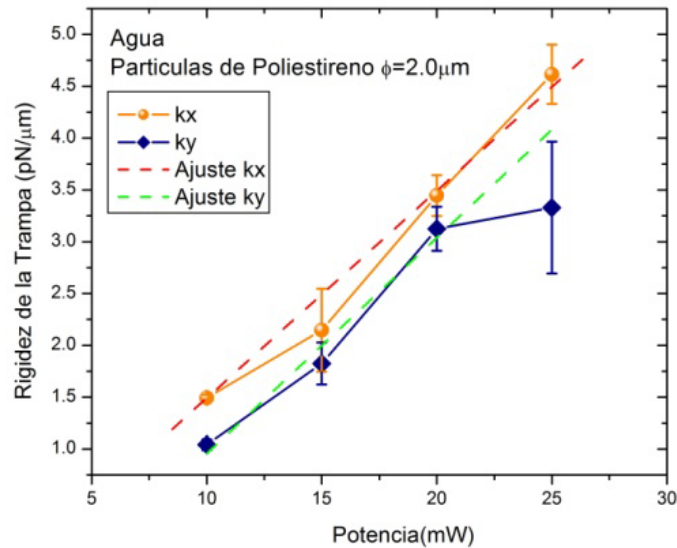


Figura 3.24 Gráfica de rigidez de la trampa en agua

Como se puede ver de la figura 3.24, el comportamiento de la pinza óptica es aproximadamente lineal en los primeros puntos como es esperado, sin embargo, para una potencia de 25 mW el comportamiento de la trampa aparentemente ya no es lineal. Este detalle se puede explicar si consideramos que el algoritmo de Grier, para el seguimiento de partículas, tiene una resolución finita. Aunque es capaz de distinguir distancias de fracciones de pixel, su resolución no alcanza para medir los desplazamientos que sufren las partículas cuando están atrapadas con mayor fuerza. Para solucionar este problema se recurre a una extrapolación de la función lineal a la que se ajustan los primeros datos. Otra manera de solucionar el problema es usando un detector de cuadrante, sin embargo, éste no ayuda cuando se debe monitorear más de una partícula atrapada.

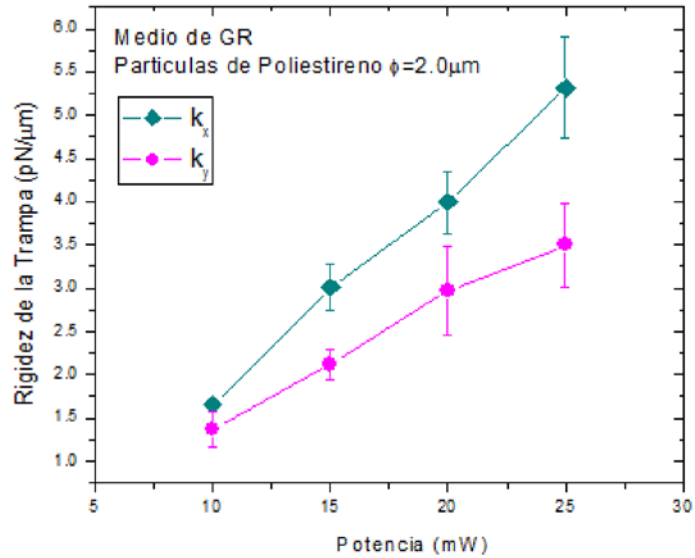


Figura 3.25 Gráfica de rigidez de la trampa Medio de GR

La figura 3.25 muestra la rigidez de la pinza óptica individual en el medio acuoso donde los GR conservan sus propiedades. Como se puede ver, el comportamiento de la trampa es lineal con la potencia del láser. En el capítulo dos se mencionó que la eficiencia de atrapamiento depende de varios factores, uno de ellos es el cociente entre índices de refracción del medio y la partícula. En este caso, la partícula sigue siendo poliestireno ($n=1.59$), pero el medio tiene un índice de refracción mayor que el del agua, por lo que el atrapamiento es más débil. Esto último explica porque el algoritmo de Grier tuvo suficiente resolución como para dar seguimiento a las partículas atrapadas, incluso a una potencia de 25 *mW*.

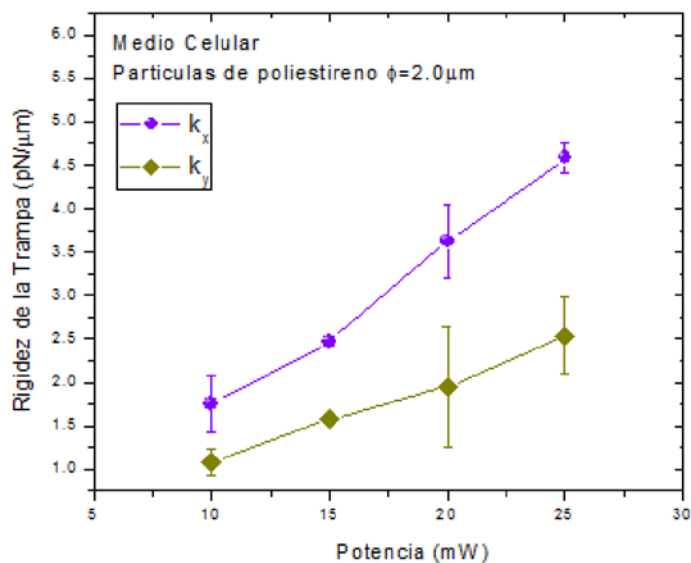


Figura 3.26 Gráfica de rigidez de la trampa Medio de Celular

Se puede observar en figura 3.26 que la trampa en el medio celular tiene un comportamiento lineal al aumentar la potencia, de manera similar al medio de los GR, la trampa es ligeramente más débil que en agua debida a que el índice de refracción es ligeramente más alto.

Se realiza también la calibración de las POH con dos puntos que atrapan partículas de poliestireno de $2\mu m$ estos dos puntos son desplegados por el MEL, la calibración nos permitirá conocer la rigidez de cada trampa de manera individual, no esperamos que sean exactamente iguales debido a que se han modificado los parámetros iniciales del MEL para quitar el orden cero de difracción y esto afecta ligeramente la distribución de luz resultante. Se realiza la calibración de las POH en los dos medios biológicos debido a que en los GR se tienen una separación inicial que varía de $7.5\mu m - 8.5\mu m$ entre trampas y para las células varía de $20\mu m - 30\mu m$. El método para obtener la calibración es el mismo utilizado para una sola trampa solo que ahora tendremos trayectorias de dos partículas en ambos ejes.

La gráfica de la figura 3.27 muestra los valores de la rigidez de las pinzas ópticas duales en las direcciones x y y, dónde el medio acuoso es un medio biológico donde los glóbulos rojos conservan sus características principales.

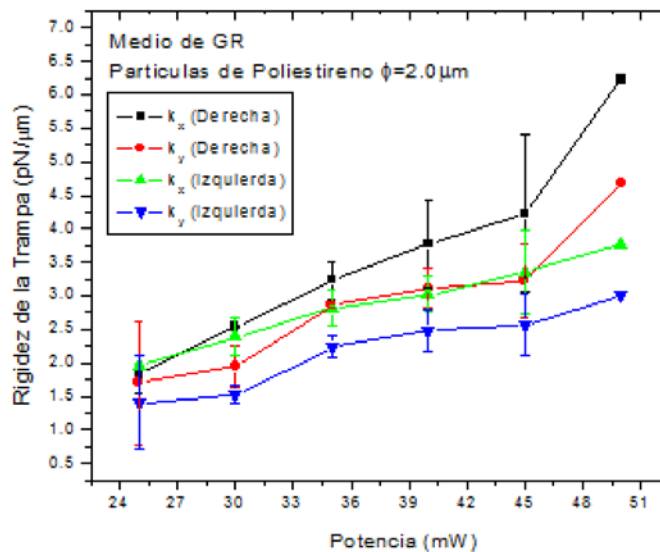


Figura 3.27 Gráfica de dos trampas de MEL en Medio de GR

La figura 3.28 muestra el comportamiento de la rigidez de las pinzas ópticas duales en el medio celular.

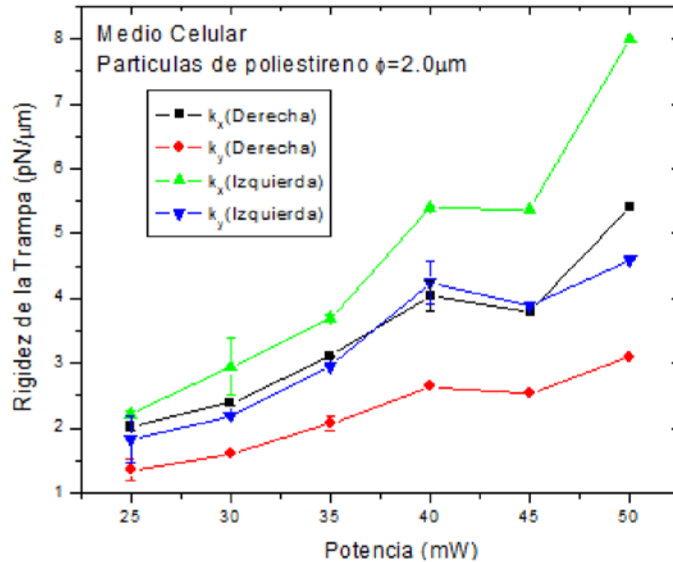


Figura 3.28 Gráfica de dos trampas de MEL en Medio de Celular

Se puede observar que las constantes del resorte en los dos medios se comportan de forma lineal y que la rigidez de la trampa es lo suficientemente fuerte en las dos trampas (derecha e izquierda) a pesar de que se sabe que hay pérdida de potencia, esto debido al patrón de difracción generado por el MEL, al orden cero y a que la potencia en este caso la estamos dividiendo en dos puntos. Se observa también que al tener potencias muy altas las constantes de rigidez ya no se comportan en forma lineal, esto se debe a la resolución de la cámara, ya que al ser la trampa tan fuerte se tienen desplazamientos de fracciones de píxeles que la cámara no logra captar.

Conclusiones de capítulo

La creación de herramientas como son las POH y dispositivos como el MEL, han permitido nuevos desarrollos en distintas áreas de la investigación y nuevas tecnologías.

Ha sido de gran importancia entender la composición y principio de trabajo del MEL y de las POH para tener un arreglo funcional, así como el aplicar las consideraciones que ya otros autores han utilizado para su correcto funcionamiento, la calibración del MEL fue también crítica para obtener las fases óptimas necesarias para generar buenos hologramas, así como la implementación de programa proporcionado por el Dr. Víctor Ruiz.

Un factor que causó mucho problema y que suele ser crítico en muchos arreglos es la difracción de orden cero, después de diferentes pruebas y cambios en nuestro arreglo fue posible disminuirla significativamente lo que también ayudó a tener trampas fuertes y estables. La implementación de

todo lo anterior nos permitió tener un arreglo experimental de POH en el que se tiene un atrapamiento estable y trampas fuertes aun en distintos medios, ya que las calibraciones obtenidas lo demuestran.

Capítulo 4. Ensayo de tensión de células por pinzas ópticas duales

4.1 Adhesión de partículas de poliestireno a células

Para el ensayo de tensión a células realizado fue necesario adherir partículas de poliestireno a las células. Las partículas de elección fueron partículas de $2 \mu m$; se eligió este tamaño de partícula primeramente porque el área de adherencia sería mayor, lo que significa una mejor adherencia y también menor interacción de luz con la célula al momento del atrapamiento de la partícula, con una partícula de menor diámetro existe mayor posibilidad de afectar la célula con la luz.

Las células que se estudiaron son Glóbulos Rojos (GR), células H1299, células c33a y células HeLA, los experimentos de adhesión fueron realizados en el laboratorio Interacciones Biomoleculares y cáncer del Instituto de Física de la UASLP. Cada célula tiene su protocolo de manejo y medio de cultivo particular, en las siguientes secciones se detallarán los protocolos que se llevaron a cabo para lograr la adherencia para que el ensayo de tensión fuera posible.

4.1.1 Adhesión de partículas a Glóbulos Rojos

Los GR también llamados eritrocitos son las células más abundantes en la sangre; en volumen, el 99.9% de las células son GR (Ashton, 2007). Otros componentes de la sangre son los leucocitos o glóbulos blancos, plaquetas y el plasma.

La función principal de los GR es transportar el oxígeno a distintas partes del cuerpo, esta función es realizada por la hemoglobina que está contenida dentro de los GR, otras funciones son transportar a los pulmones dióxido de carbono y regular el flujo de la sangre. Es importante el estudio de estas células debido a que en muchas enfermedades esta célula se ve afectada morfológicamente.

Para realizar la adherencia de partículas a los GR nos basamos en el artículo de Chuam Li *et al.* (Chuam Li, 2008), después de una serie de experimentos, se realizaron algunas modificaciones y se obtuvo el siguiente protocolo:

Materia prima
Partículas de poliestireno de 2 μm de 1% de concentración
EDTA -Ácido Etilendiaminotetraacético
PBS –Tampón Fosfato Salino
Agua Desionizada y destilada
Tampón hipotónico (10 mM Fosfato de potasio, pH 7.4, 75mM NaCl, 155 mOsm/kg)
BSA - Albúmina de suero bovino
Portaobjetos y cubreobjetos

Tabla 4.1 Materia prima para protocolo de adherencia de partículas a Glóbulos Rojos

1. Se extraen aproximadamente 30 μl de sangre de una persona, picando la punta del dedo con una lanceta estéril, y se colocan en un tubo de centrifuga mejor conocido como tubo Eppendorf de 2 ml.
2. Se agregan a la sangre 3 μl de anticoagulante EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y 100 μl de PBS (Tampón fosfato salino) 1x y 7.4 pH. El PBS contiene cloruro de sodio (NaCl), fosfato de sodio (Na_2HPO_4), cloruro de potasio (KCl) y fosfato de potasio (KH_2PO_4); el PBS permite mantener el pH constante y es una solución no tóxica, por osmolaridad y concentración de iones (Cl^- , Na^+ y K^+), es muy semejante a la del líquido extracelular de los mamíferos (Laboratorio de Genómica Viral y Humana, 2008). Es el medio compatible tanto con los GR como con las partículas de poliestireno. Se mezcla cuidadosamente agitando el tubo y se deja reposar a 4 °C.
3. En otro tubo Eppendorf se agregan 100 μl de partículas de poliestireno de 2 μm (1% de concentración en agua desionizada), y 500 μl de agua filtrada, se agita el tubo y se lavan las partículas centrifugándolas a 1000 rpm por 60 seg, se retira el agua excedente, el proceso de lavado se repite 3 veces.
4. Se agregan, a las partículas lavadas, 100 μl de PBS y se mezclan en el vortex hasta ver que no queden partículas sedimentadas.
5. Se centrifuga la mezcla de sangre por 15 seg aproximadamente y se retira el excedente, esto para quitar el EDTA.

6. Se agregan 100 μl de PBS a la sangre y se agita el tubo cuidadosamente hasta que la sangre no se encuentre sedimentada.
7. En un nuevo tubo Eppendorf se colocan 10 μl de sangre y 30 μl de las partículas de poliestireno previamente lavadas. Se pueden hacer varias muestras variando la cantidad de partículas, las muestras obtenidas con mejor adherencia van de 20 μl – 30 μl de partículas. Puede existir algún caso especial en que esta cantidad varíe, esto debido a que en algunas personas pueden variar las cantidades de GR, pero en general esta fue la cantidad utilizada.
8. Se dejan reposar las muestras a 4 °C por 24 hrs, este tiempo de reposo fue en el que se observó mayor adherencia, sin embargo, a partir de las 2 hrs se observa un buen número de partículas adheridas a GR.
9. Se prepara el tampón hipotónico, este tampón ayudará a que los GR se hinchen y adquieran una forma casi esférica, esta mezcla dura para varios experimentos conservándola en el refrigerador y bien tapada, los componentes de tampón son los siguientes:
 - 10 mM fosfato de potasio
 - 75 mM Cloruro de sodio
 - 100 ml de agua filtrada

Se realiza la conversión de la concentración de los componentes a gramos por cada 100 ml de agua para obtener la cantidad necesaria de cada componente.

Para NaCl:

$$58.44 \frac{\text{mg}}{\text{mmol}} \times \frac{75 \text{ mmol}}{1000 \text{ ml}} \times 100 \text{ ml} \times \frac{1 \text{ gr}}{1000 \text{ mg}} = 0.438 \text{ gr}$$

Para fosfato de potasio:

$$136.09 \frac{\text{mg}}{\text{mmol}} \times \frac{10 \text{ mmol}}{1000 \text{ ml}} \times 100 \text{ ml} \times \frac{1 \text{ gr}}{1000 \text{ mg}} = 0.136 \text{ gr}$$

Se pesan los componentes y se mezclan con 100 ml de agua destilada.

10. Se prepara BSA (Albúmina de suero bovino) de 1 mg/ml . Se pesa un 1 mg de BSA y se mezcla con 1 ml de agua destilada en el vortex hasta que no se vean agregados solidos de BSA, esta mezcla dura también para varios experimentos y debe ser refrigerada. El BSA ayudará a que las partículas no se adhieran al cobre y porta objetos de la muestra final.
11. Se agrega, a la muestra de sangre con partículas que se dejó reposar previamente, $30\ \mu\text{l}$ de tampón hipotónico, se mezcla agitando cuidadosamente el tubo hasta que la mezcla se vea uniforme.
12. Se deja reposar la mezcla de $10 - 15\text{ min}$ a 37°C .
13. Se agrega una gota de aproximadamente $8\ \mu\text{l}$ de BSA a la muestra y se agita el tubo. Se toman $4\ \mu\text{l}$ de la muestra y se observa en el microscopio (figura 4.1).

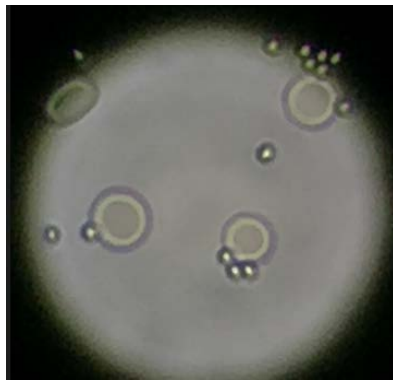


Figura 4.1 Partículas de poliestireno adheridas a glóbulos rojos: vista de microscopio

14. Antes de sacar la muestra de su estado de reposo en el refrigerador (paso 8) se da un tratamiento a los cubre y portaobjetos que serán utilizados en las pinzas ópticas. El tratamiento consiste en calentar los vidrios en agua desionizada a tal temperatura que permita la formación de pequeñas burbujas de agua sobre la superficie de los vidrios, como se muestra en la figura 4.2, este tratamiento se aplica durante 2 hrs. Se sacan los vidrios del agua cuidadosamente con unas pinzas y se secan completamente con una secadora. Se agrega una gota de $8\ \mu\text{l}$ de BSA y se expande sobre toda la superficie del cubre y porta objetos, se deja secando en el ambiente. Este tratamiento asegura que tanto las partículas como las células no se adhieran al vidrio, ya que el tratamiento deja una carga negativa en los vidrios que repele a las cargas negativas que prevalecen en la membrana celular y en la superficie de las partículas de poliestireno.



Figura 4.2 Tratamiento de porta y cubre objetos

15. Ya que están secos los vidrios, inmediatamente se toman $8 \mu\text{l}$ de la muestra final y se pone sobre el portaobjetos colocando encima de la gota el cubreobjetos, se sella la mezcla con un pegamento epóxico comercial de secado rápido, aproximadamente seca en 5 minutos. Es importante etiquetar la muestra con información del donador de sangre, la fecha y la concentración de partículas, como se observa en la figura 4.3.



Figura 4.3 Muestra final para prueba de tensión

16. Se coloca la muestra en las POHy se verifica que las partículas estén adheridas a la membrana celular. La figura 4.4 muestra el plano de atrapamiento visto con la cámara de video.

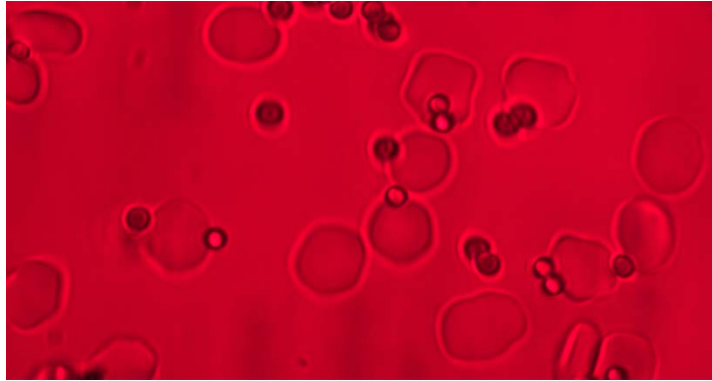


Figura 4.4 Muestra vista desde PO

4.1.2 Cultivo y crecimiento de líneas celulares

Las líneas celulares con las que se trabajó son las células H1299, c33a y HeLa y fueron proporcionadas por la Dra. Vanesa Olivares Illana del Laboratorio de Interacciones Biomoleculares y cáncer del Instituto de Física de la UASLP, el cultivo y crecimiento de las mismas se realizó por la Dra. Vanessa y su equipo de trabajo.

A continuación, se explica la procedencia de cada una de las líneas celulares y el método de crecimiento y cultivo que utilizan en el laboratorio:

La línea celular H1299 se estableció a partir de una metástasis de ganglio linfático de los pulmones de un paciente masculino caucásico de 43 años de edad que había recibido radioterapia previa. Las células contienen una delección parcial homocigótica del gen de la proteína p53 (es un gen supresor de tumores), por lo que carece de expresión de la proteína p53.

El medio de base de esta línea celular es RPMI-1640 (medio Roswell Park Memorial Institute, utiliza un sistema tampón de bicarbonatos, su pH es de 8.0 (Arora, 2006), el medio de crecimiento se complementa con la adición de los siguientes componentes al medio de base: suero bovino fetal a una concentración final de 10% y penicilina/streptomicina. Las células son crecidas en cajas de 10 cm a 37 °C y 5 % de CO₂ .

La línea celular c33a es un cáncer de cérvix de un paciente femenino de 66 años caucásico, exhibe un cariotipo hipodiploide con morfología epitelial. La proteína retinoblastoma (proteína supresora de tumores) está presente pero en un tamaño menor, la expresión de p53 es elevada.

La línea celular HeLa se aisló de cáncer cérvico-uterino de un paciente femenino adulto, se ha informado que contienen virus del papiloma humano 18 (18-HPV). La expresión de p53 se expresa en niveles bajos, con niveles anormales de la proteína Retinoblastoma.

El medio de base de las líneas celulares C33 y HeLa, es medio esencial mínimo de Eagle (medio elemental compuesto por aminoácidos esenciales). Para hacer que el medio de crecimiento esté completo, se añaden los siguientes componentes al medio de base: suero bovino fetal a una concentración final de 10% y penicilina/streptomina. Para los experimentos realizados en esta tesis las células fueron crecidas en cajas de 10 *cm* a 37 °C y 5 % de *CO*₂ .

4.1.3 Adherencia de partículas de poliestireno a células

Para la adhesión de partículas a las células se buscó algún protocolo ya existente, pero el único que se encontró (Youhou Tan, 2011) utiliza materiales con los que no se cuenta, por lo tanto, el protocolo es de nueva creación y nos basamos principalmente en el protocolo de GR y en la experiencia de la Dra. Olivares.

El protocolo de adherencia de partículas a las células es el siguiente:

Materia prima
Partículas de poliestireno de 2 μm de 1% de concentración
Tripsina
PBS -Tampón Fosfato Salino
Agua Desionizada y destilada
Portaobjetos y cubreobjetos

Tabla 4.2 Materia prima para protocolo de adherencia de partículas a Células

1. En un tubo Eppendorf se agregan 100 μ l de partículas de poliestireno de 2 μ m (1% de concentración en agua desionizada), y 500 μ l de agua filtrada, se agita el tubo y se lavan las partículas centrifugándolas a 1000 *rpm* por 60 *seg*, se retira el agua excedente, el procedimiento se repite 3 veces.
2. Se agrega tripsina a la caja donde se encuentra la línea celular y se vacía en un tubo de centrifuga de 15 *ml*, se agregan a la caja 100 μ l PBS para remover las células que pudieran quedar, se saca y se agrega al tubo, el tubo se llena con PBS hasta llegar a los 7 *ml*.
3. Se centrifuga inmediatamente en la centrifuga refrigerada, la temperatura de la centrifuga se regula a 4 °C y a una velocidad de 700 *rpm* durante 2 *min*.

4. Se desecha el líquido remanente, se agregan 9 ml de PBS y se vuelve a centrifugar con las mismas condiciones anteriores.
5. Se retira el líquido remanente, se agregan 600 μ l de PBS y se agita el tubo cuidadosamente. Es importante cuidar que la muestra se encuentre el mayor tiempo posible en hielo durante los intervalos de preparación de la centrifuga u otras preparaciones.
6. En un tubo Eppendorf se colocan 10 μ l de las células y de 10 o 20 μ l dependiendo de la concentración de células (entre mayor concentración de células, mayor debe ser la cantidad de partículas), se agita el tubo y se prepara la cantidad de muestras necesaria.
7. Se colocan las muestras en agitador rotativo y se dejan a 4 °C por 2 y 24 hrs respectivamente, estas muestras se utilizan para hacer pruebas de tensión durante 2 días. Después de este tiempo se sacan 4 μ l de la muestra y se ve al microscopio (figura 4.5).

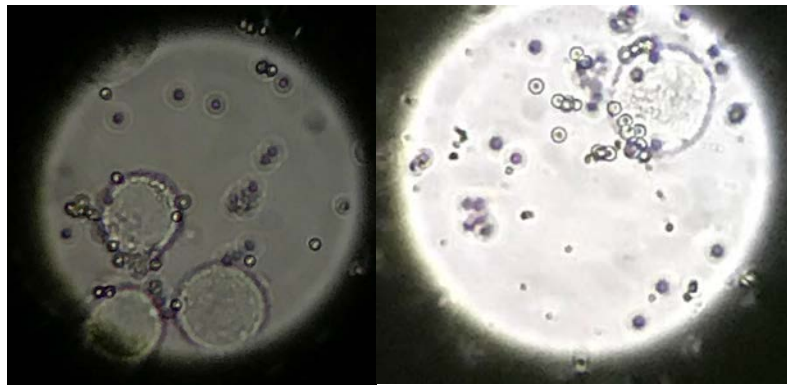


Figura 4.5 Muestras de H1299 y c33a vista desde el microscopio

8. Se realiza el tratamiento de porta y cubre objetos mencionado en el paso 14 del protocolo de adherencia de partículas a GR.
9. Se toman 8 μ l de la muestra y se colocan en el portaobjetos, se coloca encima de la gota de muestra el cubreobjetos y se sella la muestra con pegamento epóxico comercial de secado rápido. En la figura 4.6, se observa el plano de atrapamiento de la POH con la cámara, en este caso se pueden apreciar las células de pulmón con cáncer H1299 y es claro que su diámetro es considerablemente mayor al de las partículas de poliestireno y que su

estructura es significativamente más compleja que la de los glóbulos rojos estudiados anteriormente.

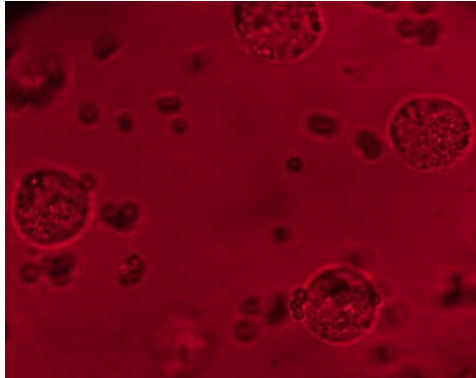


Figura 4.6 Muestra de H1299 vista en PO

4.2 Procedimiento de ensayo de tensión

Primeramente, se crean las imágenes de los dos puntos que servirán para atrapar y también se crean las imágenes sucesivas de los puntos desplazándose, la distancia de separación depende de la célula que se vaya a estudiar para GR va de $7.5 - 8 \mu m$ y para las líneas celulares de $20 - 30 \mu m$. Las imágenes se generan en Corel Draw a una medida de $1920 \times 1080 px$ (resolución de MEL), pero para ello se busca primero la relación entre pixel reales (Corel Draw), pixeles de cámara y relación en micras.

La relación entre pixeles de cámara y micras se calculó previamente y se menciona en el capítulo 2, $14.4 px = 1 micra$. Se crea una serie de imágenes en Corel Draw con separación de $100 px$, $150 px$, $200 px$ y $250 px$. Con esto se encontró que la relación de pixeles reales a pixeles de cámara es $1 px_{real} = 0.874 px_{cam}$. Con esta relación se crean las imágenes de separación de los puntos, para los GR de $7.5 a 12 \mu m$ y para las células de 20 hasta $35 \mu m$ debido a las variaciones de diámetro de las células, la separación se aumenta en pasos de $0.12 \mu m$, que es el paso mínimo que se puede dar en Corel Draw. Posteriormente en el programa de Matlab proporcionado por el Dr. Víctor Ruiz se transforman las imágenes en hologramas.

Se toman los hologramas necesarios para crear distintos videos dependiendo el diámetro de las células, los videos se hacen por cualquier programa disponible en internet para generación de GIF que permita regular la velocidad del video, en este caso se hizo de $6 fps$ (cuadros por segundo), y posteriormente, el video se inserta en Power Point para desplegarlo en tamaño completo de pantalla.

Teniendo ya los videos deseados se conecta la computadora al MEL y se despliega el holograma inicial, se atrapan dos partículas sueltas que no se encuentren adheridas a ningún tipo de célula y para asegurar que se pueda efectuar el ensayo de tensión se realiza la calibración de las POH en cada experimento, tal como se indica en el capítulo 3. Otra consideración que se toma para asegurar que se efectuó el ensayo de tensión, es probar el desplazamiento de las dos trampas sin estar adheridas a una célula, se observa que exista un desplazamiento de partículas adecuado y que éstas no se suelten durante la trayectoria completa. Se captura el video de las dos trampas para posteriormente encontrar el desplazamiento de las partículas por cada cuadro. La figura 4.7 muestra una pinza óptica dual atrapando a dos partículas micrométricas de poliestireno.



Figura 4.7 Dos partículas atrapadas en el medio biológico para la calibración de POH

Para iniciar el ensayo de tensión se marca en la pantalla de la computadora la posición de las trampas, se busca en la muestra a las células que tengan dos partículas adheridas en los extremos opuestos (figura 4.8), al localizarla se acomoda con la posición de las pinzas de tal forma que las partículas quedan alineadas horizontalmente (figura 4.9).

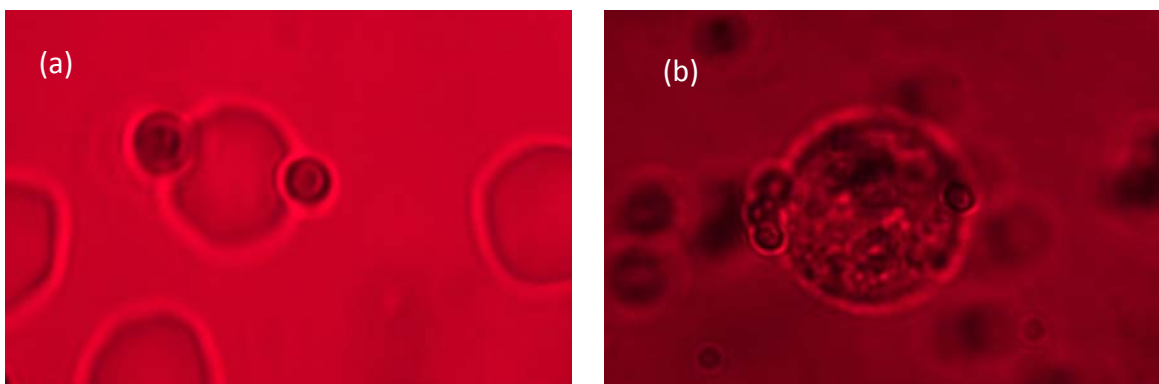


Figura 4.8 Localización de células con partículas para ensayo de tensión a) Glóbulo Rojo b) H1299

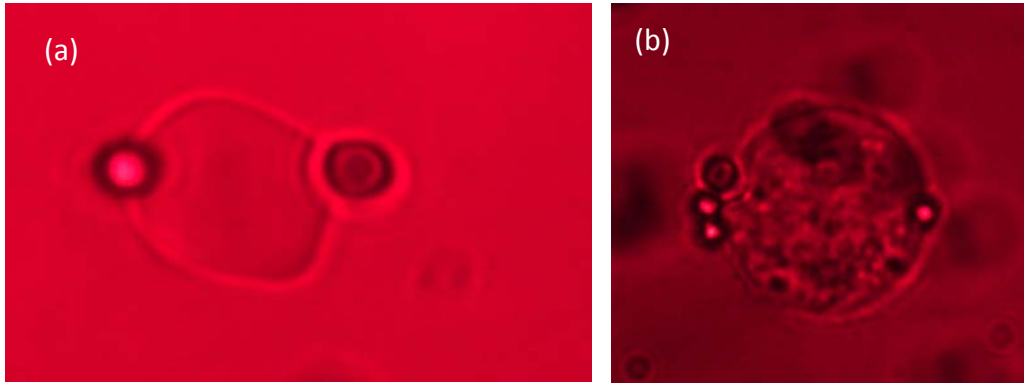


Figura 4.9 Acomodo de células en posición para ensayo de tensión a) Glóbulo Rojo b) H1299

Se bloquea la luz de láser para posicionar los dos puntos sobre las partículas de poliestireno y se sube la potencia del láser (figura 4.10). Para los GR la potencia que se utilizó fue de 30 mW , debido a que la hemoglobina absorbe la luz del láser y por lo tanto los GR se atraen muy rápidamente hacia la zona iluminada, de esta manera son empujados por la presión de radiación (fuerza de scattering o dispersión) hacia la pared del portaobjetos. Por otro lado, a potencias muy altas el GR muere debido a la fototoxicidad de la luz que provoca una degradación de proteínas. En el caso de las 3 líneas celulares, la fototoxicidad de la luz es menor debido a que no hay agentes de absorción de luz a esa longitud de onda, por lo que se utilizaron potencias de 45 mW , a potencias más altas no podemos asegurar que la trampa sea estable.

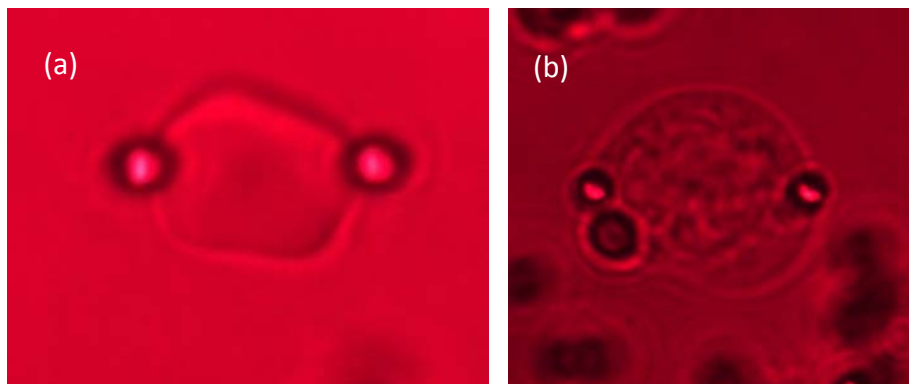


Figura 4.10 Células Estiradas a) Glóbulo Rojo b) c33a

4.3 Resultados

El objetivo principal de esta tesis es determinar propiedades mecánicas, módulo de elasticidad o módulo de Young y coeficiente de Poisson, de diferentes células mediante un ensayo de tensión. Estas propiedades, que han sido parámetros utilizados para caracterizar materiales en el área de la ingeniería en particular, recientemente han empezado a ser de utilidad en el estudio de células dado

que son esenciales para determinar el comportamiento de un material ante una fuerza aplicada, por lo que esto ayudará en el entendimiento de los cambios estructurales que sufre una célula ante alguna enfermedad.

4.3.1 Propiedades mecánicas: Modulo de elasticidad y Coeficiente de Poisson

Las fuerzas a las que se ve sometido un cuerpo pueden clasificarse en: fuerzas de cuerpo como son las fuerzas gravitacionales y magnéticas, y las fuerzas de superficie que son las fuerzas distribuidas sobre el área de contacto de los cuerpos. La fuerza (F) aplicada sobre un área (A) es llamada esfuerzo (Goodier, 1951).

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (4.1)$$

Existen dos tipos de esfuerzo, el esfuerzo normal (σ) que es la fuerza que actúa normal al área y el esfuerzo cortante, que actúa tangente al área (τ).

Cuando a un cuerpo se le aplica una carga ya sea de compresión o de tensión este cuerpo sufre una deformación. Las deformaciones pueden ser definidas como un cambio en la longitud del material. La deformación unitaria de un material se define como el cambio de longitud por unidad de longitud.

$$\varepsilon = \frac{L-L_0}{L_0} \quad (4.2)$$

Donde L es la longitud después de aplicar la fuerza y L_0 es la longitud inicial.

La elasticidad es la propiedad que tiene un cuerpo que ha sido deformado para regresar a su forma original al remover la carga aplicada, cuando este no regresa a su forma original llega a un estado de deformación plástica.

La ley de Hooke establece que para los materiales sujetos a tensión uniaxial el esfuerzo es directamente proporcional a la deformación unitaria, que es la Ley de Hooke.

$$\sigma = E\varepsilon \quad (4.3)$$

Donde E es el módulo de Young. Esta relación es válida hasta un valor de esfuerzo máximo llamado esfuerzo de cedencia.

En la siguiente figura se muestra un diagrama de esfuerzo-deformación en el cual se representan los límites elásticos, plásticos, punto de cedencia y de ruptura. Este diagrama varía dependiendo el material que se estudia.

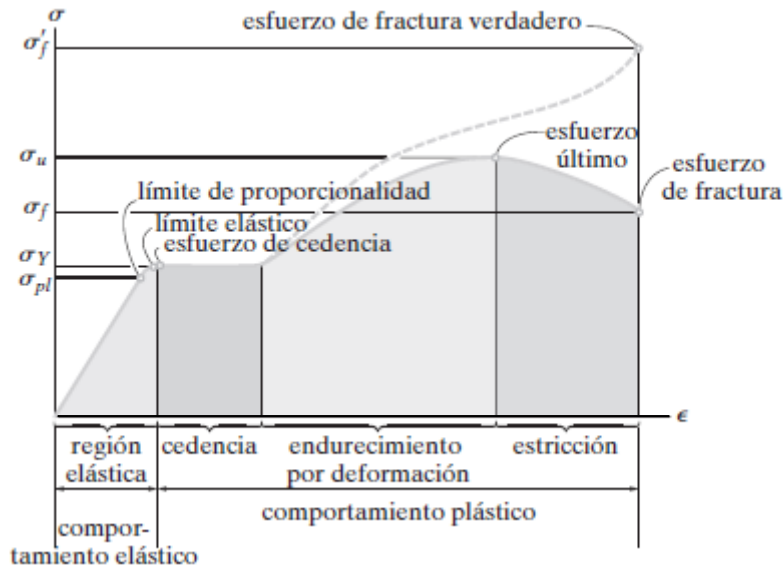


Figura 4.11 Diagrama esfuerzo deformación (imagen adaptada de (Villalba, 2017))

El coeficiente de Poisson se define como la relación entre la deformación transversal y la deformación longitudinal, que es en la dirección que se aplica la deformación. Se utiliza para saber qué tanto se extiende un material ortogonalmente a la dirección en donde se aplica la fuerza. El valor del coeficiente de Poisson (ν) de un material varía de 0 – 0.5.

$$\nu = \frac{\varepsilon_t}{\varepsilon_l} \quad (4.3)$$

Se presenta a continuación en la figura 4.12, una serie de datos del módulo de elasticidad y coeficiente de Poisson de distintos tipos de células y tejidos junto con el tipo de técnica con la que fueron medidos.

Cell type	Young's modulus (kPa)	Poisson's ratio	Technique
Adipocyte			
Human joint	0.61		AFM
Cancer cells			
Bladder carcinoma	0.4–1.4		AFM
Chondrosarcomas	1–2.5	0.4	AFM/C
Melanoma	0.3–2		MTC
Human osteosarcoma	0.92–1.09	0.37	MN
Chondrocyte			
Bovine articular	0.69–8	0.26	MN/C
Bovine cartilage	2.55–2.7		C
Human cartilage	0.36–0.67	0.4	MP
Human femoral	1.1–1.3	0.36–0.38	AFM/MP
Porcine cartilage	0.6–1.2		AFM
Endothelial			
Bovine aortic	0.32		MP
Bovine aortic cytoplasm	0.5		C
Bovine aortic nucleus	5		C
Human aortic	1.5–5.6		AFM
Undisclosed Endothelial	0.5		MP
Epithelial			
A549 human alveolar	0.1–0.2		MTC
Human bladder	10–13		AFM
Monkey kidney cortex	0.16		MTC
Monkey kidney interior	0.04		PT
Fibroblast			
Avian heart	14.7		C
Murine L929	4		AFM
Murine 3T3	0.015–14		AFM/MN/PT/S/C/OT
Muscle cells			
Mouse myoblast C2C12	2		C
Mouse myogenic C2-7	0.66		S
Rat aortic smooth muscle	1.5–11		S
Rat myocyte (cardiac)	35–42		AFM
Osteoblast			
Human femoral	2.0–5.8		AFM
Human SaOS2	5.4–7.6		AFM
Murine MC3T3-E1	1–5		AFM
Murine neonatal long bone	14		AFM
Rat neonatal long bone	3.175–10	0.2–0.5	AFM
Stem cells			
Human bone marrow	0.56–33		AFM/MP
White blood cells			
Lymphocyte	0.2913		MN
Neutrophil	0.118		MN
Rat neutrophil	0.38–0.8		AFM

Figura 4.12 Modulo de Elasticidad y Coeficiente de Poisson de algunas células (Marita L. Rodriguez P. J., 2013).
 Descripción de técnicas: AFM: Microscopia por Fuerza Atómica, C: Compresión, MN: Micro aguja, MP: Aspiración por Micropipeta, MTC: Citometría Magnética por torsión, OT: Pinzas Ópticas, PT: Rastreo de partícula y S: Estiramiento

En las siguientes secciones se muestran los resultados del ensayo de tensión de cada una de las células y algunos resultados del comportamiento de la célula considerada como un resorte (constante elástica del resorte), es importante tomar en cuenta que en las gráficas que se presentan no se muestran barras de error. Esto es debido a una serie de consideraciones y variaciones que se presentaron por el tipo de experimento y las cuales se enlistan a continuación:

- a) Vibraciones del edificio.
- b) Variaciones de modulador espacial de luz.
- c) Variaciones de la constante de rigidez de la pinza.
- d) Errores de variación en el desplazamiento de partículas sin adherencia a células.
- e) Mediciones directas de radio de contacto de partículas y células.
- f) Mediciones de deformación directa para cálculo de coeficiente de Poisson.
- g) Inexactitud en la posición de adherencia de la partícula a estirar.

En el caso especial de los GR se realiza cada estudio por separado por persona y por día debido a que:

- h) Cada individuo tiene distintas características fisiológicas.
- i) La constante de resorte (elasticidad de los GR) varía diariamente.
- j) Los GR aunque sean del mismo individuo, unos llevan más tiempo dentro del cuerpo que otros.

En el caso de las células:

- k) En el ensayo de tensión no se realizó un video para la separación de las partículas como el caso de los GR, esto provoca un paso no controlado en el desplazamiento de partícula y diferencias entre cada célula.
- l) Los tiempos de estudio entre cada célula lo cual modifica su estructura interna, al igual que no existen condiciones térmicas controladas.

4.3.2 Resultados de Ensayo de Tensión Glóbulos Rojos

Se realizó el ensayo de tensión a un conjunto de Glóbulos Rojos (GR) de tres individuos en distintos días. El mismo glóbulo de cada individuo se estiro de 1 a 3 veces. El número de experimentos realizados sobre una misma célula varía debido a diversos factores: pérdida de la ubicación de la

célula, adhesión de alguna de las partículas a vidrios de la muestra, entre otros; el experimento se realizó sólo hasta un máximo de 3 veces por algún daño que pueda sufrir el GR a causa del láser.

Los GR se encuentran identificados de la siguiente de manera, por ejemplo: *BetA 1*, la primera parte (*Bet*) identifica a la persona a la cual corresponde el GR, *A* es la identificación del día del experimento y el número siguiente es la identificación del GR que se estiró. Es importante considerar que los resultados se pueden ver afectados por vibraciones de la mesa óptica causadas por movimientos externos, que a pesar de ser pequeños en la escala del laboratorio, a la escala del experimento realizado dichas vibraciones pueden afectar mucho los resultados.

Para el cálculo de la fuerza de la pinza (fuerza de estiramiento) se utiliza la siguiente ecuación, que se mencionó en el capítulo 2:

$$F = k\Delta x \quad (4.4)$$

Donde k es la rigidez de la pinza y Δx la definimos como $x' - x$, donde x' es la posición de la partícula a la que se le aplica el desplazamiento sin GR adherido y x es la posición de la partícula adherida al GR, a la cual se realiza el ensayo de tensión.

La potencia utilizada para el estiramiento fue de $30 - 35 \text{ mW}$ con lo cual la constante del resorte varía entre experimentos de $2.4 - 3 \frac{\text{pN}}{\mu\text{m}}$.

Antes de presentar los resultados de la deformación de los ensayos de tensión de los GR, se presenta el análisis que se realizó para cada GR, en el cual se observa el comportamiento del desplazamiento de las partículas adheridas a los GR.

La figura 4.13 muestra los desplazamientos de la partícula sin adherir a un GR desplazadas mediante la pinza óptica y dos ejemplos de partículas adheridas a un GR y desplazadas por la pinza óptica, simulando un ensayo de tensión del GR.

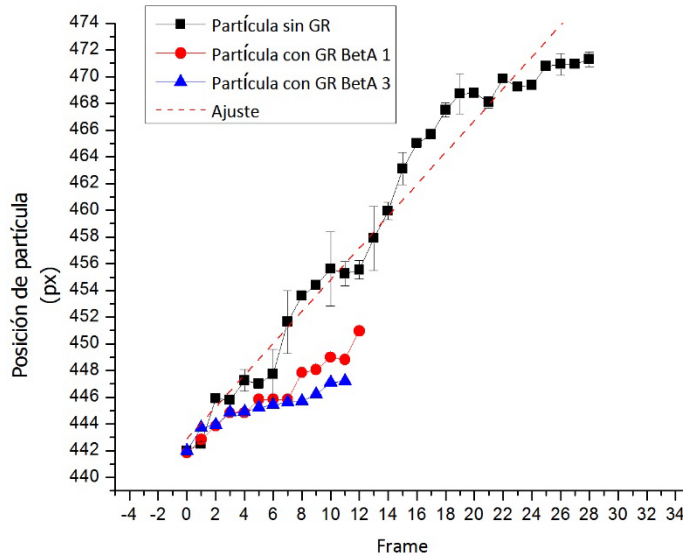


Figura 4.13 Gráfica de posición vs cuadro de imagen de dos GR distintos

Se puede observar como el desplazamiento de las partículas con GR por cada cuadro de imagen es menor que el de la partícula sin GR, esto se debe a la resistencia que opone GR al ser estirado, por lo que la diferencia entre la posición de la partícula con y sin GR es proporcional a la fuerza de restitución del mismo. Este mismo análisis fue realizado para cada GR estirado.

Por otro lado, en la figura 4.14 se muestra, también para cada partícula adherida a un GR estirado, la posición de la partícula adherida a un GR como función de la posición de una partícula libre (sin GR). En esta figura se traza una línea a 45° para mostrar que la tendencia del desplazamiento sea por debajo de ésta, se puede observar también que, aunque los GR son distintos, el comportamiento del desplazamiento es muy parecido, esto es repetitivo en cada experimento.

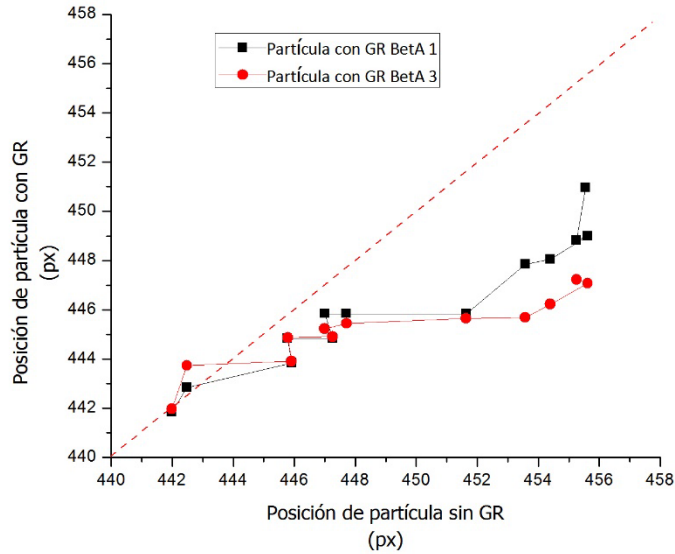


Figura 4.14 Gráfica de posición de partícula sin GR vs posición de partícula con GR, de dos GR distintos

Para asegurar que un GR no haya sufrido deformación plástica después de haber sido tensionado la primera vez, se tensiona nuevamente y se analizan las gráficas de posición por cuadro de imagen, si existe deformación plástica se podrá observar un salto en el comportamiento del GR estirado la segunda vez, este salto se acercara más al desplazamiento sin GR, al igual en la gráfica de posición con GR por Posición sin GR se observará un desplazamiento mayor, o bien un salto en la posición del GR estirado la segunda vez, si no existe deformación plástica la tendencia de los dos estiramientos será muy parecido como se muestra en la gráfica 4.15 y 4.16., se realiza el mismo análisis para cada ensayo de tensión que se le aplico al GR. Las figuras 4.15 y 4.16 muestran los resultados que se obtuvieron de estirar la célula *BetA 3* dos veces. Para los dos análisis de desplazamiento de partícula se observa que el comportamiento del desplazamiento es el mismo, y que el GR no presenta una deformación permanente al ser estirado la primera vez.

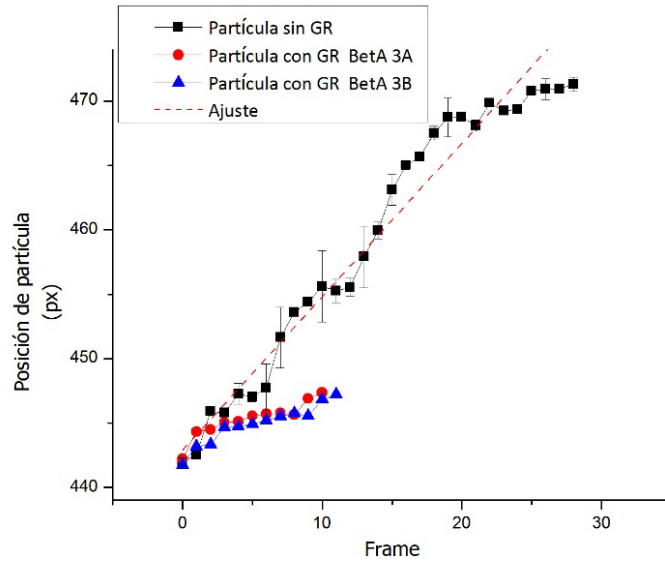


Figura 4.15 Gráfica de posición vs cuadro de imagen de GR estirado dos veces

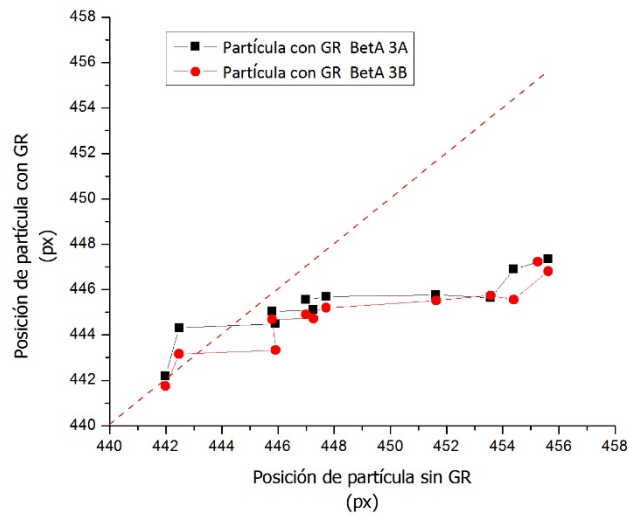


Figura 4.16 Gráfica de posición de partícula sin GR vs posición de partícula con GR, GR estirado dos veces

La figura 4.17 muestra la gráfica de fuerza – deformación del mismo GR estirado dos veces.

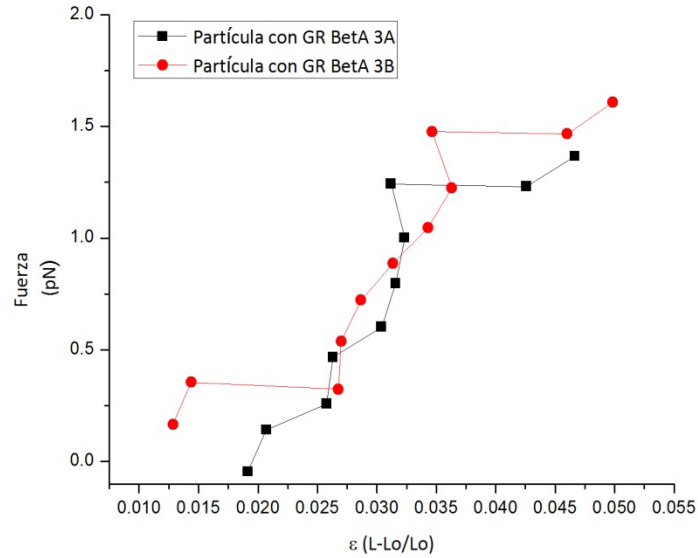


Figura 4.17 Gráfica de Fuerza deformación de mismo GR estirado dos veces

Se puede observar que el comportamiento en los dos estiramientos es similar, ambos estiramientos se encuentran en un rango de fuerza y deformación muy cercano. Este análisis fue realizado para todos los GR, esto nos asegura que no haya existido una deformación plástica desde la primera vez que se aplicó en ensayo de tensión y que afecte los resultados finales.

Existieron 2 casos en los cuales se realizó el ensayo de tensión a GR que no se hincharon por completo (figura 4.18), esto puede ser debido a algún factor externo, como la temperatura, cantidad errónea de tampón o bien a un factor del propio de GR. Como se mencionó en la sección anterior los GR son tratados con un tampón hipertónico para que se hinchen y tengan una geometría esférica, de tal manera que exista mayor probabilidad de adherencia de las partículas en extremos opuestos del GR.



Figura 4.18 GR no hinchado por completo

Estos GR sufrieron una ruptura en la estructura interna en el primer estiramiento, se puede observar en la figura 4.19 como el desplazamiento de la partícula del primer estiramiento del GR (*BetA 2A*) se encuentra muy cercana al desplazamiento de la partícula sin GR, esto puede indicar que GR ya presentaba algún problema internamente. Se puede apreciar que la última posición de la partícula del segundo estiramiento del GR (*BetA 2B*) es un salto muy grande, inclusive mayor a la posición de la partícula sin GR y es donde existe la ruptura en la estructura interna o bien donde ocurrió la deformación plástica. Esto también se observa en la figura 4.20, donde la última posición de la partícula del GR estirado la segunda vez sobrepasa la línea de 45°.

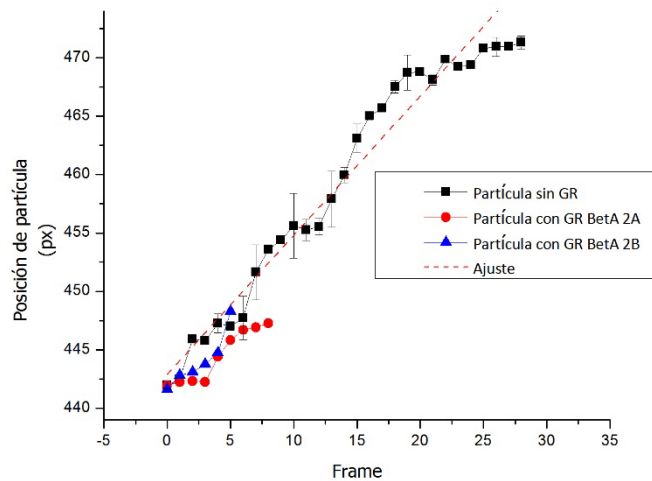


Figura 4.19 Gráfica de posición vs cuadro de imagen de GR no hinchado por completo

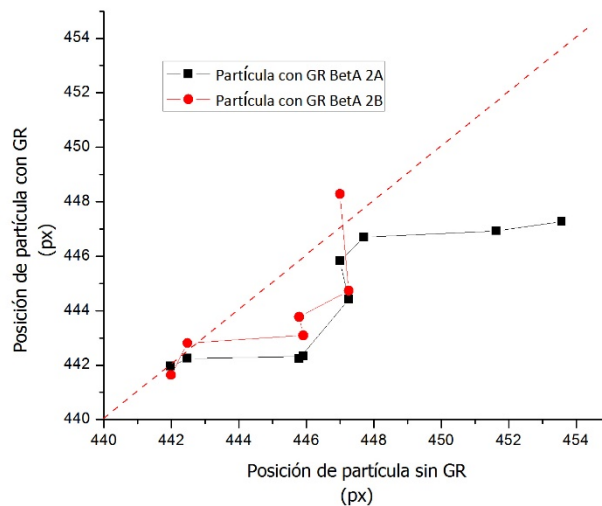


Figura 4.20 Gráfica de posición de partícula sin GR vs posición de partícula con GR de GR no hinchado por completo

Se puede ver en el desplazamiento del GR *BetA 2B* que hay un salto grande en la última posición, lo cual indica que después del primer estiramiento hubo una ruptura en la estructura interna del GR, esto se asegura con la siguiente gráfica de fuerza- deformación (figura 4.21).

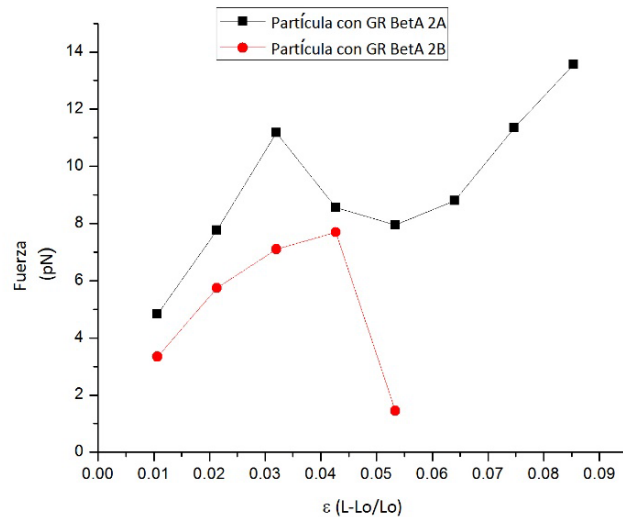


Figura 4.21 Gráfica de Fuerza- Deformación de GR no hinchado por completo

Se puede observar que en el segundo estiramiento después de cierto punto la deformación es muy grande con una fuerza muy pequeña, por ello los resultados que se deben tomar en cuenta son los ensayos de tensión realizados a GR hinchados completamente por medio del tampón hipotónico utilizado.

Las gráficas de fuerza deformación nos proporcionan el comportamiento del GR y nos permitan obtener los resultados de las propiedades mecánicas de éstas.

La figura 4.22 muestra los resultados de los GR sometidos a tensión de un individuo, es importante considerar que las variaciones que puedan existir entre resultados pueden ser debidos a las vibraciones mencionadas anteriormente y a las pequeñas variaciones que ocurren en el desplazamiento debido al MEL.

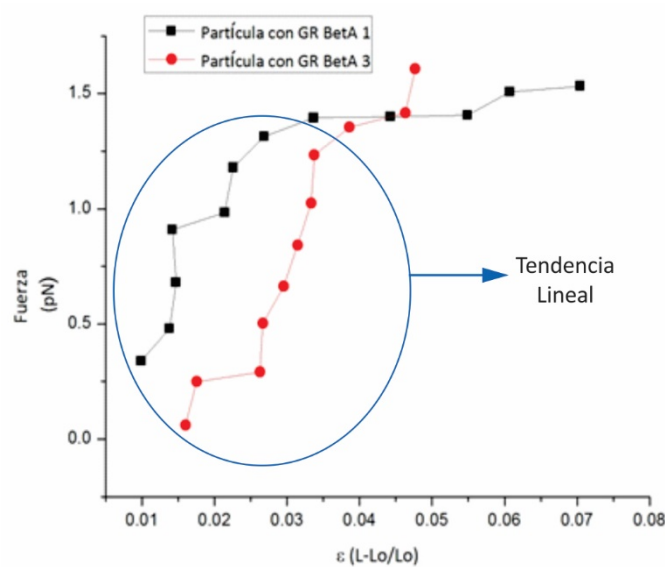


Figura 4.22 Gráfica de Fuerza -Deformación de GR Beta

Se puede observar que para *Beta 1* y *Beta 3* el comportamiento al inicio del estiramiento es lineal y los valores fuerza deformación son muy cercanos entre los dos GR, después llega un punto en donde el comportamiento de los dos GR llega al ser casi constante, lo que pudiera indicar que se llega a deformar otra parte de la estructura del GR en la cual no opone tanta resistencia como al inicio.

En la figura 4.23 se muestra un comportamiento distinto, en primer lugar, el GR es de un individuo distinto, y en este caso el MEL tuvo cierta variación en el cambio de paso de desplazamiento, se observa una pequeña regresión en el paso y la fuerza a vencer por esto es mayor, este GR también presenta desplazamientos donde la fuerza es constante como se muestra en la gráfica de Fuerza-deformación de BetaA (Figura 4.22).

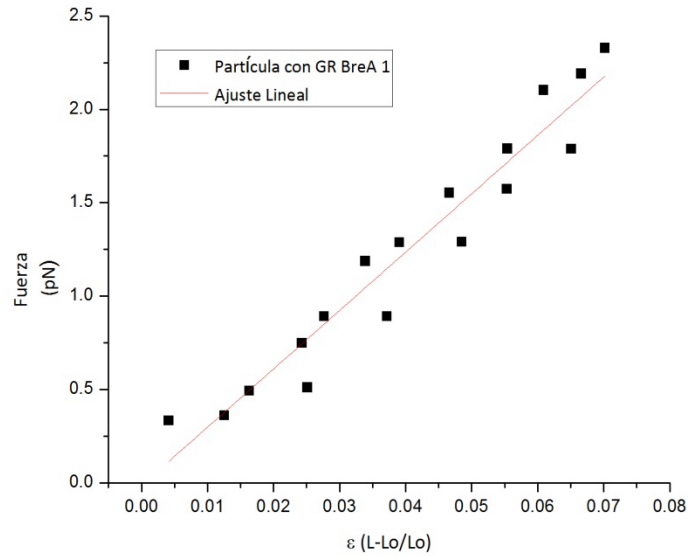


Figura 4.23 Gráfica de Fuerza -Deformación de GR BreA

Por otro lado, la figura 4.24 muestra la relación fuerza-deformación para el GR de un tercer individuo. En el primer GR (*NanB 1*), se puede apreciar un comportamiento distinto al de los otros dos GR, ya que después de las tres primeras deformaciones con comportamiento lineal, se observa un comportamiento parabólico con mayores deformaciones a un aumento de fuerzas menor, a diferencia de los otros dos GR, esto se debe a que una de las partículas se encontraba adherida en la parte frontal de la membrana y no en extremos opuestos, como se muestra en la figura 4.25. Aunque no se toma en cuenta para las propiedades mecánicas del GR, sí es importante observar el comportamiento ya proporciona información sobre la membrana del GR, que puede ser relacionado con las características de un material hiperelástico neo-hookeano como se detalla en la figura 4.26 y que se abundará en el siguiente capítulo o bien se podría estar flexionando al GR por la posición de sujeción las partículas.

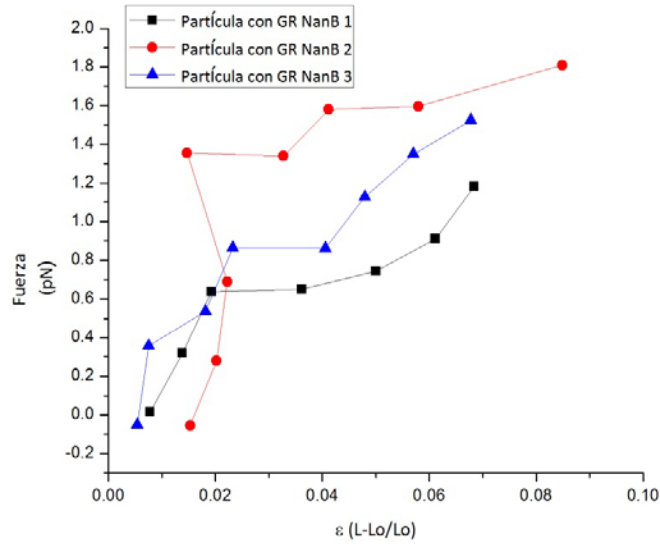


Figura 4.24 Gráfica de Fuerza -Deformación de GR NanB

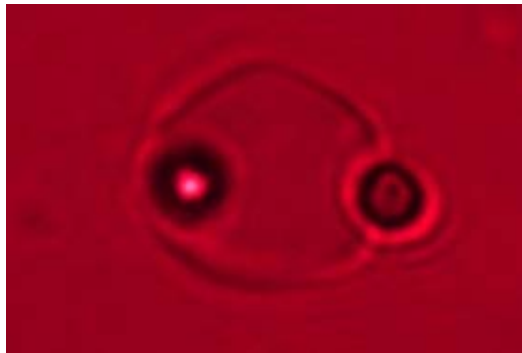


Figura 4.25 Partícula adherida en la parte frontal de la membrana del GR

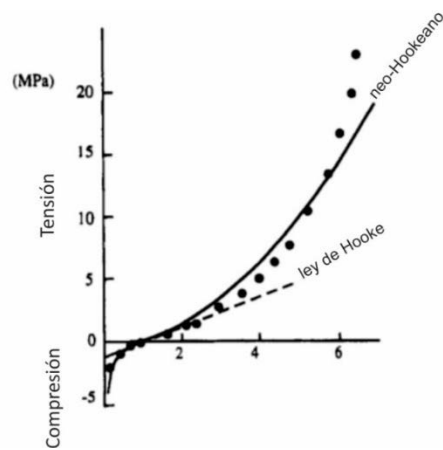


Figura 4.26 Gráfica de esfuerzo-deformación de una liga considerando como un material hiperelástico Neo-hookeano (imagen adaptada de (Macosko, 1994))

De los GR *NanB 2* y *NanB 3* se aprecia un comportamiento similar al de los GR presentados en la primera gráfica (figura 4.17) de *BetA 1* y *BetA 3*

En la figura 4.27 se muestran resultados de otros GR distintos, donde se observa un comportamiento similar a lo anterior, las fuerzas y deformaciones se encuentran dentro del mismo orden de fuerza y deformación, aunque la partícula de GR de *BrenB 2* se suelta antes de la trampa y no se aprecia el comportamiento completo.

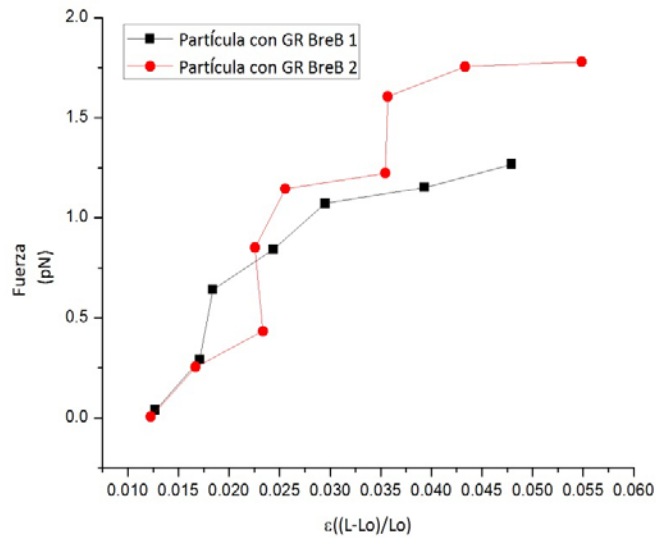


Figura 4.27 Gráfica de Fuerza -Deformación de GR BreB

Para los siguientes casos (figuras 4.28 y 4.29) se tomaron los videos con un número de cuadro/segundo mayor, en lo cual se observa más detallado el comportamiento del GR.

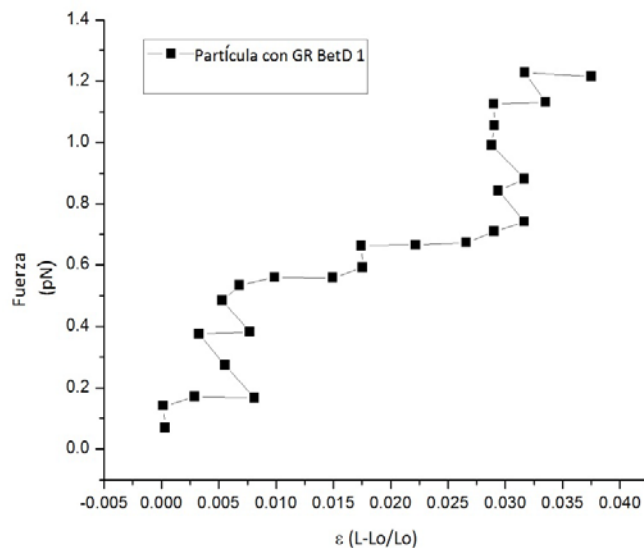


Figura 4.28 Gráfica de Fuerza -Deformación de GR BetD

En este ensayo de tensión se observa al igual que en el segundo resultado mostrado (*BrenA*), que el MEL tiene una pequeña variación en el desplazamiento, por ello se observa que la deformación en algunos puntos es menor y la fuerza mayor. Aun así, el comportamiento de GR es similar al de los casos anteriores y al caso que se presenta a continuación.

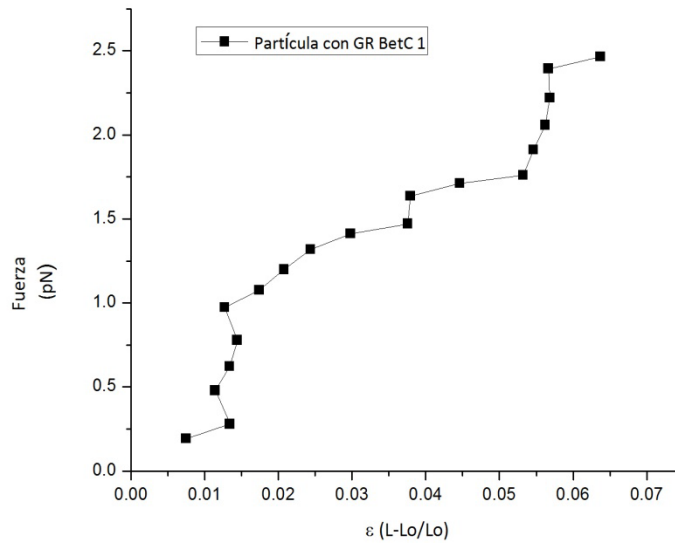


Figura 4.29 Gráfica de Fuerza -Deformación de GR BetC

Cabe mencionar que las fuerzas y las deformaciones que se obtuvieron se encuentran dentro del rango de magnitud de las obtenidas en el artículo de Chuan Li *et al.* (Chuan Li Y. -P.-K., 2008) (Figura 4.30).

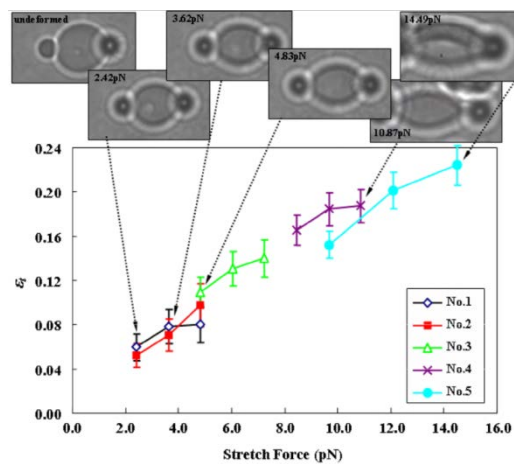


Figura 4.30 Gráfica de Fuerza -Deformación de experimento de Chuan Li et al. (Chuan Li Y. -P.-K., 2008)

El método experimental que utilizan en ese artículo son Pinzas Ópticas, al igual que en nuestro experimento, se adhieren partículas de poliestireno a los GR, no se menciona claramente en el artículo cómo sujetan la partícula que no está siendo estirada, podemos suponer como se ha realizado en la mayoría de los experimentos de tensión con PO que una de las partículas es adherida al cubre objetos de la muestra. Utilizan un láser infrarrojo de 1064 nm , este tipo de láser no daña al GR. En nuestro experimento se utilizó un láser verde de 532 nm , que como se mencionó anteriormente, la hemoglobina absorbe este tipo de luz, por lo tanto, el estiramiento del GR se realizó a menores deformaciones ya que el GR es empujado por la presión de radiación.

Para calcular el coeficiente de Poisson se realiza una medición directa y aproximada por medio de *Image J*, se mide el diámetro longitudinal y el diámetro transversal del cuadro de imagen del inicio del ensayo de tensión y del cuadro de imagen hasta donde se suelta la partícula. Por medio de la siguiente ecuación se calcula el coeficiente de Poisson

$$\nu = \frac{\frac{D_t - D_{ot}}{D_{ot}}}{\frac{D_l - D_{ol}}{D_{ol}}} \quad (4.5)$$

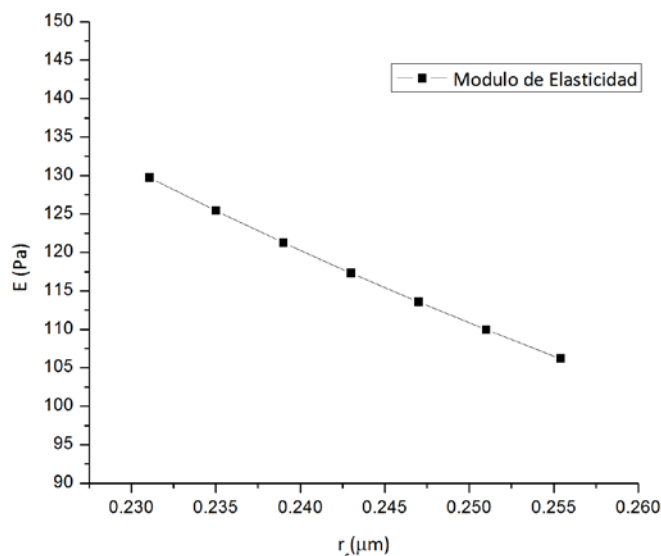
Donde D_t es el diámetro transversal final, D_{ot} es el diámetro transversal inicial, D_l es el diámetro longitudinal final y D_{ol} es el diámetro longitudinal inicial.

Para calcular el módulo de elasticidad o módulo de Young, se calcula primeramente el esfuerzo. El esfuerzo que se calculara es en el área crítica, ya que es donde se presenta el mayor esfuerzo, esta área es el área de contacto entre la membrana del GR y la partícula adherida a ella.

$$\sigma = \frac{F}{(\pi r_c^2)} \quad (4.6)$$

Donde la F es la fuerza donde ocurrió la máxima deformación y r_c es el radio de contacto aproximado de la membrana del GR y la partícula de poliestireno, este radio se calcula por medio de diámetro de cada partícula que se estiro y la profundidad de adherencia máxima que se pueda tener. En la figura 5.31 se muestra la gráfica de la variación que puede existir en el módulo de elasticidad con respecto al error máximo que se pueda presentar por la variación de radio de contacto, esta variación se calculó tomando en cuenta que el proveedor de partículas de poliestireno menciona que el diámetro de la partícula puede variar $\pm 5\%$, donde se toma una media del radio de contacto r_c de $0.243\ \mu\text{m}$, el mínimo valor de $0.231\ \mu\text{m}$ y el máximo de $0.255\ \mu\text{m}$, se calculan los valores del módulo de elasticidad para valores dentro de este rango. Se obtiene un promedio de 117 Pa y una

desviación estándar de $8.43 Pa$. Este es el máximo error que se puede presentar en el módulo de elasticidad.



4.31 Variación del módulo de elasticidad con respecto al radio de contacto r_c

Los resultados que se obtuvieron para el módulo de elasticidad de los GR son los siguientes:

Glóbulo Rojo	Coficiente de Poisson ν (± 0.05)	Módulo de Elasticidad E (Pa) (± 6.09)
<i>BetA 1</i>	0.32	118.27
<i>BetA 3</i>	0.38	147.902
<i>BreA 1</i>	0.39	101.06
<i>NanB 1</i>	0.49	91.21
<i>NanB 2</i>	0.44	115.26
<i>BrenB 1</i>	0.45	137.13
<i>BrenB 2</i>	0.42	157.24
<i>BetC 1</i>	0.46	190.81
<i>BetD 1</i>	0.5	159.67

Tabla 4.3 Resultados de propiedades mecánicas, módulo de elasticidad y coeficiente Poisson de GR

En la literatura se reportan módulos de elasticidad de $500 \pm 50 Pa$ (Paul B. Bareil, 2007), $74.5 - 745 Pa$ (Discher, 2001), $298 - 745 Pa$ (Waugh, 1987) y $174.33 - 313 Pa$ (Chuan Li Y. -P.-K., 2008), podemos observar que los valores de módulo de elasticidad son

variados, y en nuestro caso los valores obtenidos se encuentran dentro de los encontrados en la literatura. Entre los resultados no existe una diferencia amplia ya que tenemos un promedio de $143.04 \pm 47.8 Pa$. El Coeficiente de Poisson reportado en la literatura varía de $0.3 - 0.5$ (Young-Zoon Yoon, 2008) (J. Li, 2005)), en nuestro caso los GR estudiados se encuentran dentro de este rango.

Es importante mencionar que en nuestro estudio hay una serie de factores de variación o error que deben ser considerados, por causas que ya se comentaron anteriormente. Estos factores los encontramos en el coeficiente de Poisson en donde, por ser un cálculo de medición directa, existe un error aproximado de ± 0.05 pixeles en cada distancia medida y en el módulo de elasticidad en donde se tiene una propagación de error de ± 6.09 debido a la variación en el cálculo de la diferencia de posición de la partícula Δx , la rigidez de la trampa K y el radio de contacto r_c . Este valor de propagación del error se obtuvo al realizar un cálculo de la varianza por medio del valor máximo y mínimo que se pueden tener de cada uno de los errores que influyen en nuestro cálculo.

4.3.3 Resultados de Ensayo de Células Cancerosas

En el estudio de las distintas células cancerosas se realizó el mismo procedimiento que en los GR para el cálculo de esfuerzos, fuerzas y deformaciones, a excepción del desplazamiento de la partícula sin célula; este ajuste se tomó de manera general para todas las células, debido a que a la velocidad de la separación se realizaron los GR era muy rápida y las células se soltaban rápidamente debido a su respuesta viscoelástica. Como la estructura de cada tipo de célula es distinta se decidió hacer la separación de partículas de forma manual (sin video), por esto es que se presentarán algunos resultados con detalles particulares, o cambios de deformación grandes y las gráficas de estiramiento se muestran por separado.

No se ha encontrado en la literatura datos de las propiedades mecánicas de estas células cancerosas, ni de las células sanas de su misma línea celular. Se presentarán solamente los resultados obtenidos de módulo de elasticidad y coeficiente de Poisson.

Es importante tomar en cuenta los errores por vibraciones externas y por variaciones de Modulador Espacial de Luz (MEL).

La nomenclatura que se presenta en cada gráfica está representada por ejemplo como: *H1299 1A*, donde la *H1299* es la célula estudiada, *1* es el número de célula que se estudia, y *A* es el día que se efectuó el experimento.

4.3.3.1 Células H1299

Las células estudiadas H1299 del ensayo de tensión tienen diámetros de 20 – 25 μm (figura 4.32).

La constante de resorte utilizada es de 9.3 $\frac{\text{pN}}{\mu\text{m}}$.

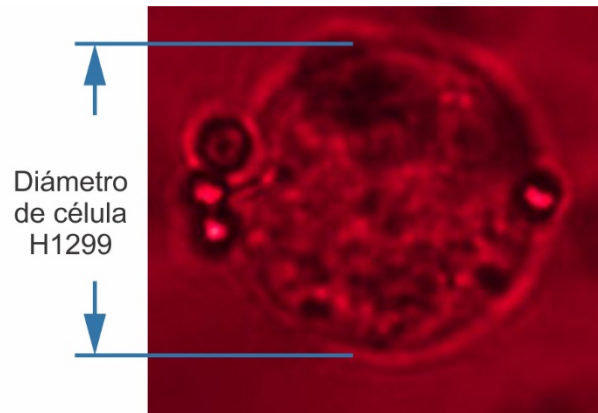


Figura 4.32 Diámetro de célula H1299

En el primer ensayo de tensión (figura 4.33), se puede observar una deformación muy grande de 0.005 a 0.15, esto puede ser debido al cambio de desplazamiento no controlado, por los demás valores se puede observar que hay una tendencia lineal.

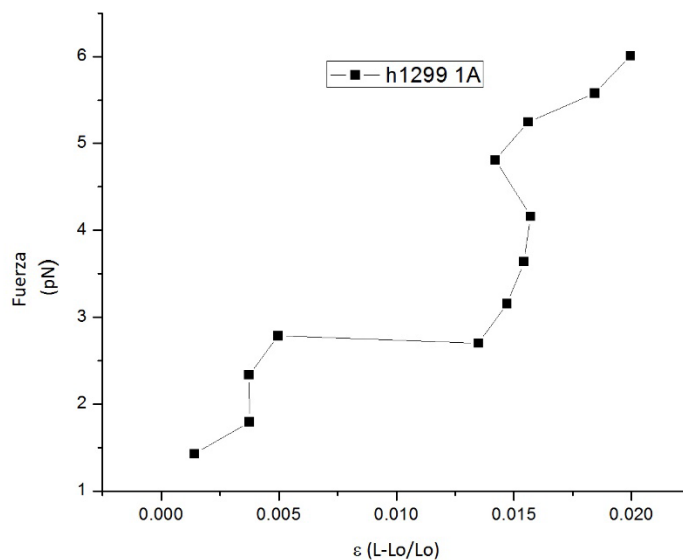


Figura 4.33 Gráfica de Fuerza -Deformación h1299 1A

En las figuras 4.34, 4.35 y 4.36, el comportamiento es muy similar en cada caso, esto ocurre porque son células que se han reproducido en un mismo medio, son replicas unas de las otras, las

diferencias que puedan existir entre ellas son debidas a las condiciones mencionadas en un principio.

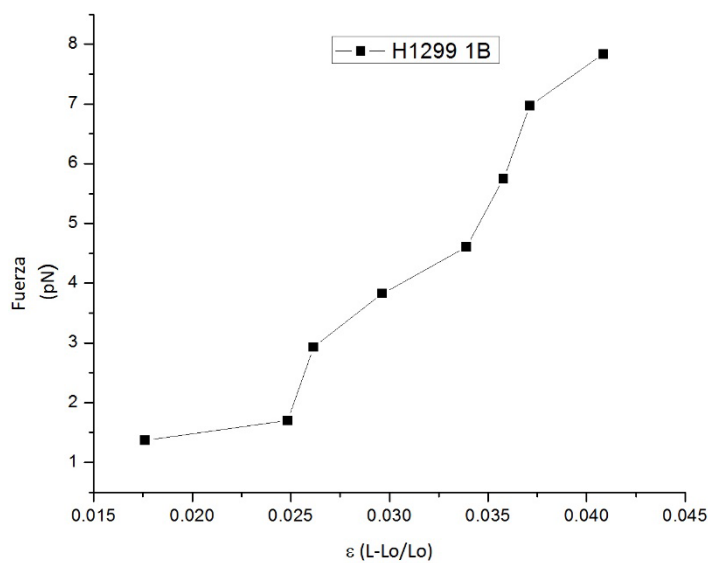


Figura 4.34 Gráfica de Fuerza -Deformación h1299 1B

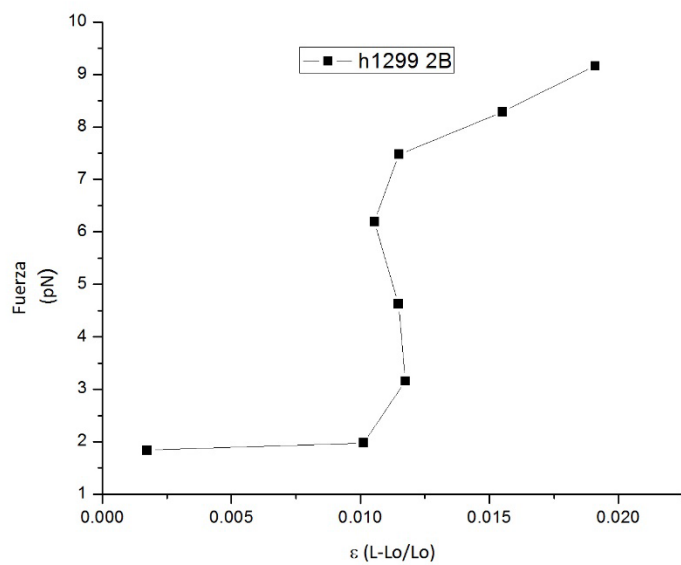


Figura 4.35 Gráfica de Fuerza -Deformación h1299 2B

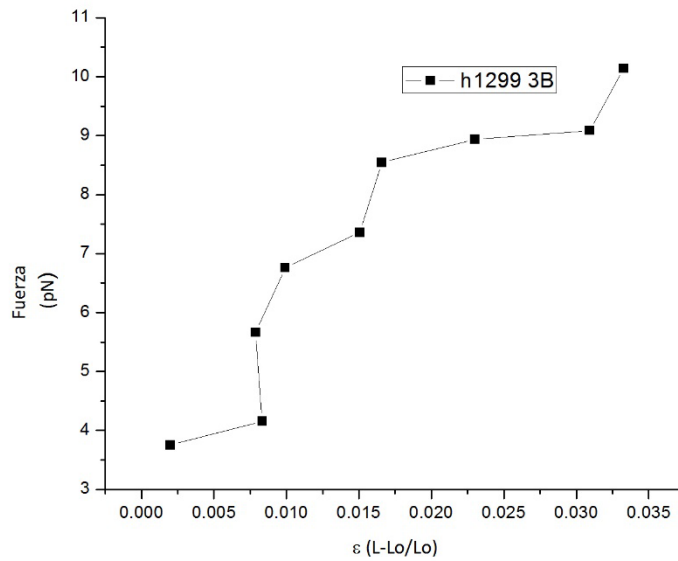


Figura 4.36 Gráfica de Fuerza -Deformación h1299 3B

Se obtienen resultados de Módulo de elasticidad y coeficiente de Poisson, se presentan en la tabla 4.2:

Célula	Coefficiente de Poisson $\nu (\pm 0.05)$	Módulo de Elasticidad $E(\text{Pa}) (\pm 6.09)$
H1299 1A	0.411	1399.73
H1299 1B	0.497	969.22
H1299 2B	0.393	2125.33
H1299 3B	0.49	1425.67
H1299 4B	0.479	1105.22

Tabla 4.4 Resultados de propiedades mecánicas, módulo de elasticidad y coeficiente Poisson de h1299

Se obtiene un promedio de módulo de elasticidad de $1.4 \pm 0.72 \text{ kPa}$ y un coeficiente de Poisson de $0.45 \pm .05$.

4.3.3.2 Células c33a

Este primer conjunto de células estudiadas c33a A (figura 4.37-4.40), tienen un tiempo de reposo donde se dejaron adherir las partículas con las células 2hrs. La rigidez de la trampa calculada en este día es de $8.6 \frac{\text{pN}}{\mu\text{m}}$. El tamaño de estas células varia de $15 - 18 \mu\text{m}$

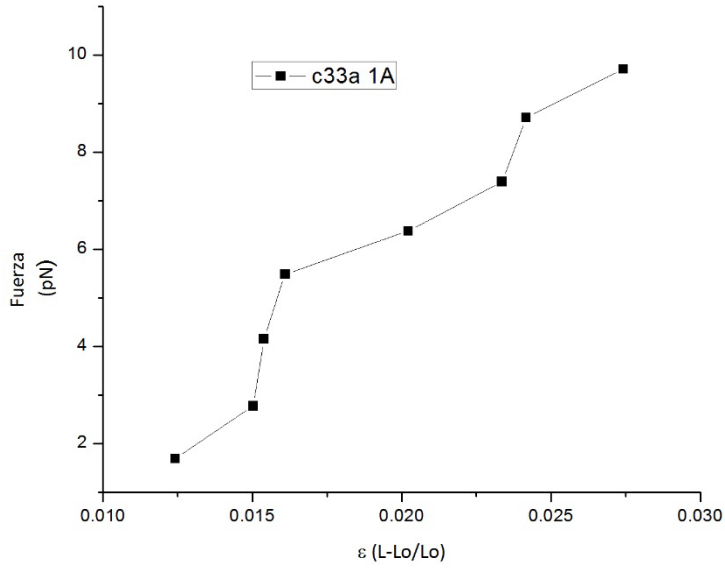


Figura 4.37 Gráfica de Fuerza -Deformación c33a 1A

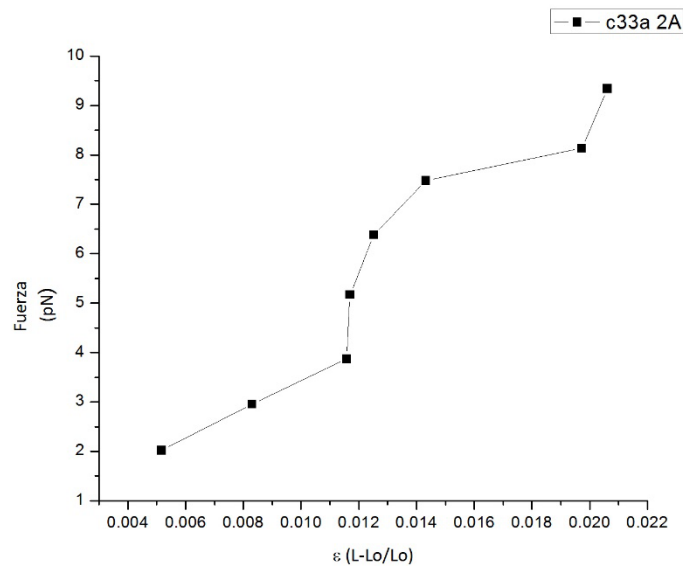


Figura 4.38 Gráfica de Fuerza -Deformación c33a 2A

En la figura 4.38 se observa que hay un mayor número de mediciones, lo que puede significar que se dieron pasos más cortos y continuos al desplazar la partícula. Las regresiones de deformación son debidas a las vibraciones o bien a la variación del modulador

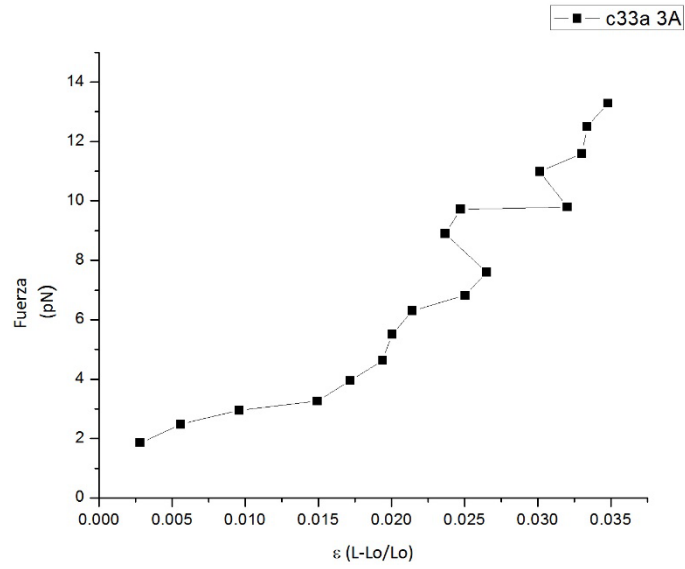


Figura 4.39 Gráfica de Fuerza -Deformación c33a 3A

Al igual en la figura 4.40 se presentan las regresiones y se muestra una tendencia similar a la de las figuras 4.38 y 4.39.

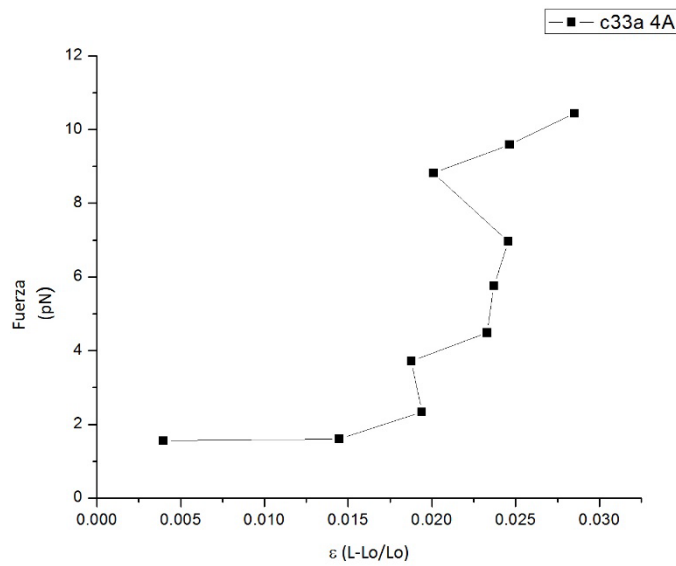


Figura 4.40 Gráfica de Fuerza -Deformación c33a 4A

Se observa en todo el conjunto de gráficas anteriores un comportamiento muy similar entre sí.

En las siguientes figuras (figuras 4.41-4.47) se muestra un conjunto de células del mismo tipo (c33a), la diferencia es que estas células reposaron 24hrs en la adherencia de partículas de poliestireno, y la rigidez de resorte que se calculó en este día es de $9.3 \frac{pN}{\mu m}$.

Se observa en las figuras de la 4.41 a la 4.44, un comportamiento muy similar entre ellas, en donde al inicio del ensayo de tensión la fuerza se comporta casi constante aunque el incremento de la deformación es grande, después de 3 o 4 deformaciones comienza a haber un incremento de la fuerza, pero el incremento de deformación es muy pequeño, esto puede ser debido al paso de posición que se dio, o bien este comportamiento puede brindar información sobre la estructura de la célula.

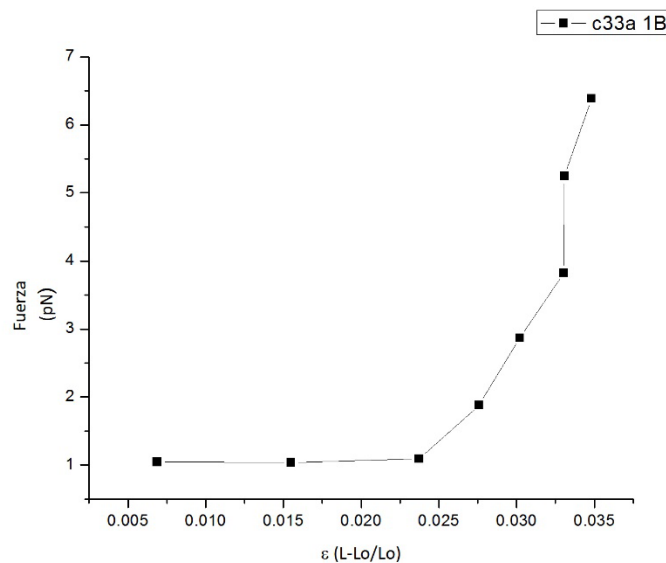


Figura 4.41 Gráfica de Fuerza -Deformación c33a 1B

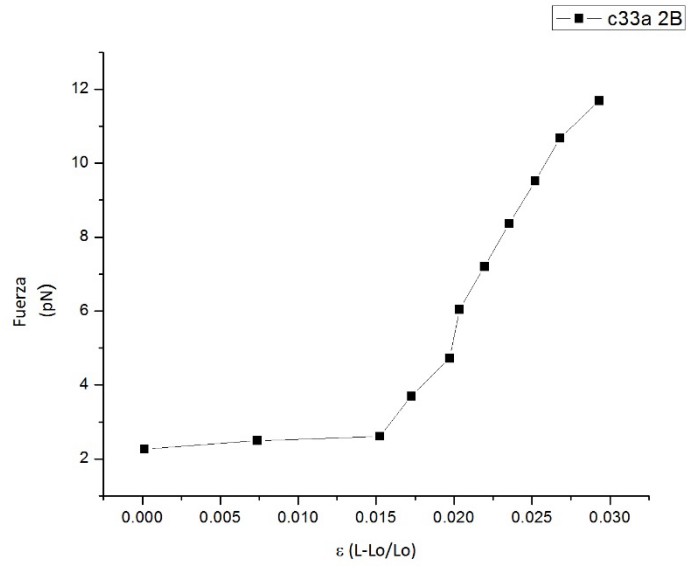


Figura 4.42 Gráfica de Fuerza -Deformación c33a 2B

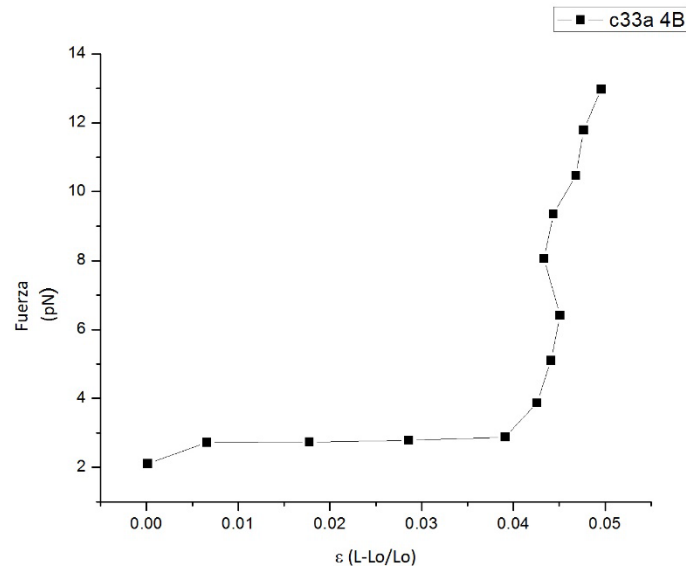


Figura 4.43 Gráfica de Fuerza -Deformación c33a 4B

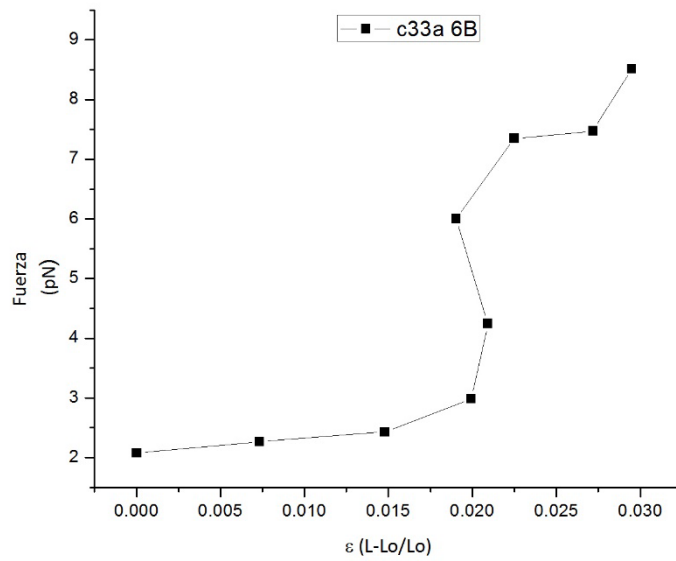


Figura 4.44 Gráfica de Fuerza -Deformación c33a 6B

Las figuras 4.45 y 4.46, en donde se al inicio del ensayo de tensión una tendencia lineal y posteriormente se tiene un salto, para nuevamente tener un comportamiento lineal, en estos dos casos se ve un mayor número de pasos, debido a falta de control en el desplazamiento de la partícula y se observa que su comportamiento es más parecido al primer conjunto de datos de c33a.

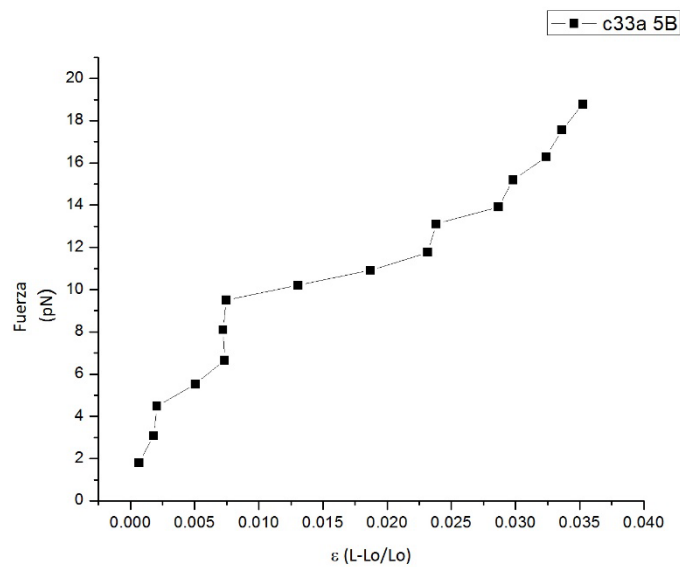


Figura 4.45 Gráfica de Fuerza -Deformación c33a 5B

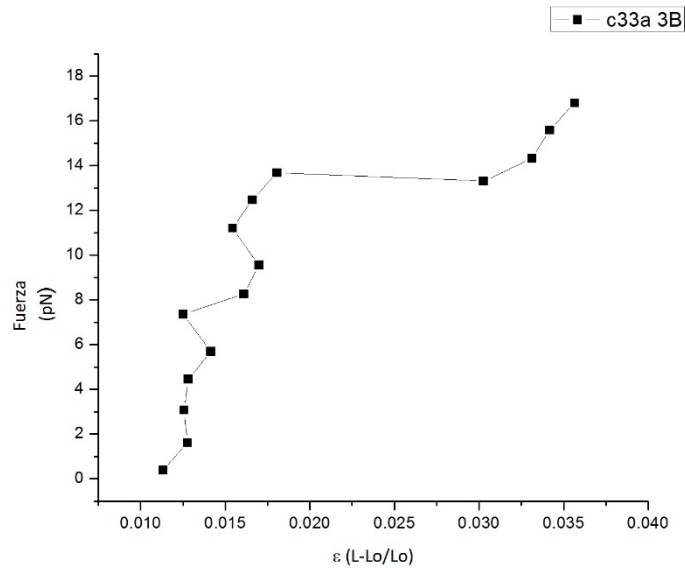


Figura 4.46 Gráfica de Fuerza -Deformación c33a 3B

Es posible que, por la diferencia de tiempo de reposo, exista una diferencia en la tendencia del comportamiento entre los dos conjuntos de células.

El módulo de elasticidad y el coeficiente de Poisson de las células c33a que se presentan en las tablas 4.5 y 4.6, se separan por días debido a la afectación que pueda haber causado el tiempo de reposo de cada una de estas.

Célula	Coefficiente de Poisson $\nu (\pm 0.05)$	Módulo de Elasticidad $E(\text{Pa}) (\pm 6.09)$
c33a 1A	0.402	1591.24
c33a 2A	0.335	2054.80
c33a 3A	0.44	1722.14
c33a 4A	0.43	1740.42

Tabla 4.5 Resultados de propiedades mecánicas, módulo de elasticidad y coeficiente Poisson de c33a A

En este caso particular se encontró un promedio del módulo de elasticidad de $1.7 \pm .27 \text{ kPa}$ y un coeficiente de Poisson de $0.40 \pm .05$.

Célula	Coeficiente de Poisson $\nu (\pm 0.05)$	Módulo de Elasticidad $E(\text{Pa}) (\pm 6.09)$
<i>c33a 1B</i>	0.37	1200.5
<i>c33a 2B</i>	0.45	2557.58
<i>c33a 3B</i>	0.31	3144.7
<i>c33a 4B</i>	0.39	2591.74
<i>c33a 5b</i>	0.30	2673.1
<i>c33a 6B</i>	0.32	1290.55

Tabla 4.6 Resultados de propiedades mecánicas, módulo de elasticidad y coeficiente Poisson de *c33a B*

Se obtuvo un módulo de elasticidad para este caso en particular de $2.3 \pm 1.0 \text{ kPa}$ y un coeficiente de Poisson de $0.38 \pm .05$.

Es importante mencionar en el segundo conjunto de células *c33a B*, se obtuvieron deformaciones mayores por que la rigidez de la trampa fue mayor.

Con el módulo de elasticidad que se obtuvo para cada caso, se puede observar que el segundo conjunto de células es más rígido que el primero, esto puede deberse a que como se mencionó anteriormente, el tiempo de reposo de las células pudo haber afectado.

4.3.3.2 Células HeLa

No fue posible realizar el ensayo de tensión a esta célula, debido a que la mayoría de las células se adhirieron a los vidrios y a partículas adheridas al vidrio, las pocas que se encontraron libres no se pudieron estirar ya que las partículas a su alrededor estorbaban (figura 4.47). Es posible que por la enfermedad adicional que presentan exista esta adherencia excesiva, es necesario modificar el protocolo de adherencia, posiblemente al centrifugar una tercera vez para quitar cualquier remanente de tripsina o de proteínas.

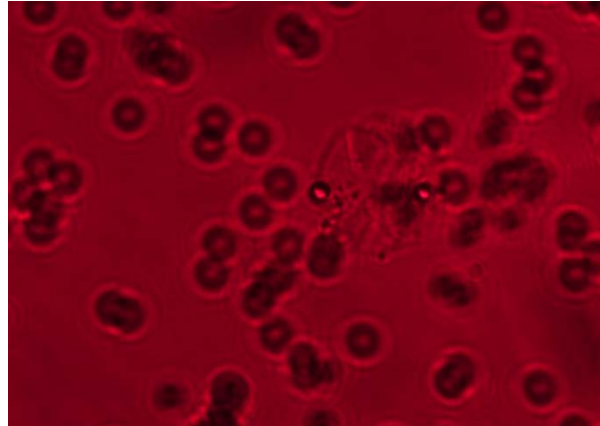


Figura 4.47 Célula HeLa en ensayo de tensión

4.3.4 Resultados de constante elástica de resorte de glóbulos rojos y células

La constante elástica del resorte (k) de las células que fueron estiradas, se obtiene por medio de la ley de Hooke:

$$F = k\Delta u \quad (5.7)$$

donde F es la fuerza aplicada para cada una de las deformaciones que presentamos en los resultados de las secciones anteriores, Δu es la elongación que sufrió célula en cada deformación respecto a su posición de equilibrio.

La constante de elástica del resorte de las células proporciona información muy valiosa con respecto al comportamiento que tiene al ser deformada, sobre todo su comportamiento viscoelástico. Entre mayor sea k mayor será la resistencia que opone la célula al ser deformada.

En las siguientes figuras se mostraran los resultados que se obtuvieron del análisis k de algunas células que se presentaron en los resultados de las secciones anteriores. Las gráficas muestran una comparativa entre el comportamiento fuerza-deformación (lado izquierdo e inferior de las gráficas) y constante de rigidez-elongación (lado derecho y superior de las gráficas).

En la figura 4.48 se presenta el resultado del ensayo de tensión de un glóbulo rojo de un individuo en particular, se puede observar como al inicio del ensayo de tensión la k aumenta en la sección inicial, en donde la fuerza aumenta pero la deformación es pequeña, después de llegar el máximo valor, la constante elástica decrece debido la célula tiene una mayor deformación y la fuerza aplicada crece en menor proporción que al inicio del ensayo de tensión. Esto nos muestra el

comportamiento viscoelástico del glóbulo rojo, ya que al principio del ensayo se aprecia el comportamiento de un sólido.

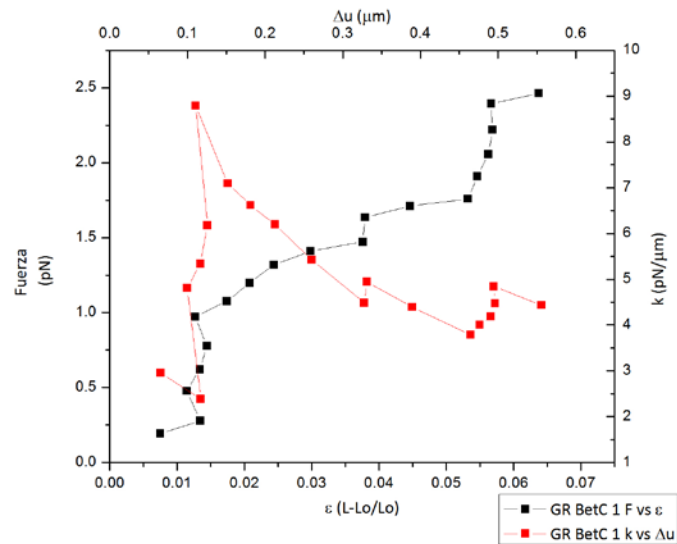


Figura 4.48 Gráfica de Glóbulo Rojo BetC 1 de constante elástica de resorte

En la figura 4.49 a y 4.49b se presenta un mismo glóbulo rojo estirado dos veces, el cual en el primer ensayo de tensión sufre una deformación plástica y en el segundo ensayo de tensión se observa que el GR tiene ya un daño interno, esto se puede apreciar en la figura 4.48b donde la fuerza tiene una caída abrupta al igual que en k .

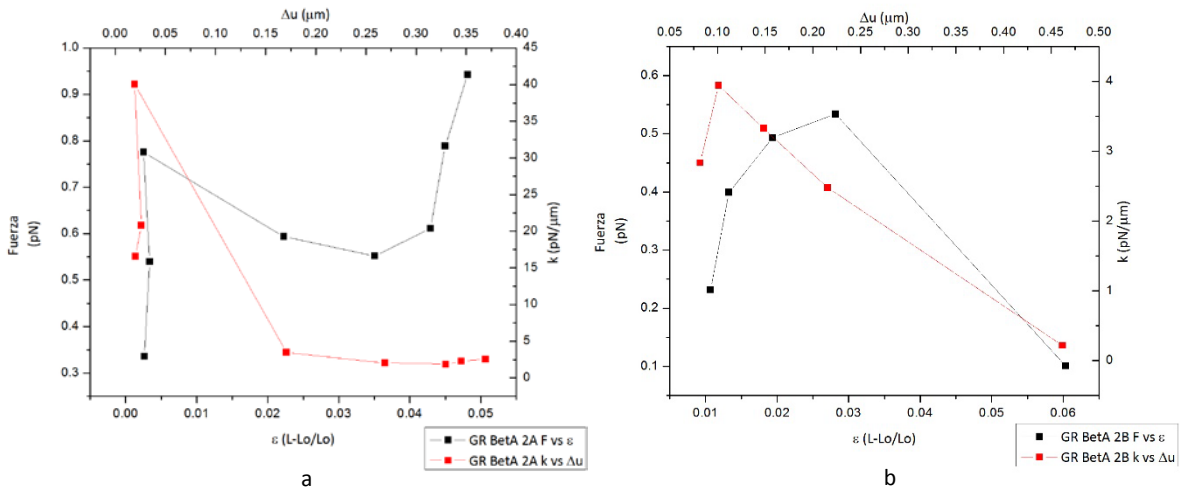


Figura 4.49 Gráfica de Glóbulo Rojo BetA deformado dos veces a) Constante de resorte de 1er deformación b) Constante elástica de resorte de 2nda deformación

En la figura 4.50 se muestra el GR de otro individuo, se observa que al inicio del ensayo de tensión la k es grande y nuevamente, como en los casos anteriores (figuras 4.48 y 4.49a), cae ya que se tiene una mayor deformación con un aumento menor de fuerza. Tanto en la fuerza como en la k se muestra un comportamiento escalonado, que como se mencionó en la sección anterior, fue debido a las variaciones del modulador espacial de luz.

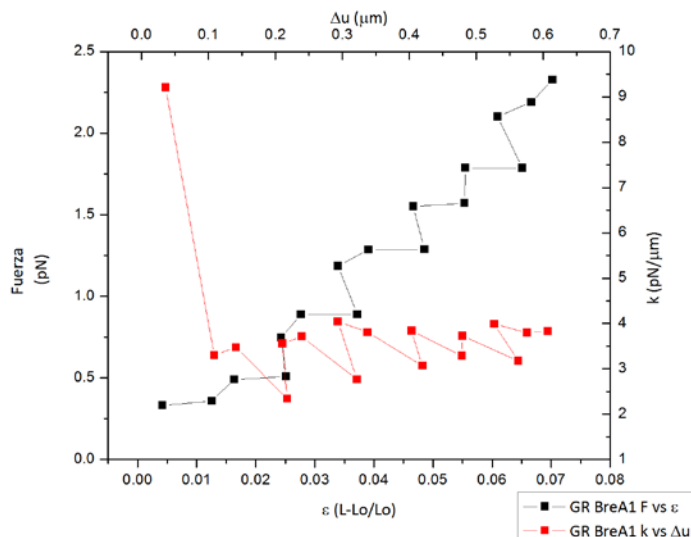


Figura 4.50 Gráfica de Glóbulo Rojo BreA 1 de constante elástica de resorte

En la figura 4.51 se presenta la gráfica del comportamiento del GR de un tercer individuo, al igual que en los casos anteriores, se tiene al inicio del ensayo de tensión un aumento en la k , después de cierta deformación la k es menor.

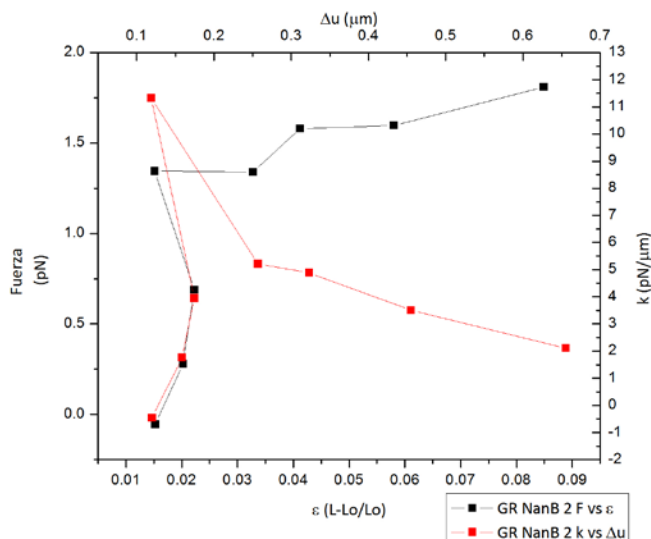


Figura 4.51 Gráfica de Glóbulo Rojo NanB 2 de constante elástica de resorte

En las figuras 4.48 – 4.51 podemos observar el mismo comportamiento de la constante elástica del resorte en el ensayo de tensión, es importante mencionar que esta tendencia fue similar aunque los GR son de tres individuos distintos. La información que presenta esta tendencia, representa la estructura interna del GR y el comportamiento viscoelástico del mismo.

En la figura 4.52 se muestra la k de una célula h1299, el valor de k para la primer deformación es un valor grande, después el valor decrece al ser mayor la elongación.

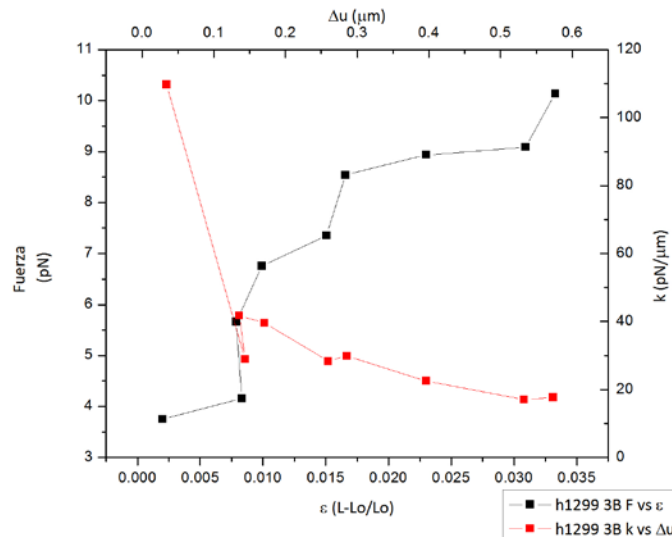


Figura 4.52 Gráfica de h1299 de constante elástica de resorte

La figura 4.53 muestra una célula c33a, el comportamiento de k para esta célula es muy parecida a la célula h1299, los primero valores de k son grandes, luego cae y tiene un ligero aumento, pero nuevamente hay un decremento en k al aumentar la elongación.

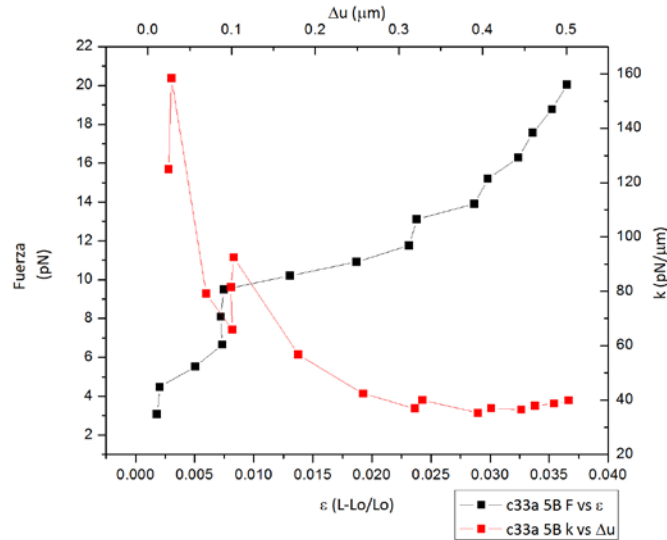


Figura 4.53 Gráfica de c33a de constante elástica de resorte

Al igual que en los GR el análisis de la constante elástica de rigidez muestra particularidades de la estructura interna de la célula, en donde al principio la célula opone resistencia y al sufrir mayores deformaciones la k disminuye, comparando con el GR como mencionamos anteriormente, los valores de k de las células son mayores, debido a la complejidad de la estructura interna de las células.

Conclusiones de Capítulo

Una gran cantidad de experimentos se llevaron a cabo en este capítulo para lograr los resultados obtenidos, desde la adherencia de partículas a GR, en la cual se variaron muchos factores para llegar al protocolo que se presenta, así también como la creación de un protocolo para células cancerosas. Esto permitió realizar los ensayos de tensión con los cuales se obtuvo información importante de las células estudiadas. Las propiedades mecánicas que se estudiaron permiten tener información importante que se debe considerar en trabajo a futuro y en este caso datos como, la afectación al estirar varias veces un GR, la respuesta de GR no hinchados por completo, el comportamiento de esfuerzo deformación que puede indicar que parte de la estructura de una célula que están reaccionando, el tiempo de reposo de las células y obtener los Módulos de elasticidad y coeficiente de Poisson que en el caso de los GR son valores que se encuentran dentro de lo reportado en la literatura. Es importante concluir que las Pinzas Ópticas Holográficas son una herramienta con la cual es posible medir propiedades mecánicas de células.

Capítulo 5. Modelado matemático de ensayo de tensión de células

Durante toda su vida las células se encuentran bajo la influencia de fuerzas físicas, generadas por la interacción con otras células, tales fuerzas juegan un papel sumamente importante durante su organización interna, desarrollo, crecimiento, maduración y en la función de los sistemas más complejos que conforman (F. R. Camacho-Martínez, 2013). Modelar el comportamiento mecánico de células puede ser crítico para el entendimiento, prevención y tratamiento de enfermedades.

Desde que comenzaron a estudiarse las propiedades mecánicas de las células, se han desarrollado una variedad de modelos que tratan de explicar el comportamiento mecánico de las mismas. Existen dos categorías generales en las que se dividen estos modelos: Continuos y Estructurales. Los modelos continuos se basan en la homogenización de los componentes de la célula (F. R. Camacho-Martínez, 2013), a pesar de que se sabe que las células tienen estructuras internas complejas. Los modelos estructurales por su parte enfatizan los diferentes papeles que juegan los componentes celulares en su diseño. (F. R. Camacho-Martínez, 2013). De esta manera, muchos modelos se han desarrollado con base en la técnica experimental utilizada para medir las propiedades mecánicas. Para que un modelo sea aceptado por la comunidad científica este debe de tomar en cuenta aspectos de las dos categorías de modelos, los aspectos viscoelásticos, no lineales y la respuesta mecánica heterogénea, así como sus diversos componentes. (Scott, 2011)

5.1 Modelo matemático de ensayo de tensión para Glóbulos Rojos

El Glóbulo Rojo (GR) se encuentra formado de una membrana compuesta por una bicapa de fosfolípidos adheridos a un citoesqueleto por medio de una serie de proteínas (Figura 5.1), en su interior contiene un líquido llamado hemoglobina y no tiene núcleo.

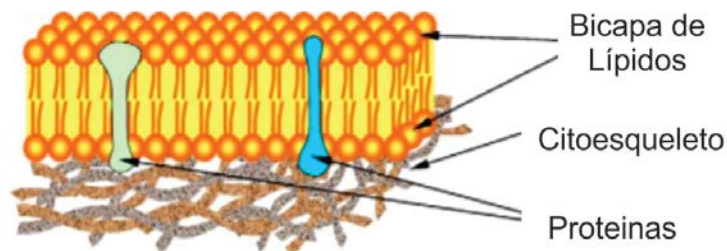


Figura 5.1 Esquema de la estructura de la membrana del GR (imagen adaptada de (M. Dao, 2003))

Los GR tienen una geometría bicóncava con un diámetro aproximado de $8 \mu m$ y espesor de aproximadamente $2 \mu m$ (figura 5.2), son células muy elásticas debido a las deformaciones tan severas a las que son sometidas a que tienen un tiempo de vida de 120 días y a que diariamente circulan alrededor de medio millón de veces por el cuerpo humano atravesando capilares sanguíneos de hasta $3 \mu m$ (M. Dao, 2003). Las grandes deformaciones que puede sufrir el GR han sido atribuidas a las propiedades mecánicas de su membrana, ya que, en muchos estudios realizados de GR, sobre todo en GR con enfermedades como anemia de células falciformes, fallas renales crónicas en niños, malaria, septicemia (infección en el torrente sanguíneo) entre otras, se ha encontrado que la membrana es afectada y sus propiedades mecánicas cambian, en la mayoría de estas enfermedades se vuelve más rígida.

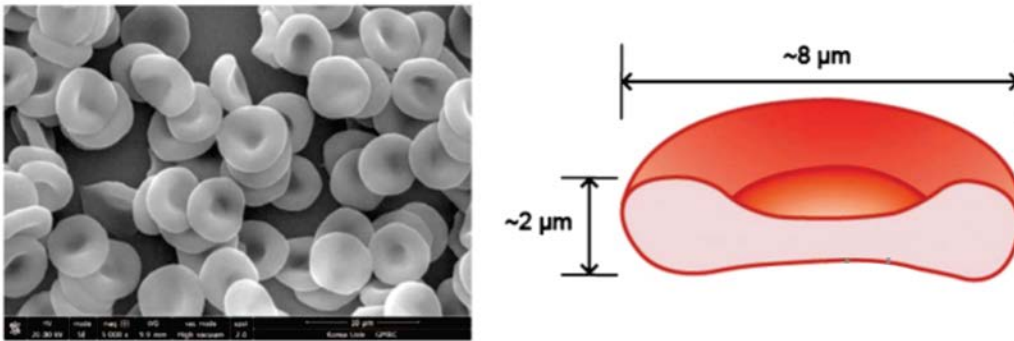


Figura 5.2 Forma y dimensiones de GR (imagen adaptada de (Jeongho Kim, 2015))

Para nuestro estudio, en el cual se realiza una simulación, que se alimenta con los parámetros de módulo de elasticidad y coeficiente de Poisson que se obtuvieron de los experimentos de ensayo de tensión a distintas células, se obtienen las curvas de esfuerzo- deformación con las que se determinara si el modelo matemático reproduce el mismo comportamiento que se tuvo en el experimento, esto al comparar con las curvas de esfuerzo deformación de este. Se proponen para las simulaciones dos modelos que representarán el comportamiento del GR en el ensayo de tensión, en el primero se representa a la membrana como un material hiperelástico y en el segundo como un material elástico con geometría no lineal. A continuación, se describen las características principales de los materiales mencionados, posteriormente se presenta el desarrollo del modelo realizado en el software *COMSOL multiphysics 4.2A* y por último los resultados que se obtuvieron.

Los modelos de materiales hiperelásticos son modelos constitutivos utilizados para representar el comportamiento elástico de materiales sometidos a grandes deformaciones. Su característica principal es que muestran un comportamiento lineal al inicio de una deformación y ésta respuesta

deja de ser lineal según la deformación crece. Se consideran como materiales conservativos capaces de devolver la energía acumulada, tal como una liga (R.A González Carbonell, 2009).

A diferencia de un material elástico, en los materiales hiperelásticos, las relaciones de deformación (ϵ) y esfuerzo total (σ) se define por medio de la energía de deformación W .

$$\sigma = \frac{\partial W}{\partial \epsilon}, \quad (5.1)$$

En 1990 Rivlin propone que la energía de deformación se puede expresar como un polinomio de los alargamientos principales o de las invariantes de deformación.

Por alargamientos principales:

$$W = W(\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3) \quad (5.2)$$

Donde:

$$\lambda = \frac{L}{L_0} = \frac{L_0 + u}{L_0} = 1 + \epsilon_E \quad (5.3)$$

Por invariantes de deformación:

$$W = W(I_1, I_2, I_3) \quad (5.4)$$

Como se mencionó anteriormente, existen tres razones de alargamiento principales λ_1 , λ_2 , y λ_3 con las cuales se obtiene la deformación. Los principales alargamientos λ_1 y λ_2 , definen la deformación en el plano, y el estiramiento λ_3 define la variación del espesor, como se muestra en la figura 5.3.

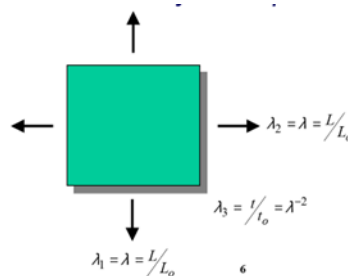


Figura 5.3 Alargamientos principales

Las tres invariantes de deformación se definen por medio de los alargamientos principales:

$$I_1 = \lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2, \quad (5.3)$$

$$I_2 = \lambda_1^2 \lambda_2^2 + \lambda_2^2 \lambda_3^2 + \lambda_3^2 \lambda_1^2, \quad (5.4)$$

$$I_3 = \lambda_1^2 \lambda_2^2 \lambda_3^2, \quad (5.5)$$

donde la tercer invariante para un material incompresible $I_3 = 1$. (R.A González Carbonell, 2009).

Partiendo de la proposición realizada por Rivlin, se llega a la siguiente función de densidad de energía de deformación:

$$W = \sum_{i+j}^N C_{ij} \cdot (I_1^c - 3)^i \cdot (I_2^c - 3)^j + \sum_i^N \frac{1}{D_i} \cdot (J_c - 1 - R)^{2i} \quad (5.6)$$

Donde:

C_{ij} : es el coeficiente de Rivlin

D_i : es el coeficiente de compresibilidad de material

R: es el coeficiente que define la expansión volumétrica con cambio de temperatura

$$I_1^c = (\lambda_1^c)^2 + (\lambda_2^c)^2 + (\lambda_3^c)^2 \quad (5.7)$$

$$I_2^c = (\lambda_1^c \cdot \lambda_2^c)^2 + (\lambda_2^c \cdot \lambda_3^c)^2 + (\lambda_3^c \cdot \lambda_1^c)^2 \quad (5.8)$$

$$J^c = (\lambda_1^c \cdot \lambda_2^c \cdot \lambda_3^c)^2 \quad (5.9)$$

J es la relación del volumen total.

$$J = \frac{V}{V_0} \quad (5.9)$$

Como la ecuación de energía es muy compleja se han ido desarrollando particularidades de esta expresión y que definen los diferentes modelos hiperelásticos existen.

Uno de los modelos más simple y en el cual nos enfocaremos es llamado Neo-Hookeano y consiste en un material muy aproximado al modelo de Hooke. En general la relación de esfuerzo-deformación es inicialmente lineal, pero en cierto punto se vuelve no lineal. El modelo Neo-Hookeano, se basa principalmente en la termodinámica estadística de cadenas poliméricas entrecruzadas, en cierto punto el estiramiento llegará al punto máximo en que las cadenas entrecruzadas se deformen linealmente, después de esto existirá un incremento en el módulo de

elasticidad del material. Este modelo es utilizado sobre todo para modelar plásticos y materiales como ligas (solo su estiramiento inicial). Generalmente el material Neo-Hookeano no predice el incremento del módulo de elasticidad a grandes deformaciones y es confiable para deformaciones menores al 20%. (Beomkeum Kim, 2012).

La función de energía de deformación para un material Neo-hookeano incompresible es:

$$W = \frac{1}{2}\mu(\bar{I}_1 - 3) + \kappa(J - 1)^2, \quad (5.11)$$

donde μ es la primer constante de Lamé. Las constantes de Lamé son constantes elásticas que relacionan el esfuerzo y deformación de materiales isotrópicos. \bar{I}_1 es la primer invariante de deformación y κ es el módulo volumétrico o de compresibilidad.

La primer constante de Lamé, μ se obtiene con la relación:

$$\mu = \frac{E}{2(1+\nu)}, \quad (5.12)$$

donde E es el módulo de elasticidad y ν el coeficiente de Poisson. El módulo κ se obtiene:

$$\kappa = \lambda - \frac{2}{3}\mu, \quad (5.13)$$

donde λ es la segunda constante de Lamé definida como

$$\lambda = \frac{E\nu}{(1+\nu)(1-2\nu)}, \quad (5.14)$$

Para el segundo modelo propuesto, se utiliza un material elástico con geometría no lineal, esto significa que para en la simulación, se tomará en cuenta el cambio de geometría que ocurre en el transcurso de la solución del problema.

Generalmente en problemas lineales las ecuaciones de equilibrio son resueltas en un estado de no deformación y no se actualizan con las deformaciones que va sufriendo el material en cada paso de la resolución del problema, muchas veces estas deformaciones son tan pequeñas que se no diferencia de la geometría inicial (Sönnnerlind, 2015), pero existen problemas en los cuales esta diferencia tiene una afectación, como se supone en nuestro caso.

5.1.1 Desarrollo de modelos en *COMSOL multiphysics 4.2A*

Se simulieron ambos modelos (hiperelástico y elástico con geometría no lineal) en 3 dimensiones como un problema estacionario con ayuda del software COMSOL multiphysics versión 4.2A. Se

generó la geometría y se modeló una esfera de $8 \mu m$ (figura 5.4). La geometría es esférica debido a que el tampón hipotónico provocó que el GR se hinchara y llegara a tener una forma casi esférica. En la geometría también se modelan en los extremos opuestos del GR, las secciones donde se encuentran adheridas las partículas de poliestireno. Las partículas no se incluyen en la simulación debido a que tienen un módulo de elasticidad muy grande ($2500 MPa$) comparado con el módulo de elasticidad del GR (aproximadamente $150 Pa$, según los datos experimentales), así que se consideran como un material rígido que no sufre deformación. El espesor de la membrana se considera de $0.04 \mu m$, dato tomado de la literatura donde $\frac{h}{r} = 0.01$, donde r es el radio del GR y h el espesor de la membrana (Paul B. Bareil, 2007).

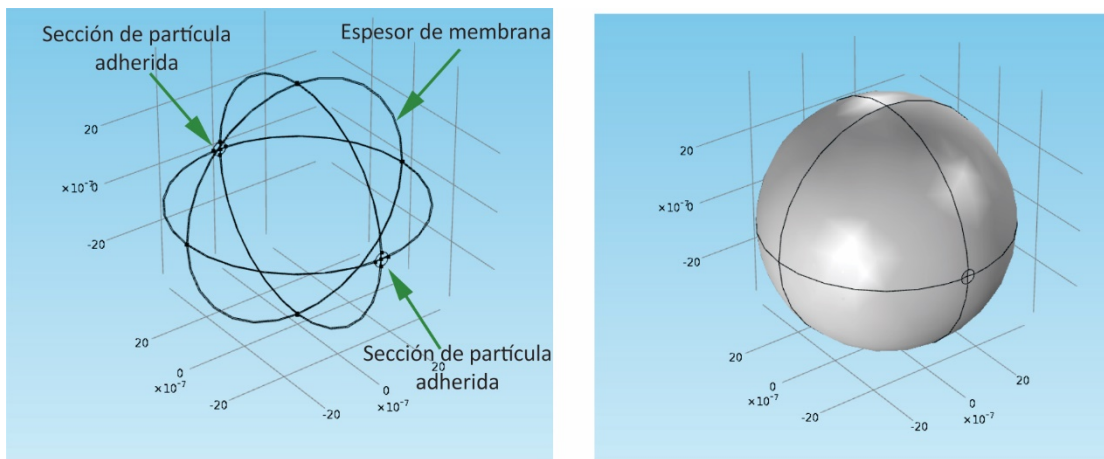


Figura 5.4 Geometría del modelo

Las propiedades del material asignadas, en este caso las de la membrana celular, se tomaron con base en los resultados experimentales: el módulo de elasticidad de $150 Pa$ (por la naturaleza del experimento, esta propiedad fue obtenida para el GR completo, sin embargo se tomó este dato debido a que las propiedades mecánicas del GR se deben principalmente a las propiedades de la membrana, ya que la aportación del fluido interior es despreciable), el coeficiente de Poisson de 0.49 por la incompresibilidad del material y es parámetro obtenido de nuestros datos experimentales. Las condiciones de frontera fueron asignadas con base en el ensayo de tensión experimental, se mantiene una de las secciones de la partícula fija y la del otro extremo se desplaza $0.6 \mu m$, este dato es un promedio de los desplazamientos que se lograron en el experimento. En este caso se despreció la presión interior ya que, tanto en la literatura como en simulaciones, se comprobó que la presión no afecta en el resultado final de esfuerzo-deformación (figura 5.5).

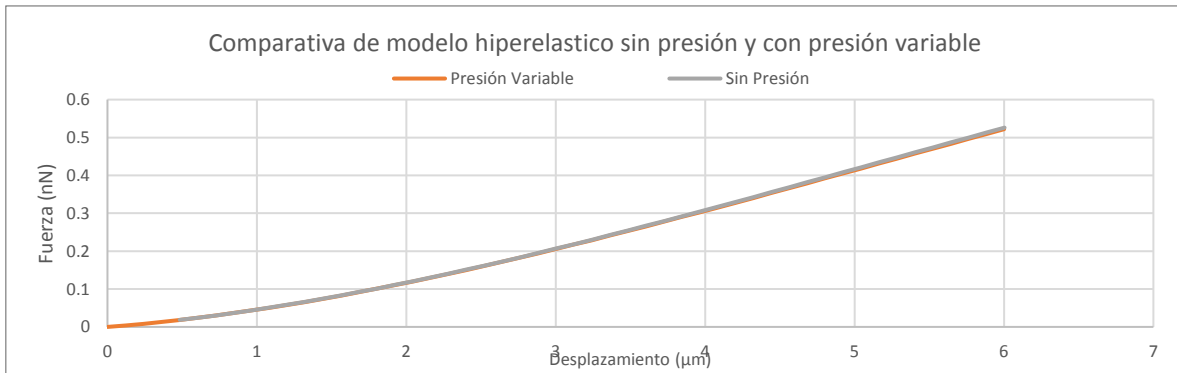


Figura 5.5 Resultados de la comparación entre considerar un modelo hiperelástico con presión variable y otro sin presión variable.

Posteriormente se definió en el programa el modelo que se propone, que en el primer caso es el modelo hiperelástico, el programa cuenta con la opción del mismo (figura 5.6). En esta sección se definen también las constantes de Lamé y el módulo volumétrico que dependen de las propiedades del material que ya fueron definidas.

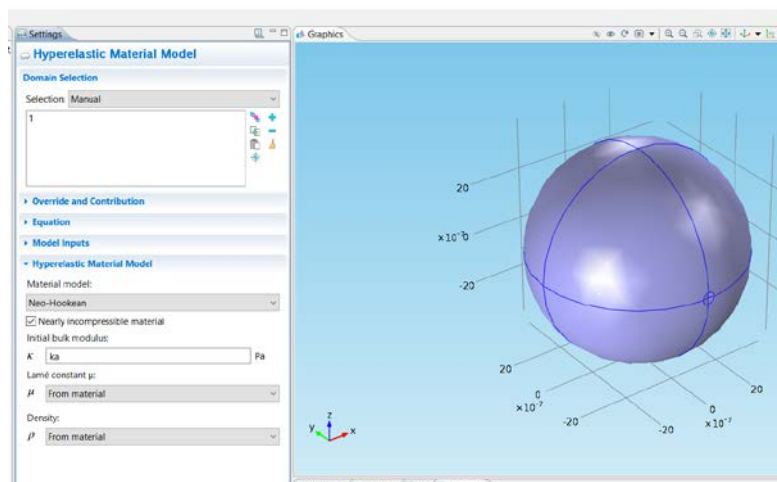
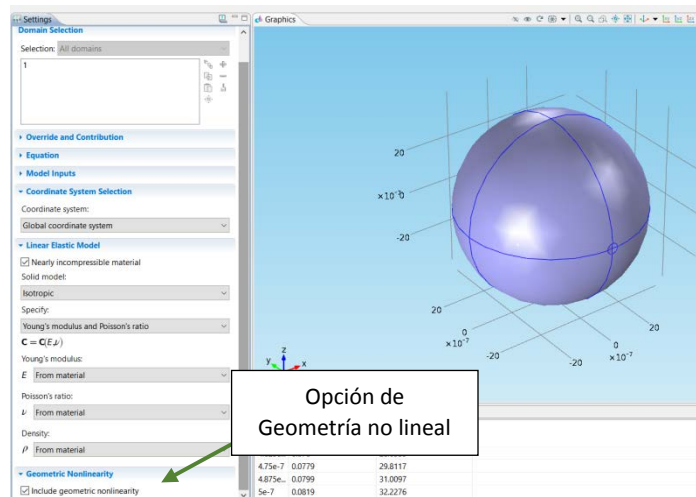


Figura 5.6 Interfaz de Material Hiperelástico en Comsol

El software COMSOL cuenta con la opción de configurar un material elástico con geometría no lineal, como se muestra en la figura 5.7, lo que permitió modelar glóbulos rojos usando esta aproximación de manera más sencilla.



5.7 Interfaz de Material lineal con opción de geometría no lineal

Posteriormente se realizó el mallado de la geometría (figura 5.8), esta parte fue compleja debido al espesor tan pequeño de la membrana celular respecto del tamaño de la célula, por lo que resulta complejo permitir un mallado controlado automáticamente por COMSOL, y por esta razón se realizó un mallado controlado por el usuario, donde se definieron resoluciones espaciales más finas en algunas zonas.

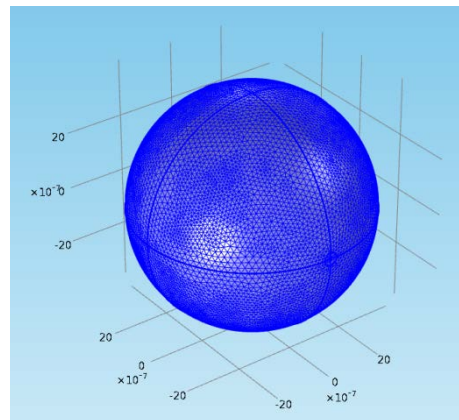


Figura 5.8 Mallado de la geometría

En ambos modelos es necesario obtener la curva de esfuerzo-deformación del material, se puede elegir en COMSOL resolver de manera transiente para obtener la gráfica en función del tiempo o bien de manera estacionaria definiendo parámetros de desplazamiento usando la herramienta parametric sweep). Por simplicidad, se eligió el problema estacionario y se definieron desplazamientos con pasos de $0.025 \mu m$ hasta el desplazamiento final de $0.5 \mu m$.

En la figura 5.9 se muestra el estiramiento del GR en la simulación.

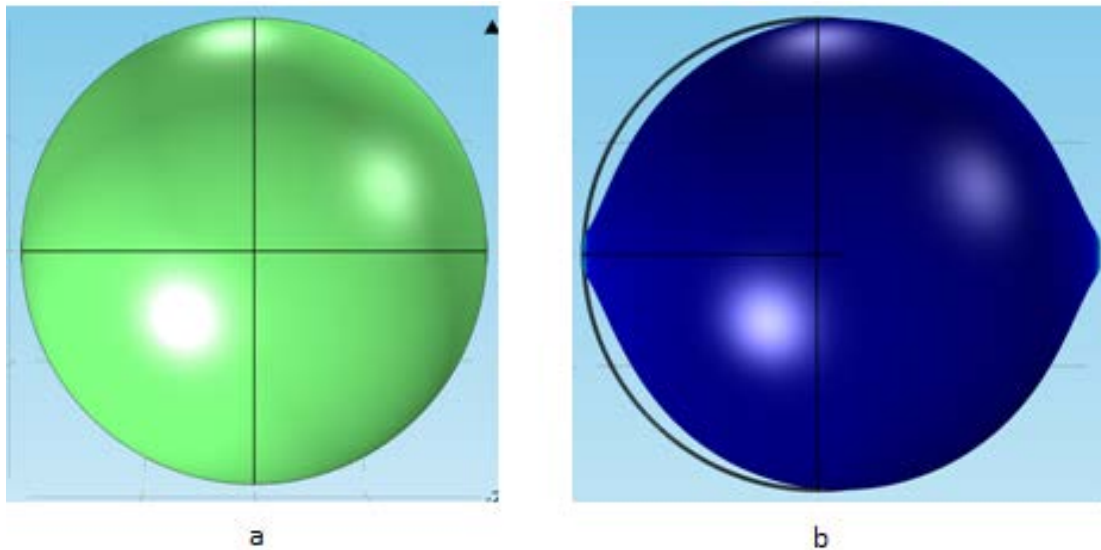


Figura 5.9 Estiramiento GR en simulación a) GR sin deformar b) GR deformado en último paso de desplazamiento

Los resultados de la simulación de esfuerzo y deformación de los dos modelos se muestran en la gráfica de figura 5.10, donde se puede apreciar una diferencia clara entre ambos modelos.

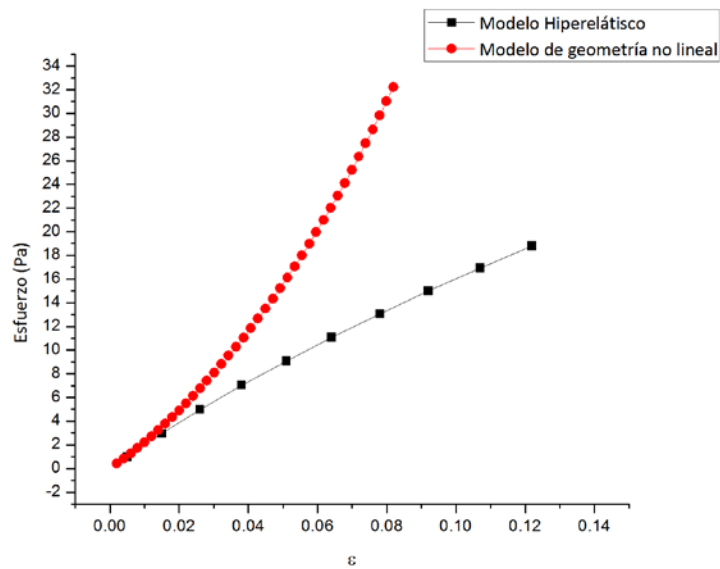


Figura 5.10 Curvas de esfuerzo deformación de modelo hiperelástico y de geometría no lineal

Las figuras 5.11 y 5.12 muestran la comparación de los resultados de los modelos con algunos datos experimentales para dos voluntarios diferentes.

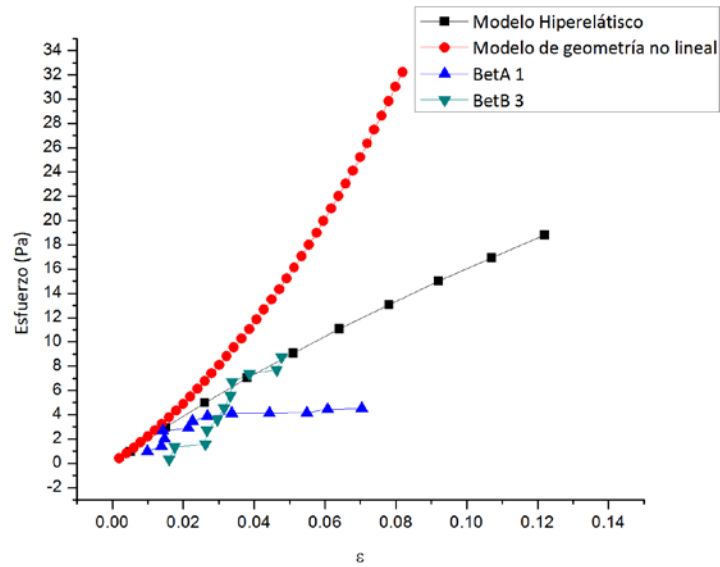


Figura 5.11 Comparativo de curva tensão- deformação de modelos com dados experimentais BetA

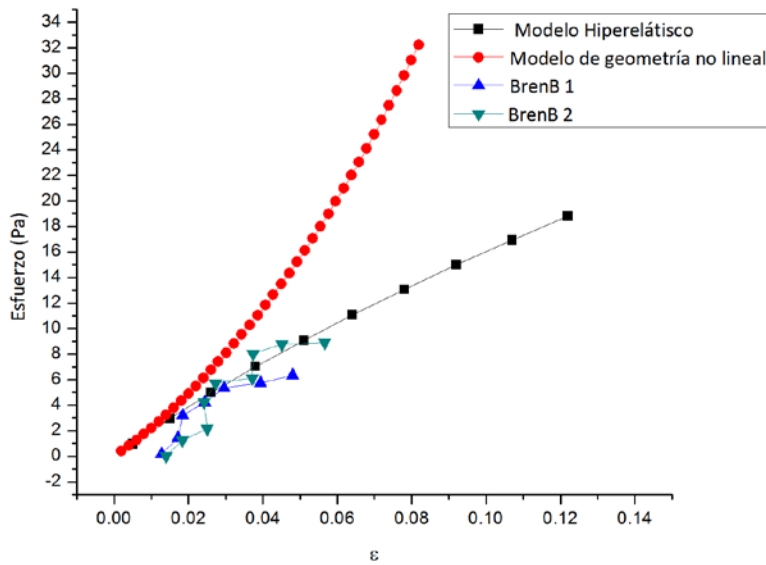
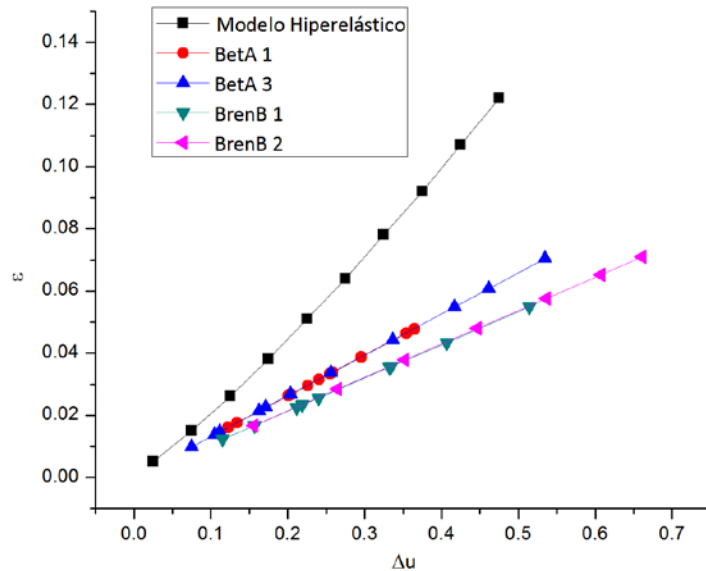


Figura 5.12 Comparativo de curva tensão- deformação de modelos com dados experimentais BrenB

Se pode observar que em nenhum dos modelos se reproduz o comportamento dos GR tensionados experimentalmente, se pode dizer que o modelo que representa um comportamento mais próximo aos dados experimentais é o modelo hiperelástico Neo-Hookeano, e que os valores de tensão e deformação se encontram dentro da mesma escala. É importante tomar em conta que o estiramento, tanto em modelos como no experimento, foi realizado com um deslocamento total de $0.5 \mu m$ e se pode observar que em ambos os modelos as deformações são maiores que no experimento (Figura 5.13)



5.13 Comparativo deformación -elongación de modelo hiperelástico con datos experimentales

Existe una serie de factores por los cuales no se reprodujo el comportamiento, la consideración más importante es que el desplazamiento tan pequeño obtenido del experimento impidió tener deformaciones mayores, se puede concluir que solo se analizó una parte muy pequeña del GR, esto se debe a la influencia del láser verde (532 nm) que, como se mencionó en secciones anteriores, no permite estirar más el glóbulo ya que lo empuja por la presión de radiación, esto se puede corregir al utilizar un láser infrarrojo de 1064 nm.

Son necesarias deformaciones mayores para poder alimentar el modelo con información más completa. Es posible que, al tener datos con deformaciones mayores, el modelo hiperelástico Neo-Hookeano sea capaz de reproducir el comportamiento, ya que en esta escala tan pequeña se logra observar un comportamiento del modelo similar, pero no igual al del GR.

Una observación realizada durante el desarrollo de los modelos fue que el tiempo de computo de cada simulación fue muy elevado (de 3 a 4 hrs con un procesador i5 de 8Gb en memoria RAM), por ser la geometría en 3D y por el espesor tan pequeño de la membrana, inicialmente se intentó modelar el problema usando una geometría en 2D axismétrica, sin embargo, debido a las condiciones del desplazamiento y no linealidad de los dos modelos, no fue una opción plausible.

5.2 Modelo matemático de ensayo de tensión para células cancerígenas

La estructura en general de una célula es compleja y varía dependiendo del tipo de célula, algunas son más complejas que en otras, en general las partes principales de la célula que contribuyen a

sus propiedades mecánicas son: La membrana celular, el núcleo, el citoplasma y en especial el citoesqueleto.

- Membrana celular: se compone de una bicapa delgada de lípidos, con un grosor aproximadamente de $5 - 10 \text{ nm}$ y una resistencia a la flexión de $10^{-19} - 10^{-20} \text{ N} \cdot \text{m}$, actúa como una barrera entre el interior de la célula y al ambiente extracelular.
- Núcleo: su tarea principal es regular la expresión genética, es la parte más rígida de la célula y su grado de rigidez estructural y plasticidad, puede jugar un papel muy importante en la mecánica de la célula y en la mecanotransducción.
- Citoplasma: es el fluido complejo que rodea al núcleo e implica un microambiente saturado de proteínas, complejos de proteínas y organelos. Su naturaleza saturada conlleva a propiedades reológicas (Marita L. Rodriguez P. J., Review on Cell Mechanics: Experimental and Modeling Approaches, 2013) (propiedades de esfuerzo y deformación que tienen los materiales capaces de fluir).
- Citoesqueleto: es el principal contribuyente de las propiedades mecánicas de la célula, se encuentra dentro del citoplasma y consiste de una serie de redes filamentosas de proteínas. Además de mantener la forma de la célula y otras funciones biológicas, actúa como una estructura dinámica que resiste, transmite y genera fuerzas celulares. El citoesqueleto se encuentra definido por tres grupos de filamentos que son: microtúbulos, filamentos intermedios y filamentos de actina (Marita L. Rodriguez P. J., Review on Cell Mechanics: Experimental and Modeling Approaches, 2013).

A continuación describe brevemente la función de cada uno de estos.

- Microtúbulos: Son filamentos rígidos de estructuras huecas que parten de un organelo central cerca del núcleo. Crecen dinámicamente y resisten fuerzas compresivas celulares, son los filamentos más rectos de los tres grupos.
- Filamentos intermedios: Proporcionan la resistencia, conservan la forma y organización de la célula y su núcleo. Contienen a su vez subunidades llamadas protofilamentos, que se agrupan y forman una estructura filamentososa de un diámetro aproximadamente de 10 nm . Estos pueden ser de diferentes configuraciones estructurales, tal que conforman una malla dentro del citoplasma que actúa como un amortiguador de esfuerzos. (Hermann, 2007).
- Filamentos de Actina: Actúan como el componente estructural primario del citoesqueleto y

con ayuda de las proteínas de miosina (que son proteínas fibrosas) son esenciales para crear y mantener las fuerzas que se requieren para el movimiento celular o contracciones. (De Rumi., 2010). Un filamento de actina está compuesto de monómeros de actina conocido como α -actina que son utilizados para formar la F-actina, la cual tiene un módulo de elasticidad de $1 - 2 \text{ GPa}$, y un diámetro de $5 - 9 \text{ nm}$. Los filamentos de β -actina se unen a través de proteínas y forman ramificaciones en las redes a 70 grados del filamento original que ayuda a la membrana celular a sobre salir durante la migración celular. La miosina junto con la actina, provocan que filamentos de F-actina se deslicen unos contra otros, lo que conlleva a la generación de una fuerza en la célula. (Marita L. Rodriguez P. J., 2013).

En la figura 5.14 se representan las partes principales de la célula.

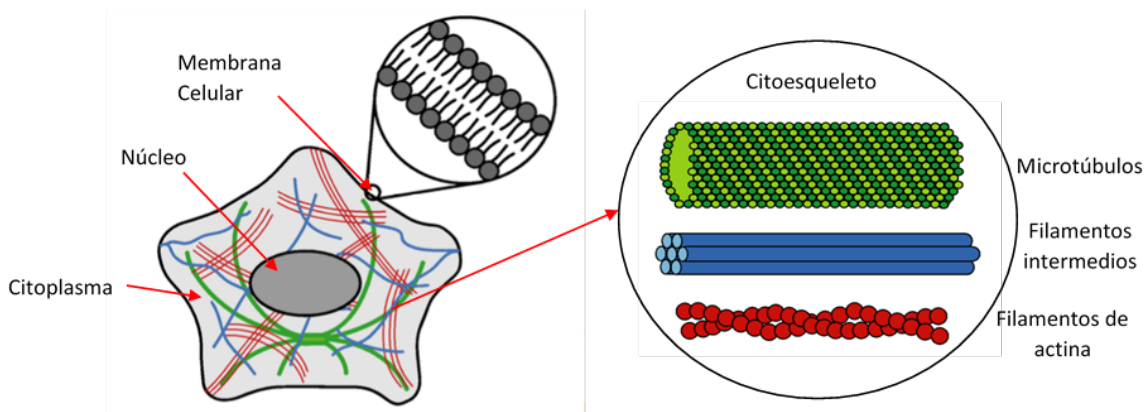


Figura 5.14 Esquema de las partes principales de la célula (imagen adaptada de (Marita L. Rodriguez P. J., 2013))

Para estas células se propone el modelo de tensegridad elástico, en el que se consideran todos los elementos de la célula (la membrana celular, el citoplasma y el núcleo) como materiales elásticos, cada uno con propiedades específicas y el citoesqueleto se considera como una estructura de tensegridad (Figura 5.15).

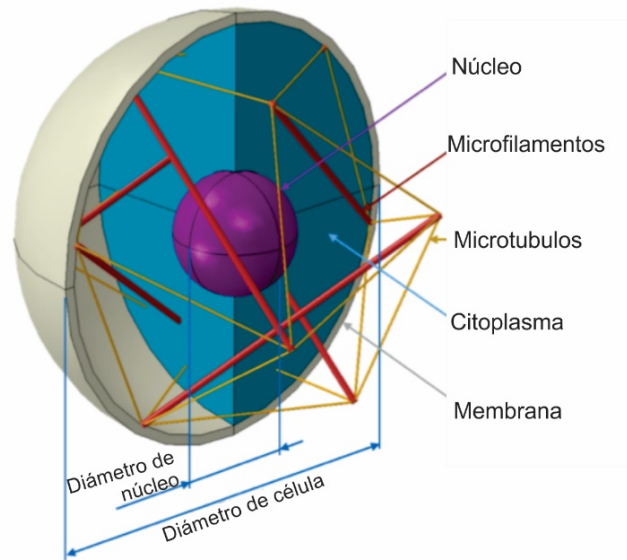


Figura 5.15 Modelo de Tensegridad elástico (imagen adaptada de (Chua, 2017))

Tensegridad es un término creado de las palabras, tensión e integridad y define a una estructura en tensión continua, lo que permite mantener su forma. Éste es un modelo muy aproximado al citoesqueleto de la célula, ya que su función principal es mantener la forma de la célula.

El modelo de tensegridad consta de microtúbulos que actúan como una especie de viga, un total de 6 vigas se encuentran acomodadas paralelamente en las 3 direcciones, y en 24 filamentos de actina que actúan como cables pretensados. (Figura 5.16)

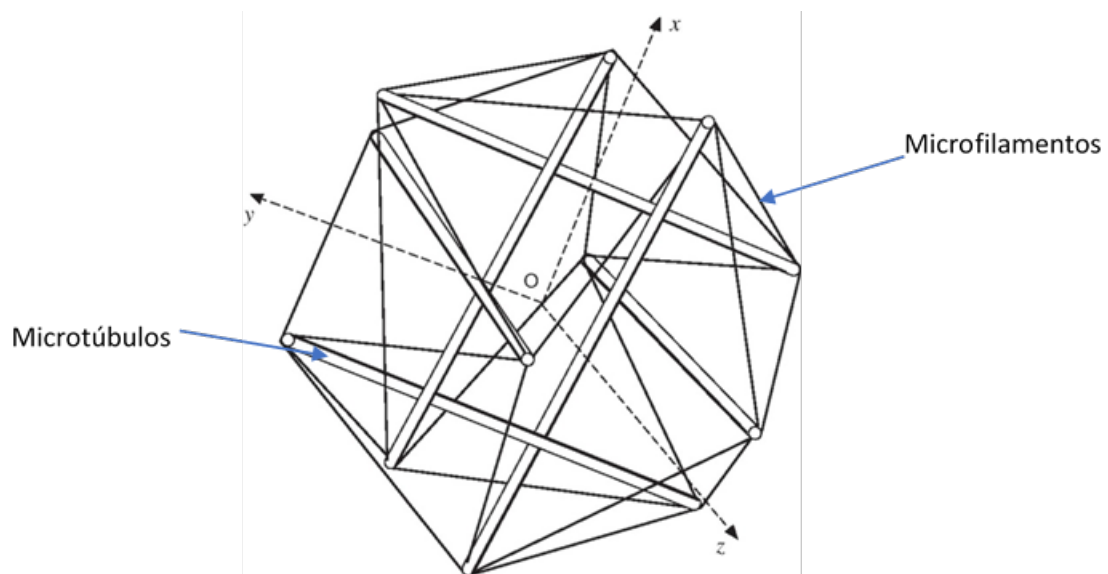


Figura 5.16 Estructura de tensegridad (imagen adaptada de (Chen, 2014))

La pretensión de los cables varía linealmente con el módulo de elasticidad.

Para realizar la geometría de tensegridad en COMSOL, se utiliza la física truss (estructura) para los microfilamentos y beams (viga) para los microtúbulos, que son módulos preestablecidos del programa, y se generan líneas representando al modelo de tensegridad. Para poder completar este modelo es necesario conocer las propiedades específicas de cada componente de las células. En el ensayo de tensión que se realizó solo se obtuvieron las propiedades generales de las células. Debido a la complejidad de la estructura no es posible suponer datos, sobre todo porque las células que fueron estudiadas se cultivaron como células adherentes y fueron convertidas, por medio de la tripsina, en células en suspensión. No se puede saber si la tripsina cambio algunas propiedades de la membrana o estructura celular. Además, no se cuenta con las propiedades mecánicas de esta línea celular sana, por otro lado, es conocido que las células cancerosas tienen una estructura aún más compleja, por ello se propone como trabajo a futuro, que, en los siguientes ensayos a tensión de estas células, se aplique a la muestra una solución fluorescente, de tal manera que se pueda observar la estructura interna de la célula, sobre todo el citoesqueleto y se puedan medir las propiedades de cada componente.

Conclusiones de capítulo

Los modelos matemáticos deben ser capaces de reproducir el comportamiento de las células, en este caso ante el ensayo de tensión a que fueron sometidos. Los dos modelos propuestos, el hiperelástico Neo-Hookeano y el elástico con no linealidad geométrica, se basan en la membrana celular, que es el principal componente en el que se rigen las propiedades mecánicas del GR. Los dos modelos tienen comportamientos no lineales, esta característica fue propuesta debido a que es el comportamiento del GR que se muestra en la mayor parte de la literatura y en nuestros resultados experimentales. El modelo hiperelástico Neo-Hookeano es el modelo que más se acerca al comportamiento de los resultados obtenidos de los ensayos de tensión, sin embargo, no reproduce en su totalidad el comportamiento observado experimentalmente. Las deformaciones resultantes de la experimentación son muy pequeñas y no son suficientes para reproducir el comportamiento total del GR, por lo tanto, no puede empatarse aun con un modelo matemático. Por tal motivo, como trabajo a futuro se propone realizar los ensayos de tensión con un láser adecuado (se propone en la mayoría de la literatura un láser infrarrojo de 1064 nm) para conseguir deformar lo suficiente el GR y así tener suficiente información como para construir un modelo matemático que reproduzca el comportamiento experimental de GR.

Las células en general tienen estructuras muy complejas, por ello se considera que el modelo de tensegridad es un modelo capaz de reproducir el comportamiento de células, sobre todo cancerígenas en un ensayo de tensión, es un modelo prometedor ya que toma en cuenta todos los componentes de una célula. Para poder alimentar este modelo es necesario tener las propiedades mecánicas de cada componente celular, sin embargo, en la literatura no hay información disponible, es por eso por lo que como trabajo a futuro se propone agregar a la muestra de células cancerosas una solución fluorescente con la cual se pueda observar el comportamiento de los distintos componentes y así obtener en el ensayo de tensión datos reales de sus propiedades mecánicas.

Conclusiones

En este trabajo se presenta un arreglo experimental de Pinzas Ópticas Holográficas con las cuales fue posible el atrapamiento y manipulación de varias partículas a la vez, mediante el uso de un Modulador Espacial de Luz. Con este elemento óptico difractivo fue posible atrapar de manera estable en 3D, dos partículas de poliestireno y manipularlas individualmente. Lo que posteriormente permitió atrapar partículas adheridas a distintas células.

En la adhesión de partículas de poliestireno a células se desarrollaron dos protocolos. El primer protocolo es de la adhesión de partículas a glóbulos rojos y el segundo la adhesión de partículas a células cancerosas (H1299, c33a y HeLa), con estos protocolos se aseguró una fuerte adherencia de las partículas a las células ya nunca existió una separación entre estas a pesar de que se sometieron a distintas pruebas de estiramiento, incluso cuando las células fueron adheridas a partículas de distintos diámetros ($1 \mu m$ y $2 \mu m$). Durante la optimización de los protocolos, se encontraron cantidades de partículas adheridas a la membrana de las células que no son óptimas para nuestro experimento, sin embargo, se encontraron las concentraciones adecuadas para que en su mayoría se adhirieran solo dos partículas a las células, particularmente en los extremos opuestos de las células, lo cual permitió realizar el ensayo de tensión a células.

En el ensayo de tensión que se realizó por medio del arreglo experimental de pinzas ópticas holográficas se logró deformar tanto glóbulos rojos como células cancerosas (h1299 y c33a). Se determinaron las propiedades mecánicas de estas células, que fueron el módulo de elasticidad y el coeficiente de Poisson. En el caso de los glóbulos rojos, las propiedades mecánicas que se obtuvieron se compararon con los que se reportan en la literatura y se obtienen resultados dentro de los rangos reportados. En el caso de las células con cáncer aún no existe información de sus propiedades mecánicas o de las propiedades mecánicas de misma línea sana, tampoco fue posible conseguir la célula sana de estos tipos para realizar el ensayo de tensión.

Desde la adherencia de partículas a células hasta los ensayos de tensión es posible detectar información valiosa de las células, por ejemplo, la afectación a nivel celular por un embarazo, donde se observó claramente una protección a la adherencia de partículas por parte de los glóbulos rojos, así como una disminución en el conteo de los mismos. Otro ejemplo fue, la respuesta en el ensayo de tensión realizada a glóbulos rojos de individuos que ingieren grandes cantidades de agua o que consumen frecuentemente aspirina. La particularidad de las células HeLa (células cancerosas

además de estar afectadas por el virus del papiloma humano) es que no responden como las otras células al protocolo de adhesión propuesto y presentan una ruptura interna en la estructura de la célula al realizar el ensayo de tensión.

Estudiar las propiedades mecánicas de las células en general permitirá dar a conocer información que aún es desconocida en el ámbito médico y que será posible continuar desarrollando en nuestro laboratorio, ya que con este trabajo se demuestra que el arreglo de pinzas ópticas holográficas que se implementó es una herramienta potencial para continuar con estos estudios.

El estudio experimental presentado es el inicio de nuevos desarrollos que se pueden realizar con un arreglo de pinzas ópticas holográficas como herramienta. El trabajo a futuro que permitirá mejorar los alcances del estudio de propiedades mecánicas de células comprende las siguientes actividades:

- Mejoras en las condiciones generales de protocolo de ensayo de tensión, como son mejoras al arreglo experimental de pinzas ópticas en cuanto a las variaciones que se mencionan en la sección de resultados. Estas mejoras se generalizan en buscar alguna manera de tener mayor estabilidad en la mesa óptica para disminuir las vibraciones que existen, mejorar variaciones del modulador solicitando apoyo por parte del proveedor para conocer el origen de estas variaciones, implementar un control en las condiciones térmicas que ayuden a conservar mayor tiempo las células y encontrar una óptima relación entre tiempos de videos para el ensayo de tensión de las células.
- Realizar los ensayos de tensión a glóbulos rojos con un láser infrarrojo de 1064 nm , que permitirá tener mayores deformaciones de la célula e información más completa del comportamiento de los Glóbulos Rojos, también permitirá una comparación total con los modelos matemáticos propuestos.
- Agregar soluciones fluorescentes a las muestras de células para que en el ensayo de tensión sea posible determinar las propiedades de todos los componentes de la célula y no solo las propiedades de la célula como un todo. Esto también permitirá desarrollar el modelo de tensegidad propuesto, ya que aún no se tiene información de las propiedades mecánicas de cada elemento de la célula y no fue posible replicar su comportamiento con el modelo matemático.
- Obtener células sanas de la misma familia de células cancerosas que ya fueron estudiadas.
- Mejorar el protocolo de adherencia para lograr el estiramiento de célula HeLa.

- Medir propiedades viscoelásticas de glóbulos rojos y células, realizando tensión y compresión cíclica a las células.
- Conseguir del mismo individuo células enfermas y sanas de la misma familia para poder comparar sus propiedades mecánicas y así determinar la afectación debida a la enfermedad, posteriormente se podrá suministrar medicamento a las células enfermas y estudiar sus efectos.
- Aplicar el ensayo de tensión a células enfermas con Leucemia, como son glóbulos rojos y blancos, y comparar con la información que ya se tiene sobre los glóbulos rojos sanos.

Las pinzas ópticas holográficas son una herramienta que tiene mucho futuro sobre todo en el ámbito de la ingeniería biomédica y es esencial su máximo aprovechamiento, ya que las posibles contribuciones al ámbito científico y a la sociedad son muchas y de gran utilidad.

Referencias

- Alexander Rohrbach, E. H. (2007). Optical Trapping of Small Particles. En Törö/Kao, *Optical Imaging and Microscopy* (Vol. 87). Springer.
- American Cancer Society. Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition. (2015).
<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-044738.pdf>. Recuperado el 19 de Abril de 2016, de <http://www.cancer.org>.
- Arora, M. (2006). Medios de Cultivo Celular: Una revisión. United States: University of Pittsburg Medical Center.
- Ashkin, A. (2000). History of Optical Trapping and Manipulation of small- Neutral Particle, Atoms and Molecules. *IEEE*, 841-856.
- Ashton, N. (2007). Physiology of red and white blood cells. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 203-208.
- Bangs Laboratories, I. (April 2015). *Material Properties of Polystyrene and Poly(methyl methacrylate) (PMMA) Microsphere*. Indiana: Tech Support Doc 0021.
- Beomkeum Kim, S. B. (2012). A comparison Among Neo-hookean Model, Mooney Rivlin Model, ang Orgen Model for Chloroprene Rubber. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing*, 759-764.
- Burman, A. (2010). *Caracterización y Control de un Microdisplay como Modulador Espacial de Luz*. Buenos Aires: Facultad de Ingeniería, Laboratorio de Aplicaciones Ópticas .
- Castaño, M. I. (2012). *Implementación de Pinzas Ópticas Holográficas para Manipulación de Microsistemas*. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Facultad de Ciencias, Medellín.
- Chen, J. (2014). Nanobiomechanics of living cells: a review. *Interface Focus*.
- Chua, L. (23 de Agosto de 2017). *Finite Element Modeling of a living cell*. Obtenido de <http://s1148054.weebly.com/methodology.html>
- Chuan Li, Y. P.-K. (2008). Correlations Between the Experimental and Numerical Investigation on the medical Properties of Erythrocyte by Laser Stretching. *IEEE Tansactions on Nanobioscience*, 80-90.
- Crocker, J. C. (1996). Methods of Digital Video Microscopy for Colloidal Studies. *Journal of Colloid and Interface Science*, 179(1), 298-310.
- De Rumi., Z. A. (2010). Theoretical concepts and models of Celula Mechanosensing. *Methods in Cell Biology*, 98, 143-175.
- Discher, J. L. (2001). Deformation-enhanced fluctuations in the red cell skeleton with theoretical relations to elasticity, connedctivity and spectrin unfolding. *Biophysics Journal*, 3178-3192.
- E Martín Barbosa, M. M.-U. (July de 2007). Design Strategies for Optimizing Holographic Optical Tweezers Set-Ups. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*.

- Eric R. Dufresne, G. C. (2001). Computer-generated holographic optical tweezer arrays. *Review of Scientific Instrumentes*, 72(3), 1810-1816.
- F. R. Camacho-Martínez, A. G.-G.-M.-L.-O. (2013). La estructura mecanica de una celula. *Lat. Am. J. Phys. Educ.*
- Gabriel C. Spalding, J. C. (2008). Holographic Optical Tweezers. En D. L. Andrews, *Structured Light and its Applications*. Elsevier.
- Gatzke, E. (October de 2016). Viscoelastic Materials: Stress Changing with Time. Maxwell and Standar Linear Model. *University of South Carolina*.
- Goodier, S. T. (1951). *Theory of Elasticity*. New York: McGraw- Hill.
- Helene Karcher, J. L. (2003). A Three-Dimensional Viscoelastic Model for Cell Deformation with Experimental Verification. *Biophysical Journal*.
- Hermann, H. B. (2007). Intermediary Filaments: From Cell Architecture to Nanomechanics. *Nature reviews, Molecular cell biology*, 562-573.
- Hetch, E. (2002). *Optics*. San Francisco: Addison Wesley.
- Hu Zhang, K.-K. L. (6 de July de 2006). Optical Tweezers for single cells. *Journal of The Royal Society*, 690.
- J. G. MCGARRY and P.J.PRENDERGAST. (2004). A Three- Dimensional Finite Element Model of an Adherent Eukaryotic Cell. *European Cell and Materials*, 27-34.
- J. L. Maciaszek, B. A. (2011). Microelasticity of Red Blood Cells in sickle cell disease. *J. Strain Analysis*, 46(DOI: 10.1177/0309324711398809), 368-379.
- J. Li, M. D. (2005). Spectrin-Level Modeling of the Cytoskeleton and Optical Tweezers Stretching of the Erythrocyte.
- Jeongho Kim, H. L. (2015). Advances in the measurement of red blood cell deformability: A brief review. *Journal of Cellular Biotechnology* , 63–79.
- Jinyang Liang, S.-Y. W. (June de 2012). Supression of the Zero-Order diffracted beam form pixelated Spatiol Light Modulator by Phase Compression. *Applied Optics*, 51.
- Jochen Guck, R. A. (2001). The Optical Stretcher: A Novel Laser Tool to Micromanipulate Cells. *Biophysical Journal*, 767-784.
- John A. Neff, R. A. (1990). Two-Dimensional Spatial Light Modulators: a Tutorial. *IEEE*, 826-855.
- Kulik, M. L. (2006). Quantitative Nanomechanical Measurements in Biology. En B. B. Fuchs, *Applied Scanning Probe Methods II* (págs. 205-237). Germany: Springer.
- Laboratorio de Genómica Viral y Humana, F. d. (2008). Preparación de Phosphate Buffered Saline (PBS). *Standard Operating Procedures (SOPs)*.
- Lebedev, P. (1901). *Experimental Examination of Light Pressure*. Moscow.

- Li, T. (2013). *Fundamental Test of Physics with Optically Trapped Microshperes*. University of Texas at Austin. Austin: Springer .
- Lim, G. Y. (2006). Biomechanics approaches to studying human diseases. *ELSEVIER*, 25, 111-118.
- Lincoln, B. e. (2002). Deformability-based flowcytometry. *Cytometry*, A(59A), 203-209.
- M. Dao, C. L. (2003). Mechanics of the Red Blood Cell Deformes by optical Tweezers. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, 2259-2280.
- M. Kojic, B. S. (2008). Cells Mechanics. En *Computer Modeling in Bioengineering*. John Wiley & Sons, Ltd.
- M. Lekka, P. (1999). Elasticity of normal and cancerous human bladder cells tudied by scanning force microscopy. *Eur Biophys*, 28, 312-316.
- Macosko, C. W. (1994). *RHEOLOGY. Principles, Measurements and Applications*. Danvers: Wiley-VCH.
- Malgorzata Lekka, K. a.-B.-Z. (2012). Cancer cell recognition- Mechanical phenotype. *Micron, El Sevier*, 1259-1266.
- Marita L. Rodriguez, P. J. (November de 2013). Review on Cell Mechanics: Experimental and Modeling Approaches. *Applied Mechanical Reviews*, 65, 41.
- Miles J. Padgett, J. E. (2010). *Optical Tweezer: Methods and Applications*. Boca Raton, FL: Taylor and Francis Group.
- Paul B. Bareil, Y. S.-Q. (2007). Calculation of spherical red blood cell deformation in a dual-beam optical stretcher. *Optical Society of America* , 16029-16024.
- R.A González Carbonell, E. Á. (2009). Modelos de los materiales hiperelásticos para el analisis de los elastómeros usando el MEF. *Ingeniería Mecánica*, 57-66.
- Richard D. L. Hanes, M. C. (2009). Combined Holographic-Mechanical Optical Tweezers: Construction, Optimization and Calibration. *Review of Ccientific Instruments*.
- Rob, M. R. (2 de November de 2016). *Cell Biology by the numbers*. Obtenido de <http://book.bionumbers.org/>
- Scott, W. (2011). *Computational Approaches to Undersatnd Phenotypic Structure and Constitutive Mechanics Relationships of Single Cells*. Clemson University.
- Sönnnerlind, H. (14 de Septiembre de 2015). *COMSOL*. Obtenido de <https://www.comsol.com/blogs/what-is-geometric-nonlinearity/>
- Sylvie Hénon, G. L. (1999). A new determination of the Shear Modulus of the Human Erythrocyte Membran using Optical Tweezers. *Biophysical Journal*, 1145-1151.
- Victor Soifer, V. K. (1997). *Iterative MEmods for Diffractive Optical Elements Computation*. Taylor and Francis.

- Villalba, C. A. (15 de Agosto de 2017). *Emaze*. Obtenido de <https://www.emaze.com/@AQWOROZC/Clase-Torsi%C3%B3n>
- Ward KA, L. W. (1991). Viscoelastic properties of transformed cells: role in tumor cell progression and metastasis formation. *Biorheology*, 301-313.
- Waugh, R. H. (1987). Erythrocyte membrane elasticity and viscosity. *Annual Review in Physiology*, 209-219.
- Wottawah, F. e. (2005). Characterizing single suspended cells by optorheology. *Acta Biomater*, 263-271.
- Yoshihiro Ujihara, M. N. (2010). Proposed Spring Network Cell Model Based on a Minimum Energy Concept. *Annals of Bioengineering*, 1530-1538.
- Youhou Tan, C.-w. K. (2011). "Probing the mechanobiological properties of human embryonic stem cells in cardiac differentiation by optical tweezers". *Journal of Biomechanics*.
- Young-Zoon Yoon, J. K. (2008). The Nonlinear Mechanical Response of the Red Blood Cell. *IOP Publishing*, 1-8.