

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD QUERETARO

**Microscopia de barrido de punta de prueba aplicado al
estudio de células**

Tesis que presenta

Q.B. Eleazar León Sarabia

para obtener el Grado de

Maestro en Ciencias

En la Especialidad de

Materiales

Directores de la Tesis:

Dr. Francisco Javier Espinoza Beltrán

Dra. Lía Isabel Pietrasanta

Santiago de Querétaro, Qro.



Enero 2012

CLASS: CO 0018
ADMNIS: CO-195-SS1
REQD: 24-08-2012
PROG: Don-2012
\$

IO 199444-2001

Dedicatorias y Agradecimientos

Agradezco a mis padres y hermanos por su apoyo y soporte incondicional que siempre me han otorgado.

Al Dr. Francisco Espinoza Beltrán, Dra. Lia Pietrasanta mis asesores, por darme la gran oportunidad, de guiarme, instruirme en el trabajo científico, por el respeto y la amistad.

A todos el personal académico, técnico y compañeros de Cinvestav por su aportación y respaldo muchas gracias.

A CINVESTAV por albergarme durante mi formación como maestra en ciencias.

A CONACYT por el apoyo otorgado durante la duración del programa.

A la Dra. Lia Pietrasanta de la Universidad de Buenos Aires en especial al CMA, por su ayuda y paciencia, en particular a Micaela Bianchi gracias por tu paciencia y ayuda mil gracias y a todo el grupo de trabajo mil gracias.

A mi novia Lucia Elhy Grijalva Por su apoyo mil gracias amor mío.

A Christian Enriquez y Edgar Cruz por su aportación científica para el buen término de este trabajo.

CONTENIDO

RESUMEN	vii
ABTRACT	vii
CAPITULO I : INTRODUCCION	1
CAPITULO II: JUSTIFICACION	6
CAPITULO III: OBJETIVOS	7
Objetivo General	7
Objetivos Particulares	7
CAPITULO IV: LA CÉLULA	8
Los componentes estructurales involucrados en la mecánica de la célula	10
Citoesqueleto	10
La Matriz Extracelular	11
Receptores de adhesión Celular	11
Citoplasma	12
Membrana Celular	13
CAPITULO V: Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)	14
Microscopia de Fuerza Atómica aplicada a la biología celular	17
Principio de Funcionamiento	17
Células: Imágenes de Vida	18
Modo de contacto intermitente	20
Modo de contacto	20
Mediciones mecánicas	23
Medidas viscoelásticas	24
Mecánica celular	28
Eventos mecánicos en la función fisiológica	29
Microreología celular	31
Blandura	31
Viscoelasticidad: términos, definiciones y modelos estándar	32
Estructuras mecánicas de las células	33

Espectroscopia de Fuerza Atómica (AFS)	33
Conceptos básicos de AFS	34
Viscoelasticidad celular	36
CAPITULO VI: MATERIALES Y METODOS	39
Microscopia de fuerza atómica	39
Control en la calibración del barredor piezoeléctrico	40
Calibración	40
Primeros intentos con células	45
Preparación de muestras	46
Modo de funcionamiento AFM	49
Modo de contacto intermitente (IC-AFM)	49
Modo de contacto (CM-AFM)	51
Curvas de fuerza-distancia	53
CAPITULO VII: RESULTADOS	57
CAPITULO VIII: CONCLUSIONES	71
CAPITULO IX: PERSPECTIVAS	73
APENDICE I	74
APENDICE II	78
BIBLIOGRAFIA	80

LISTA DE FIGURAS

Fig 1. <i>membrana eritrocitaria con sus componentes proteínicos...</i>	9
Fig 2. <i>Esquema Típico de un AFM.</i>	18
Fig 3. <i>Altura 3D (izquierda) y la deflexión (derecha) de una alveolar primaria de la rata en condiciones de líquido...</i>	21
Fig 4. <i>Curva de fuerza obtenida con un AFM</i>	25
Fig 5. <i>Esquema que representa el contacto punta- célula en una curva de fuerza.</i>	35
Fig 6. <i>Desviación distancia (dz) curva obtenida con una punta esférica...</i>	38
Fig 7. <i>Microscopio de fuerza atómica Nanoscope IV Dimesion 3100 de Bruker..</i>	39
Fig 8. <i>Microscopio de fuerza atómica Nanoscope III Multimode40..</i>	
Fig 9. <i>Rejilla de referencia modelo TGT01 de la firma NT-MDT. Imágenes SEM (a) y AFM de topografía (b) y de deflexión (c) de la rejilla...</i>	41
Fig 10. <i>Imágenes de la grilla NanoGauge NGR-2...</i>	42
Fig 11. <i>Imágenes de topografía de las grillas TGZ01 y TGZ03...</i>	43
Fig 12. <i>Oro recocido inmerso en PBS, preparación para realizar medidas en medio líquido.</i>	44
Fig 13. <i>Primero intentos con células, comparación entre microscopia óptica convencional y TM-AFM.</i>	45
Fig 14 <i>Preparación de un frotis celular para su posterior análisis</i>	46
Fig 15. <i>Soporte donde va colocada la sonda o punta de trabajo.</i>	47
Fig 16. <i>se muestra la celda necesaria para realizar medidas en un medio líquido</i>	48
Fig 17. <i>Intensidad de la señal del fotodiodo, cual nos indica si el láser está incidiendo en la sonda</i>	49
Fig 18. <i>Modelos de curvas de fuerzas representativas</i>	54
Fig 19. <i>Primeros intentos con AFM con células vivas.</i>	57
Fig 20. <i>frotis celular de sangre periferica.....</i>	58
Fig 22. <i>Segmentado encontrado en el frotis de una persona fumadora...</i>	60
Fig 23. <i>Muestra una serie de imágenes obtenidas en modo de Contacto</i>	61

Fig 24. <i>Estructuras Sanguíneas observadas por AFM...</i>	62
Fig 25. <i>Coeficiente de fricción de un eritrocito de personas con distinto grado de tabaquismo</i>	63
Fig 26. <i>Imágenes de trazo y retrazo de las células con distinto grado de tabaquismo.</i>	63
Fig 27. <i>Gráfica que representa el coeficiente de fricción de glóbulos rojos...</i>	64
Fig 28. <i>Perfil de un Eritrocito realizado con el Digital Instrumental</i>	65
Fig 29. <i>A) muestra la topografía de un extenso celular, en el B) se muestra al Amplitud de este frotis celular donde se realzan...</i>	66
Fig 30. <i>Células HeLa Fijas y vivas y las curvas de fuerzas....</i>	67
Fig 31. <i>Determinación del módulo de elasticidad aplicando el modelo de Radmacher basado en un contacto Hertziano.</i>	69
Fig 32. <i>Modo de trabajo AFM uno de las aplicaciones más Novedosas en el área de la Biología</i>	70

RESUMEN

La microscopía de barrido por sonda cubre varias tecnologías relacionadas, para obtener imágenes y mediciones de superficies a escalas micro- y nano- métrica, hasta el nivel de moléculas y de grupos de átomos. En el otro extremo de la escala, una exploración puede cubrir una distancia de más de 100 μm en las direcciones x e y y 4-10 μm en la dirección z . Puede decirse que el desarrollo de esta tecnología es un gran logro, ya que está teniendo profundos efectos en muchos áreas de la ciencia y la ingeniería como en el caso de la medicina. Las técnicas SPM (por sus siglas en inglés, Scanning Probe Microscopy) comparten el concepto de exploración con una sonda o punta muy afilada (3-50 nm de radio de curvatura) en la superficie del objeto. La sonda está formada por un cantiléver flexible con una punta en su extremo, permitiendo que siga el perfil de la superficie. Cuando la sonda se mueve en las proximidades del objeto investigado, las fuerzas de interacción entre la punta y la superficie influyen en el movimiento de la sonda. Varias interacciones pueden ser estudiadas en función de la mecánica de la sonda. La Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) mide la fuerza de interacción entre la punta y la superficie. La sonda en forma de cantiléver puede ser arrastrada por la superficie y puede vibrar simultáneamente a medida que avanza. La fuerza de interacción dependerá de la naturaleza de la muestra, de la geometría de la sonda y de la distancia entre ellos. Dentro de la variedad de modos SPM tenemos además la microscopía de efecto túnel (STM, Scanning Tunneling Microscopy) y la microscopía óptica de campo cercano (NSOM, near field scanning optical microscopy), donde la sonda es un aguja conductora o una fibra óptica, respectivamente. En el presente trabajo se estudian sistemas biológicos por medio de técnicas AFM, Particularmente, con los modos de contacto, oscilantes o *tapping*, microscopía acústica de fuerza atómica (AFAM, atomic force acoustic microscopy), nanofricción y análisis de curvas de fuerza (force-volume) para determinar adherencia en células sanguíneas y HeLa por medio de frotis sobre vidrio en seco y en medio líquido.

ABSTRACT

The scanning probe microscopy covers several related technologies for obtain images and measuring surfaces at micro and nano-metric, to the level of molecules and groups of atoms. At the far end of the scale, a scan can cover a distance of more than 100 μ m in the directions of x, y and 4-10 μ m in the z direction. It might say that the development of this technology is a great achievement and who is having profound effects on many areas of science and engineering as in the case of medicine. SPM techniques (for its acronym in English, Scanning Probe Microscopy) share the concept of exploration with a probe or very sharp tip (3-50 nm radius of curvature) on the surface of the object. The probe consists of a flexible cantilever with a tip at its end, allowing it to follow the surface profile. When the probe moves in the vicinity of the object under investigation, the interaction forces between the tip and the surface influence the movement of the probe. Several interactions can be studied in terms of the mechanics of the probe. Atomic Force Microscopy (AFM) measures the interaction force between tip and surface. The cantilever shaped probe can be dragged across the surface and can vibrate as it moves simultaneously. The strength of interaction depends on the nature of the sample, the geometry of the probe and the distance between them. Within the range of SPM modes have also scanning tunneling microscopy (STM, Scanning Tunneling Microscopy) and scanning near field optical microscopy (NSOM, scanning near field optical microscopy), where the probe is a conductive needle or an optical fiber, respectively. In this paper we study biological systems by AFM techniques, particularly with the modes of contact, oscillating or tapping atomic force acoustic microscopy (AFAM, atomic force microscopy acoustic) nanofricción and analysis of force curves (force- volume) to determine adherence in HeLa cells per blood smear on dry glass and liquid medium.

INTRODUCCIÓN

El propósito principal de este trabajo es demostrar la relevancia de las técnicas de AFM y dar una visión de algunas dificultades que quedan por resolver en este campo, en términos de preparación de muestras y de instrumentación, así como presentar un resumen de algunos desarrollos recientes en aplicaciones de instrumentación y la posible existencia de los métodos descritos en el contexto de la biología y las ciencias de la salud.

Como el telescopio nos permite echar un vistazo al universo, la radiografía computarizada, la tomografía y la resonancia magnética nuclear (RMN) nos permiten observar el interior de nuestro cuerpo y su imagen de esqueleto y los órganos en tres dimensiones. Del mismo modo, con el microscopio podemos explorar el microcosmos de las células y de los tejidos siguiendo el camino hacia las dimensiones de las moléculas y de los átomos.

Por ejemplo, "cortando" secciones ópticas por medio del microscopio láser confocal de barrido (CLSM), nos permite mirar dentro de las células y tejidos vivos. El uso de microscopía óptica de luz visible mejorada permite visualizar las estructuras celulares cuyos detalles están un orden de magnitud o más por debajo del límite de la resolución del microscopio óptico convencional, lo que ha permitido que los motores moleculares puedan ser observados directamente en funcionamiento. La microscopia electrónica de barrido (SEM) puede cubrir una gama muy amplia de dimensiones celulares, sus orgánulos, el citoesqueleto y los ensamblajes supramoleculares, así como biomoléculas individuales, su estructura submolecular, etc. Sin embargo, no puede soportar el alto vacío dentro de un SEM, ya que las muestras biológicas se deshidrata, causando por lo tanto su desnaturalización por lo que están sujetas a defectos de preparación. Una manera de salir de este dilema ha sido la introducción de nitrógeno líquido para conservar la muestra en una película delgada de hielo amorfo, mientras que se inspeccionan las imágenes por SEM. Recientemente, el microscopio de fuerza

atómica (AFM) ha abierto perspectivas totalmente nuevas para el análisis de la topografía de la superficie de la materia biológica en su entorno acuoso a una resolución comparable a la alcanzada por SEM. Lo más emocionante, es que el AFM permite obtener las primeras imágenes con una correlación directa entre los estados estructurales y funcionales de las biomoléculas con una resolución de submolecular sin que éstas sufran ninguna alteración.

Todas las criaturas vivas están formadas por células y de ahí reside la importancia de conocer a detalle las estructuras y funciones de las mismas. Las células ocupan un punto intermedio en la escala de la complejidad biológica; las estudiamos para aprender, por un lado, como están formadas a partir de las moléculas. La tecnología actual tiene una fuerte tendencia a la nano-miniaturización, como se refleja en el desarrollo de cada vez más pequeños y eficientes dispositivos electrónicos, sensores, etc. Esta miniaturización ya está presente en el mundo biológico, en las partes de una célula. En esta escala, las mediciones buscan hacerse más precisas, por lo que los microscopios tienen que ser más potentes y con mayor resolución. Es de aquí de donde se aprovechan los desarrollos tecnológicos en ciencias que no son tan afines como la biología, medicina, bioquímica y las ciencias de los materiales, micro y nano-electrónica o ingenierías. Los nuevos sistemas de microscopia son muy sensibles, capaces de medir cuantitativamente, observar y caracterizar procesos biológicos que en tiempos pasados recientes prácticamente era un sueño imposible.

Se ha visto el gran potencial de las modernas técnicas de microscopia en la aplicación de la nanotecnología, como resultado, se ha tratado de incorporar el valor intrínseco de las propiedades de los nanomateriales con las técnicas convencionales en un intento de mejorar los métodos de detección y tratamientos para un mejor resultado. Recientemente, muchos estudios han reportado que la nanotecnología biomolecular ha mejorado la sensibilidad de detección, diagnóstico de la enfermedad, la eficiencia y el tratamiento. Por supuesto, la aplicación de estos principios en la física bajo el contexto de un sistema biológico puede ser un reto, y la fuerza de cualquier modelo matemático reside en su capacidad para centrarse quedando expresamente inspirada en el fenómeno de interés, sin dejar de tratar las interacciones más relevantes con su entorno para producir predicciones exactas. Por desgracia, cuando se trata de modelos en el campo de

la nanomedicina, hay la precisión es particularmente difícil entre los diferentes puntos de vista. Esto se debe a que la nanomedicina, para ser eficaz, requiere un alto grado de acoplamiento entre la física y química que producen los procesos a escala nanométrica y la biológica de los procesos que ocurren en la escala de micras o más. Obviamente, los enfoques matemáticos para nanobiosistemas. Una de las herramientas útiles para estos propósitos es el AFM o en general las técnicas SPM que nos ofrecen un panorama bastante prometedor acerca de la caracterización y evaluación de muestras de origen biológico que típicamente no se miden o analizan, pero que aportan datos muy interesantes acerca de este tipo de materiales. (Zhang et al, 2009)

El AFM es un microscopio que su funcionamiento está basado en un cantiléver que tiene en su extremo una punta muy fina que es la que barre la superficie de la muestra, ya sea aplicando a fuerza constante de contacto o manteniendo una altura constante, monitoreada por un láser cuyas desviaciones detectan la deflexión del cantiléver. Las deflexiones de la sonda deflecan un Láser que es captado por un arreglo de fotodiodos que envían una señal a un sistema de retroalimentación manteniendo la fuerza o la distancia constante por medio de un piezoeléctrico.

El AFM no solo se trabaja con los distintos modos que tiene este equipo, sino que se pueden funcionalizar las puntas de la sonda para mediciones de fuerza entre moléculas específicas, como anticuerpos y sus antígeno [23].

Además de poder funcionalizar las puntas, se puede combinar con sistemas de microscopia óptica convencional como el caso de un microscopio de epi-fluorescencia, para sistemas *in vivo*, con lo cual habrá un sinnúmero de oportunidades para sistemas biológicas sin tener que realizar algún tratamiento, siendo métodos menos invasivos, además de otorgar la posibilidad de medir bajo condiciones fisiológicas y en tiempo real [24].

El problema o la desventaja de este método es que se necesita un cabezal o celda para medios líquidos o bien un sustrato y una técnica de fijado lo suficiente estable para mantenerlo fijo sin alterar mínimamente la estructura de la muestra y ese es uno de los retos que aporta este microscopio.

Una de las bondades de la microscopia de fuerza atómica es seguir la fibrilación o una cascada enzimática *in situ* es algo que no tiene precedentes [25]

A la luz de estos antecedentes está por demás decir que el AFM representa una nueva herramienta para los antiguos problemas de la bioquímica, histología, biología celular y otras ciencias médicas. Externamente por la oscilación del cantiléver, AFM puede determinar la elasticidad de una superficie mediante la evaluación de la frecuencia de resonancia del cantiléver. Posteriormente, el AFM puede determinar la elasticidad de los glóbulos rojos extracorpórea. La elasticidad, o módulo de Young de un glóbulo rojo normal es de 40 kPa. La elasticidad de los glóbulos rojos aumenta cuando se convierte extracorpórea. Se encontró que la elasticidad de los glóbulos rojos aumenta casi 8 veces, arriba de 300 kPa cuando se mide 1.5 h después de la hemorragia. En un plazo de 30 h, la elasticidad se convierte en 600 kPa. Medir el módulo de Young de los glóbulos rojos en manchas de sangre puede ser útil en la estimación de la edad. Este método es mínimamente invasivo y una muestra se puede medir varias veces. Sin embargo, la gran desviación estándar de estas mediciones, en el orden del 60% de la elasticidad de la medida, se opone a la estimación de edad imprecisa. Han utilizado las mediciones de AFM para determinar el volumen de glóbulos rojos de células y las fuerzas de adhesión. Ellos encontraron que el volumen de las células se mantiene constante después de la deposición, mientras que la fuerza adhesiva muestra un aumento repentino después de siete días y poder así determinar sus propiedades mecánicas y de las mismas. [26]

En este contexto, la investigación la estructura de la materia viva es la clave para la correlación de la arquitectura molecular de los sistemas biológicos con sus funciones. Sin embargo, el éxito y estudio eficaz de un sistema biológico depende en gran medida la pregunta biológica directa, la elección de un método apropiado, y de manera óptima la preparación de la muestra a fin de mantener su integridad estructural y funcional. Para dar una respuesta detallada a una pregunta biológica, la biología estructural moderna implica una variedad de técnicas totalmente para investigar el material biológico de interés. Sin embargo, la complejidad de la muestra biológica en términos de tamaño, forma y consistencia (sistemas multifásicos) y la localización de la biomolécula, aislada o que representan una parte integral del tejido biológico. Por lo tanto, los requisitos para este tipo de sistemas en términos de resolución y la funcionalidad, reducen la elección de herramientas disponibles y su aplicación potencial. Un gran número de las herramientas actuales en la ciencia fundamental y la

cirugía son simplemente demasiado grandes para examinar y manipular las estructuras en nuestro nivel de interés. Es por eso que el microscopio de fuerza atómica nos brinda una enorme ventaja por su nula preparación de las muestras, siendo una técnica no invasiva pudiendo analizar células en medio líquido y en condiciones fisiológicas. [27,28]

LA CELULA

La célula, en el estricto sentido, es la unidad biológica independiente más pequeña. Las células se dividen en dos grandes grupos: eucariontes y procariontes. Las formas y variedades de las células son tan extensas que es casi imposible estudiarlas por separado, por lo que en la actualidad es necesario contar con un modelo que abarque un comportamiento general de las diferentes células.

Las células constituyen las unidades estructurales y funcionales básicas de los organismos y las unidades vivas más pequeñas del cuerpo humano. Entre los diferentes tipos de células corporales están las musculares, nerviosas y sanguíneas [1]

Las células vivas son sistemas complejos, multifuncionales cuyas propiedades físicas son relativamente desconocidas donde estas son críticas ya que afectan la plasticidad, morfología celular, conectividad y la respuesta a los estímulos que se relaciona fundamentalmente con el carácter de micromecánica y la capacidad de la célula para realizar señalización mecánica dirigida.

Habilidades únicas de la microscopía de fuerza atómica en la medición de las propiedades viscoelásticas celulares (en escalas de longitud de nanómetros a micras) son exploradas en este trabajo con aplicaciones específicas para eritrocitos. Incluyendo técnicas de mapeo de la rigidez de superficie por indentación, así como medidas cuantitativas de frecuencia dependen de reología compleja que presentan las células.

En las células del músculo liso, una red de fibra isotrópica de actina, ofrece una fuerte resistencia a la deformación [18]. La polimerización de la actina es en gran parte responsable de la rigidez después de la activación contráctil, interaccionando con la miosina por medio de la formación de puentes cruzados. En las dendritas neuronales, el contraste se correlaciona con la rigidez de la distribución conocida y la estabilidad de los elementos del citoesqueleto: los microtúbulos a lo largo de los ejes y la dinámica de actina en las espinas (de tamaño micro protuberancias de la superficie). La atención se

centra en las espinas dendríticas como los sitios de contacto post-sináptica para la transmisión de más excitación entre las neuronas. Gran heterogeneidad que se observa en las propiedades mecánicas columna, pero son más rígidas las espinas parecen estar asociadas con axón-en los contactos. Las espinas se endurecen en respuesta a la estimulación sináptica, de acuerdo con las observaciones recientes de actina basada en la estabilización de la forma de la columna vertebral (reducción de la motilidad) después de los tratamientos de excitación cabe destacar que la dependencia de la frecuencia del complejo de módulos de corte (0.5-100 KHz). Una viscosidad newtoniana (líquido puro), componente también se identifica con efectos significativos para las deformaciones de alta frecuencia. En conjunto, estas características son fundamentales para la descripción de celulares de remodelación: la contracción de células musculares lisas o la plasticidad sináptica en las espinas dendríticas.

Es muy probable que el entendimiento de la estructura y función de la célula contribuya significativamente al desarrollo de una nueva generación de materiales biomiméticos basados en nanotecnología con múltiples aplicaciones biomédicas, entre las que se encuentran: biosensores, liposomas reforzados y agentes de transporte y liberación controlada de fármacos. A continuación se muestra el esquema (ver Fig. 1) de la membrana eritrocitaria y sus componentes.

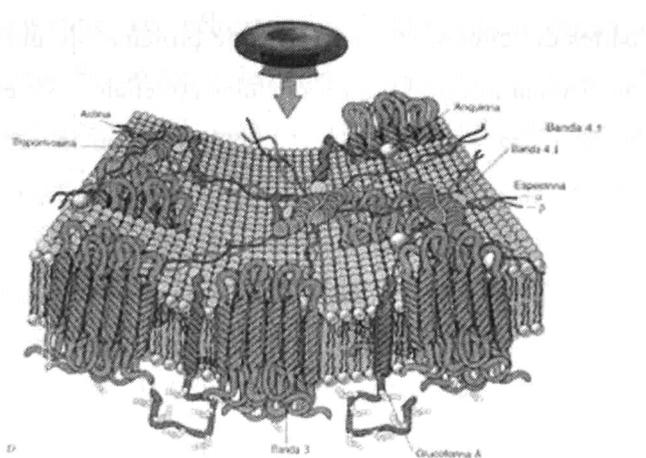


Fig 1.- membrana eritrocitaria con sus componentes proteínicos. Células HeLa[18]

Los componentes estructurales involucrados en la mecánica de la célula.

Las células son organismos complejos formados por una enorme cantidad de moléculas diferentes y orgánulos. La estructura, organización y la naturaleza de estos componentes determinan los diferentes tipos de células, su función, su comunicación con el entorno, su ciclo en vivo y como se describe en esta sección, su comportamiento mecánico [2].

Citoesqueleto

La palabra citoesqueleto (CSK) tiene el significado etimológico del esqueleto, el CSK de hecho juega un papel central en el mantenimiento y la organización de la morfología estructural de la célula. Es más que una estructura estática inerte, que soporta el cuerpo celular. También se presenta como la musculatura y el aparato circulatorio sistema de la célula, siendo responsable de rastreo celular, contracción de las células, el tráfico intracelular, y la división celular. El CSK forma una red de tres tipos principales de fibras de proteínas obligadas por una serie de conectores intermoleculares y los motores moleculares, y conectado a la medio extracelular y las células vecinas por los receptores de membrana. Se cree que el citoesqueleto es el principal responsable de la mecánica celular. La estructura, organización y composición del Sistema Integrado (SI) varían de un tipo de célula a otra [2]. Los SI's están por lo general unidos a otras partes del citoesqueleto a través de proteínas de unión, tales como plectinas, formando un sistema integrado. En las células epiteliales, por ejemplo, los filamentos de queratina forman una red por todo el citoplasma con mayor concentración cerca de la región central, está conectado a las células vecinas por las estructuras específicas en las uniones celulares. Sus propiedades mecánicas sugieren que si puede contribuir a la elasticidad de las células a través de una carga de tracción. Su contribución puede ser insignificante en bajas cargas, cada vez más importante en cargas altas. Además, si también se encuentran para adaptar las formas de células específicas, tales como las neuronas. Se han tratado de explicar la mecánica celular en términos de la medición de las propiedades mecánicas de los polímeros. Sin embargo, parece difícil encontrar una explicación completa y satisfactoria del comportamiento mecánico de la célula por medio de los componentes del CSK. La complejidad de la mecánica celular comprende su estructura organización, el entrecruzamiento entre los filamentos, la adherencia a las otras células y la matriz

extracelular, y la cooperación con otros orgánulos celulares. Parece, pues, importante la medición in situ de la mecánica celular en condiciones fisiológicas [2].

La Matriz Extracelular

La matriz extracelular (por sus siglas en Inglés, ECM, extracellular matrix) se puede ver como una extensión externa del CSK. La ECM es una densa red formada por varios tipos de fibras de proteínas como la fibronectina, el colágeno, o laminina secretada por las células mismas. El diámetro de los componentes de esta red va desde decenas a cientos de nm. Las células se adhieren a través de los contactos de adhesión focal, que son grupos de receptores de membrana (integrinas) y las moléculas citoplasmáticas. Un componente importante es el aminoácido secuencia Arg-Gly-Asp (RGD), que es el sitio de unión para varios receptores de la integrina a fibras de la ECM. La composición de la ECM depende principalmente del tipo de tejido. Su rigidez es determinada principalmente por fibras de colágeno y es del mismo orden de magnitud de la de las células vivas, 100-1000 Pa. La ECM sirve como un andamio para apoyar a las células cuando se forman los tejidos vivos. Se ha demostrado que la densidad de las proteínas en la ECM, determina en gran medida, la forma y la rigidez de las células cultivadas. Así como lo hace el fortalecimiento de las células los sitios de adhesión. De hecho, la ECM soporta parte de las fuerzas mecánicas en el CSK. El equilibrio de fuerzas entre las células y la ECM regula la forma celular, rigidez y estabilidad estructural. Por lo tanto, la ECM parece ser crucial para el desarrollo y la función de los tejidos vivos y, por lo tanto, a como las células perciben y responden a estímulos mecánicos [2].

Receptores de Adhesión Celular

Como se mencionó en la sección anterior, el comportamiento de las células, la función, el movimiento y las propiedades mecánicas se determinan por los accesorios específicos de su entorno. Se forman las células de los tejidos mediante la adhesión a las células vecinas y con la ECM. Hay una cantidad amplia de receptores de adhesión de estructuras relacionadas. Integrinas, cadherinas, la adhesión de células de inmunoglobulina moléculas y selectinas se encuentran entre los sitios de adhesión más importantes. La mayoría de las moléculas de adhesión están relacionadas con el apoyo y la aplicación de fuerzas mecánicas, fundamental para la movilidad, o la

contracción y en relación con el mantenimiento de la integridad de los tejidos.

Los complejos formados relacionados con los receptores de adhesión sirven como andamios de cascadas de señalización y como los principales sitios de aplicación de la fuerza. El área de estas fibras de actina (FA) es de $\sim 1 \mu\text{m}^2$. Sin embargo, el tamaño y la fuerza de la FA son moduladas por la célula en función de las propiedades mecánicas y composición bioquímica de la ECM. Los esfuerzos de las fibras están generalmente asociados a los FA y las fuerzas generadas por las células se pueden medir con diferentes técnicas, tales como la microscopía de tracción utilizando geles flexibles, elastómeros patrón, o un arreglo de canales flexibles en el que las células son cultivadas. Utilizando técnicas, la fuerza por unidad de superficies generadas por las diferentes células se han estimado en el rango entre 1 y 10 nN/ μm^2 .

Citoplasma

El citoplasma de las células de vertebrados está compuesto por agua y del 20-40% (w / v) de proteínas. Esta alta concentración de moléculas conduce a que el citoplasma está muy poblado, en contraposición con la visión clásica de la célula como un globo lleno de agua donde las moléculas se mueven libremente. Reciente se han desarrollado técnicas de microscopía que permiten visualizar el citoplasma con alta resolución y con pocos cambios en su composición y su estructura nativa. Imágenes de tomografía criomicroscopía electrónica de las células de *Dictyostelium discoideum* reveló una interior de la célula denso que ha dado lugar a un nuevo término para describir el citoplasma celular y hacinamiento molecular. Esta organización densa implica que entre el 5% y 40% del volumen total de la célula está ocupada por macromoléculas, que pueden competir entre unos a otros para ocupar el volumen disponible. A pesar de las implicaciones del hacinamiento macromolecular, no ha sido estudiado en detalle- Parece probable una contribución importante en la viscoelasticidad celular en general. Las primeras mediciones de la viscosidad del citoplasma se llevaron a cabo en 1950 por Crick y Hugues con partículas de tamaño micrométrico incorporado en el citoplasma de las células. Las mediciones directas más recientes de los extractos citoplasmáticos de huevos de *Xenopus laevis* utilizaron reómetros convencionales arrojando un módulo de elasticidad de 2.10 Pa y un módulo de pérdida de 0.5 a 5 Pa, [3,4].

La Membrana Celular

La membrana celular está formada por una bicapa lipídica con las moléculas de proteína integral de diferentes tipo y función. El área de la capa lipídica constituye el 50% del total de la membrana superficial. La bicapa lipídica es una barrera semipermeable entre las células y su microentorno. Agua y pequeñas moléculas (O_2 , CO_2) son capaces de pasar a través de la membrana celular. Otra tarea importante de la membrana celular es la regulación del equilibrio osmótico. Las moléculas incrustadas sirven como receptores, enzimas o proteínas de transporte. Lípidos y moléculas de proteínas pueden difundirse dentro de la membrana, que puede ser visto como difusión de fluidos de una o dos dimensiones. Utilizando algunas membranas unidas, este tipo de difusión se ha estudiado. Se ha demostrado el anclaje de las proteínas del CSK. La tensión de apoyo de una bicapa lipídica se ha calculado ser de aproximadamente $1 \text{ nN}/\mu\text{m}$ por medio de la técnica de aspiración de micropipeta. Medidas similares en células vivas revelan una tensión más suave para corteza celular de $\sim 1 \text{ pN} / \mu\text{m}$. La tensión superficial contribuye a las propiedades del conjunto mecánico de las células vivas y puede controlar las funciones celulares, como la endocitosis y exocitosis. Debido a la unión estrecha de la membrana celular con la corteza de actina y otras moléculas unidas, es difícil aislar el comportamiento puramente elástico de la membrana celular. Se ha demostrado mediante AFM y aspiración por micropipeta que las membranas celulares forman largas cadenas de varias micras que se oponen a una fuerza de tracción independiente de extensión. Mediciones para estudiar las células vivas arrojan son necesarios valores de fuerza de cientos de pN a decenas de nN para aplanar las membranas celulares mediante las puntas de AFM. Otra contribución a propiedades mecánicas de la célula es el glicocáliz compuesto principalmente por cadenas de polisacáridos. Estas estructuras en forma de cepillo desarrollan fuerzas estéricas que se han estudiado con AFM. La contribución de la membrana celular a a la mecánica celular parece compleja y requiere de mayor estudio [2, 5, 6]

Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Originalmente desarrollado como una herramienta para obtener imágenes a nano-escala de superficies no conductoras (inaccesible a la microscopía de efecto túnel), ha mostrado un fuerte impacto en el estudio de materiales biológicos. Ya que es la técnica empleada para esta tesis, los principios de su funcionamiento y las limitaciones para las mediciones con la misma en condiciones fisiológicas se discutirá en detalle. En pocas palabras, las fuerzas experimentadas por una sonda, a menudo con dimensiones nanométricas en la punta, se detectan ya que se analiza lateral o verticalmente por un posicionador piezoeléctrico. La sensibilidad típica es de 10 pN, limitado principalmente por la fricción y fuerzas de inercia de la sonda, así como, la histéresis del piezo. A través de retroalimentación de fuerza, las características topográficas de las células vivas se pueden visualizar de forma no destructiva. Los tiempos de captura son relativamente lentos aproximadamente de 10 min, siempre y cuando se compense la deriva térmica (thermal drift). El etiquetado o la presencia de partículas en las células no es obligatorio, pero la funcionalización química de la punta del AFM se puede utilizar para el reconocimiento molecular más específico.

La resolución espacial está en el rango de 30-50 nm limitada por la convolución de la punta con la superficie suave y la movilidad de las características que se están investigando. Las curvas de fuerza nos representa las interacciones punta-muestra, las fuerza que están presentes y cómo evolucionan durante la medida. Mediante el análisis detallado de deformación vertical de la sonda, donde curvas de fuerza vertical en función de la distancia de la sonda a la muestra se pueden utilizar para cuantificar la viscoelasticidad, la adhesión o la carga de la superficie. Estas mediciones se pueden mapear para mostrar sensibilidad mecánica específica del citoesqueleto o receptores de la superficie de la célula. Otros modos de operación que implique unidades oscilatorias (percusión o la fuerza de modulación) se puede relacionar a propiedades viscoelástico, más rápidamente a través de la amplitud y la detección simultánea de fase al momento

de la captura de la imagen, aunque las aplicaciones de las células vivas son pocas ya que la fuerza con la que se realiza la medida no puede ser controlada. Datos fiables sobre la reología dinámica han sido obtenidas a bajas frecuencias (frecuencias en el rango de 0.1 a 300 Hz) en una única ubicación en las células endoteliales y fibroblastos. Además, los resultados con AFM de viscoelasticidad son comparables, al menos cualitativamente a las mediciones con otras técnicas como la citometría de torsión magnética, y reología convencionales. La espectroscopía de fuerzas de una sola molécula se puede alcanzar con velocidades de rampa de 0.01 a 100 micras / s. La espectroscopia de fuerza del AFM ha demostrado ser invaluable en el sondeo de elasticidad de una sola molécula, transiciones estructurales intramoleculares, y las fuerzas intermoleculares específicas la técnica consiste en ir acercando de poco a poco, paso a paso la punta hasta tocar la muestra, una vez que se hizo contacto con la superficie de la muestra se indenta por un tiempo determinado y se va elevando la punta otra vez, paso a paso y la deflexión del cantiléver se monitorea por los fotodiodos, capturando la curva de fuerza[7].

El microscopio de fuerza atómica (AFM) es una técnica de investigación local, diseñado para medir las fuerzas de interacción de una punta afilada con la superficie de una muestra. El concepto de resolución en AFM es diferente del de microscopios basados en algún tipo de radiación porque las imágenes obtenidas por AFM son tridimensionales. En cuanto a resolución se considera para microscopía la capacidad para distinguir dos puntos separados en una imagen, pero en el caso de AFM esto va a ser la denominada resolución lateral, ya que al ser imágenes tridimensionales las que se obtienen será necesario considerar además una resolución vertical. Existe una distinción importante entre imágenes obtenidas mediante ondas y las obtenidas mediante técnicas de barrido de una sonda. La primera está limitada por problemas de difracción y las últimas principalmente por la geometría de la sonda y de la muestra. Normalmente la anchura de una molécula de ADN se utiliza como medida de la resolución porque se conoce un diámetro de 2.0 nm en la forma B. Algunos de los mejores valores para AFM son de 3 nm para una forma de DNA en propanol. Desafortunadamente, esta definición de resolución puede no ser propia ya que la altura de la muestra y la geometría de la punta pueden afectar con claridad. De hecho, muchos autores han visto que es el radio de curvatura de la punta el que influye de manera significativa en la capacidad de

resolución del AFM. Aquí k es la constante del resorte del cantiléver (0.01 a 0.1 N / m para aplicaciones biológicas), calibrado con una variedad la técnica consiste en simular por elemento finito la sonda y por medio de las medidas nominales se obtiene la constante de resorte del cantiléver Las desviaciones de la palanca se miden por la desviación del haz óptico, pero también puede ser detectada con los métodos de interferometría o piezo-resistivo. Para la desviación del haz óptico, la luz láser se enfoca en la parte posterior de la superficie del cantiléver (opuesto a la punta). La luz láser reflejada se dirige hacia un sensor o cuadrante de fotodiodos (PD). Las salidas de voltaje son proporcionales a las deformaciones verticales o laterales del cantiléver, como resultado de las fuerzas normales o torsional en la punta, respectivamente. Las mediciones se pueden realizar en ambientes acuosos, y se presta como una herramienta útil para el estudio de las células que viven en ambientes casi fisiológicos (sin previa preparación, recubrimiento o tratamiento químico [8,9,10]).

Muchos de los AFM comerciales no permiten la fácil adición de accesorios debido a la reducida superficie disponible para colocar y manipular la muestra. La mayoría de los sistemas comerciales de AFM diseñado para fines biológicos mueven el cantiléver en lugar de la muestra. En dicha configuración, es necesario reorientar o realinear el punto láser continuamente a medida que el cantiléver se mueve. Este nuevo enfoque puede introducir desviaciones sistemáticas de la respuesta ideal del método de la desviación del haz óptico. Se presenten artefactos comunes en las mediciones de AFM son franjas de interferencia debido a la luz del láser reflejada por el cantiléver y la luz reflejada por la muestra. Esta interferencia es detectada por el fotodiodo como una onda oscilatoria. El uso de una fuente de láser con baja coherencia y la minimización de la luz que llega a la muestra pueden reducir este problema. Otra cuestión importante es la posibilidad de calibrar la constante del resorte de la viga. Esto es esencial cuando se buscan medidas exactas de fuerza.

Para investigar de una manera precisa las células deseadas, o incluso regiones específicas dentro de las células, es importante poder visualizar ópticamente la muestra junto con la sonda con una precisión determinada. Por lo tanto, es esencial la posibilidad de visualizar ópticamente las muestras durante las mediciones de AFM *dimention 3100*[9].

Microscopía de Fuerza Atómica Aplicada a la Biología Celular

Nuestro conocimiento de la mecánica de la célula se ha incrementado en las últimas dos décadas debido a la aparición de la nano-técnicas. Estas herramientas nos permiten manipular las biomoléculas y las células con resolución nanométrica y al mismo tiempo las fuerzas en un rango de piconewton a nanonewton. Además, la mayoría de las herramientas surgidas nos permite llevar a cabo medidas en medio líquido. Entre las herramientas más importantes se encuentran las magnéticas y pinzas ópticas, microplacas la microscopía de tracción, la aspiración micropipeta, microarreglos, y microscopía de fuerza atómica (AFM). Este último es uno de los más versátiles, ya que nos permite obtener imágenes topográficas y de mediciones mecánicas en condiciones fisiológicas en escalas de nanómetros y de piconewtons.

El AFM apareció en 1986 y fue originalmente diseñado para obtener imágenes topográficas de las superficies. AFM se aplica de forma rápida para medir las propiedades mecánicas de las diferentes muestras. La posibilidad de trabajar bajo condiciones de un líquido que AFM forma directa aplicada al estudio de la propiedades estructurales de las células. La aplicación de la AFM para investigar la mecánica de las muestras biológicas llegó en 1992. Tao y colaboradores aplicaron el microscopio de fuerza atómica para investigar la microelasticidad de muestras suaves biológicas y Hoh y colaboradores utilizaron el AFM, por primera vez, para medir las propiedades mecánicas de las células vivas. Después de estos trabajos, aparecieron una gran cantidad de estudios y continúan apareciendo, para estudiar la morfología y las propiedades mecánicas de las células que viven en condiciones diferentes, así como nuevos métodos y técnicas diversas para mejorar las mediciones de muestras biológicas, y especialmente en las células vivas. Sin embargo, una serie de limitaciones surgen en el uso práctico, especialmente cuando se usan sistemas comerciales.

Principio de Funcionamiento

El AFM hace uso de un cantiléver flexible con una punta afilada en el extremo de la sonda hacia la superficie muestra (Fig. 1). Los principios básicos por los que se rige el trabajo de un AFM son muy sencillos. Una punta muy fina se barre de manera automática sobre una superficie mediante un mecanismo de retroalimentación que permite que unos scanners piezoeléctricos mantengan la punta interaccionando con la

superficie a fuerza constante (de esta manera se obtiene información de alturas, topográfica), o a altura constante (para obtener información de fuerza) respecto de la superficie de la muestra. Las puntas se fabrican normalmente de silicio o nitruro de silicio, extendidas hacia abajo desde el final del cantiléver. En general, los cabezales de AFM (donde se encuentra el cantiléver, la punta y la muestra, por tanto donde se realiza la medida Figura 5) poseen un sistema óptico de detección en el cual incide el haz láser reflejado por el cantiléver. Una característica clave de la manipulación de células vivas es la visualización simultánea de las muestras mediante microscopía de luz transmitida un esquema ilustrativo de un sistema típico de AFM muestra en la fig. 1

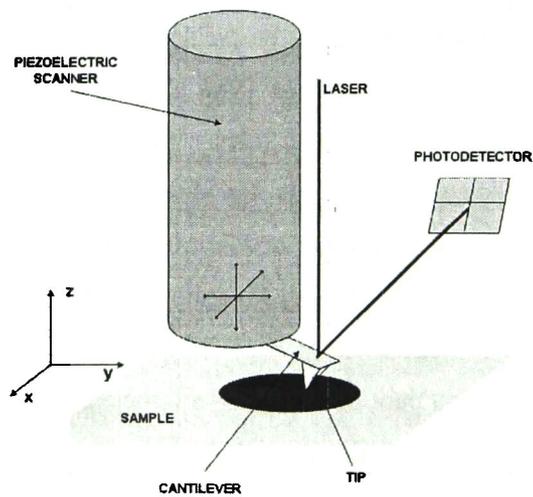


Fig. 2 Esquema Típico de un AFM.

Células: Imágenes de Vida

El estudio de la materia biológica con cualquier AFM requiere la inmovilización del material de interés sobre un soporte sólido que puede ser considerado en la plataforma de la muestra del microscopio. Además, el material que se va a medir debe ser identificable de cualquier otro material presente (contaminantes) y aislado de tal manera que su superficie se puede acceder al contacto directo con la punta del AFM. Para los experimentos de células vivas, esto significa que las células deben ser disociados de los tejidos en los que existen de forma natural, y se adhiere a una superficie plana y sólida. Generalmente, esto implica el cultivo de las células sobre

cubreobjetos de vidrio, mantenido en los nutrientes que contienen los medios de comunicación a 37°C y $\text{pH} \sim 7.3$, en el 5% de CO_2 . En el momento de los cubreobjetos se montan en el espacio de la muestra, que se procede de forma segura a colocar sobre el anillo de succión, y los medios de cultivo se sustituye por fluidos fisiológicos (buffer a $\text{pH} \sim 7.3$, que sólo contiene los nutrientes esenciales). El contenido de los fluidos fisiológicos se da específicamente para cada experimento, pero de importancia común es la concentración de iones diferentes, la determinación de la osmolaridad y el pH (la viabilidad de las células depende en gran medida en ambos). La evaporación del líquido durante un experimento aumenta la osmolaridad y el pH , un efecto significativo de los volúmenes de líquido a menudo utilizado ($<0,5\text{ ml}$). Intercambio o la perfusión de los líquidos durante el un experimento es posible [2].

Como se mencionó anteriormente, el AFM se aplica para obtener información topográfica de las superficies en el aire. Sin embargo, su capacidad de imagen en las condiciones de líquido motivó su aplicación inmediata a especímenes biológicos. El AFM se utiliza sobre todo como una técnica de obtención de imágenes, especialmente en el campo de ciencias de los materiales. Imágenes de AFM se obtienen mediante el escaneo de la superficie de la muestra con la punta del cantiléver a una fuerza fija, aunque también puede utilizarse TC-AFM. El mantenimiento del nivel de fuerza se logra mediante el uso de información electrónica (controladores PID) de forma continua la corrección de la posición vertical del cantiléver (en relación a la muestra) como la señal de entrada varía en función de obstáculos topográficos. La topografía de la muestra es reconstruida a partir de los movimientos verticales utilizados para mantener fija la fuerza de interacción. Los modos de imagen diferentes disponibles dependen de la señal de entrada en el circuito de retroalimentación para controlar la posición vertical. Los dos modos principales utilizados en biología son el contacto y el contacto intermitente (CI o tapping), que se discuten brevemente a continuación. Otras técnicas y mejoras se han introducido, como la modulación magnética, modulación de frecuencia o microscopía de fuerza ultrasónica [2].

Modo de Contacto Intermitente

El modo tapping o de contacto intermitente consiste en hacer oscilar el cantiléver en su frecuencia de resonancia natural. En condiciones líquidas o en aire, la oscilación de la conducción general se aplica por el mismo piezo que controla la posición vertical. Cuando se miden células vivas con cantiléver suave (~ 10 pN / nm) así que, la oscilación produce una desviación en la amplitud del cantilever de unas pocas decenas de nanómetros. La amplitud de la oscilación se ajusta dependiendo de las características de la muestra. La exploración se lleva a cabo mediante el uso de la señal de amplitud de la sonda. En este modo la punta tiene menor perturbación y la reducción de las fuerzas de corte sobre la muestra son menores cuando la punta escanea la muestra. En el caso de las células vivas, el modo de contacto intermitente aprovecha de las propiedades mecánicas de las células vivas. A las frecuencias de resonancia del cantiléver, las células se comportan casi como un fluido viscoso. Por lo tanto, la fuerza ejercida por la célula es proporcional a la velocidad con la que se probaron las principales fuerzas y son aparentemente mayores al momento de la captura de la imagen en este modo. Este modo de trabajo es idóneo para la adquisición de imágenes de células vivas sin dañarlas. Las imágenes de tapping tienen una resolución lateral baja y es difícil para resolver los componentes estructurales celulares, tales como el CSK (línea celular). Sin embargo, el tapping es útil cuando se requiere medir los parámetros morfológicos como el caso del perímetro, área, volumen [2].

Modo de contacto.

Se utiliza normalmente cuando se desea alta resolución lateral. Para obtener alguna imagen, nitidez punta, la rigidez de la muestra y la fuerza aplicada determinar la resolución lateral máxima que se puede lograr. En el modo de contacto, los cantiléver suaves ($k \sim 0.01$ N / m) permiten una buena medida. Se requiere una punta piramidal (con un radio de vértice <50 nm), baja velocidad de barrido (<100 m / s) y que las fuerzas aplicadas sean de unos pocos cientos de pN si se desea obtener resoluciones laterales de decenas de nm en células vivas. Sin embargo, para obtener un buen contraste del CSK subyacente, el aumento de las fuerzas es necesario. La inmovilización de las muestras también es importante cuando las células no son adherentes. La inmovilización se puede lograr mediante el uso de buffers para variar la carga

electrostática de la muestra y la superficie (por ejemplo, solución salina equilibrada de Hanks), o por modificación química del sustrato (por ejemplo, 3 - aminopropil-trietoxisilano). Cuando se trabaja con células adherentes, el uso de los revestimientos de sustrato como la fibronectina o el colágeno y el aumento del tiempo de la cultura puede ayudar a mejorar la adhesión de las células al sustrato. Imágenes de AFM nos traen cuantitativa información tales como la altura, el perímetro o el volumen de las células vivas junto con estructurales detalles de la superficie y el interior de las células, por ejemplo, el citoesqueleto. La posibilidad de cambiando el ambiente líquido, mientras que imágenes de AFM hace una excelente herramienta para realizar un seguimiento respuestas estructurales y dimensiones de las células vivas bajo tratamiento con medicamentos. Figura 2 muestra la vida celular del epitelio alveolar imágenes en modo de contacto en condiciones líquidas. En las Fig. 2: se observa la altura 3D (izquierda) y la deflexión (derecha) de una célula alveolar primaria de la rata en condiciones de líquidas. Espesor de la celda se ~ 4 micras. Deflexión gris está situada a 200 nm, respectivamente. Tamaño de escaneo fue de 100 micras. Las imágenes fueron obtenidas utilizando un sistema de Bioscope opere en modo de contacto con la punta de voladizo piramidal ($k = 10 \text{ mN / m}$) (Veeco, Santa Barbara, EE.UU.)

Como se mencionó anteriormente, las imágenes de AFM se obtienen mediante el escaneo de la superficie de la muestra con en su punta continua corrección de la posición vertical (altura).

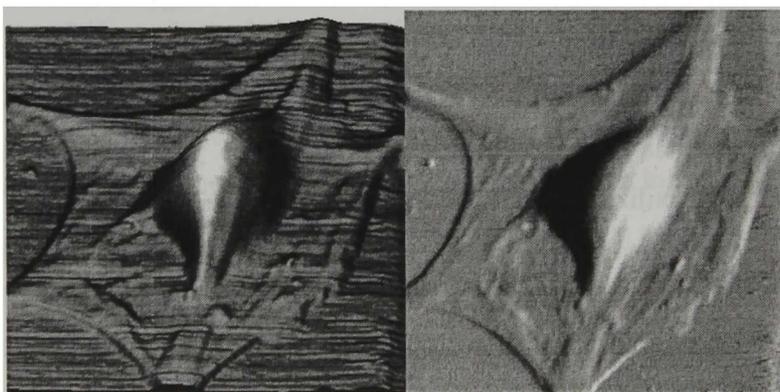


Figura 3: Altura 3D (izquierda) y la deflexión (derecha) de una alveolar primaria de la rata en condiciones de líquido. Espesor de la celda se ~ 4 micras. Deflexión gris está situada a 200 nm, respectivamente. Tamaño de barrido fue de 100 micras. Las imágenes

fueron obtenidas utilizando un sistema de Bioscope opere en modo de contacto con la punta de cantiléver piramidal ($k = 10 \text{ mN/m}$) (Veeco, SantaBarbara, EE.UU) [2]

Como se mencionó anteriormente, las imágenes de AFM se obtienen mediante el barrido de la superficie de la muestra con la punta del cantiléver que de manera continua realizaba la corrección de la posición vertical (altura) como la desviación (en modo de contacto) o la amplitud (en IC-modo) que varían como consecuencia de la topografía de la muestra. Si el circuito de retroalimentación fue ideal, la señal de error podría ser constante durante la exploración. Sin embargo, la respuesta de los circuitos PID real dependerá de la buena afinación de la parte proporcional e integral de los valores y de las propiedades de la viga y la muestra. Por lo tanto, la señal de error no son constantes, pero ofrecen imágenes que pueden reflejar las propiedades de la muestra.

Una de las principales limitaciones del AFM para la obtención de imágenes es su velocidad de adquisición baja, especialmente en el caso de muestras grandes (decenas de micras), como las células vivas. Para las imágenes de alta resolución de las células vivas pueden durar varios minutos, y por lo tanto restringe los cambios celulares. Sin embargo, las imágenes de baja resolución todavía proporcionan información de las dimensiones cuantitativas con una resolución temporal de uno o dos minutos. Los artefactos derivados debido a las deformaciones térmicas de ambos sistemas de AFM y las muestras se observan comúnmente en imágenes del AFM de. Estos efectos pueden ser minimizados por la estabilización térmica de todo el sistema, aunque suele ser difícil en los organismos vivos. Elementos piezoeléctricos también introducen los efectos de fluencia y la histéresis cuando las imágenes y las muestras son de gran tamaño.

La utilización de sensores de posición (por ejemplo, medidores de tensión o condensadores) y circuitos de retroalimentación espectacular minimiza estos efectos, aunque también se reduce el tiempo de respuesta del sistema. Por esta razón, muchos de los equipamientos comercial última generación ya introducen nanoposicionadores. En el caso especial de las células vivas, es importante la visualización simultánea óptica de las muestras con el común de los sistemas ópticos, como el contraste de fase (APS), contraste de interferencia diferencial (DIC), o epi-fluorescencia. Los sistemas comerciales de AFM son comúnmente difíciles de combinar con estas técnicas, lo que

reduce su aplicación a la biología celular.

Mediciones Mecánicas

Aparte de los efectos de imagen, el AFM se utiliza ampliamente como un sensor de fuerza, la detección de las fuerzas que van desde decenas de piconewtons a cientos de nanonewtons, que es el rango involucrados en la mecánica de la célula. Medidas mecánicas uso que se obtengan mediante la aplicación de las oscilaciones triangular en la dirección vertical y la medición de la deflexión resultante en los contactos de la punta de la muestra. La desviación se traduce en la fuerza con la constante del resorte de la viga que va desde unos pocos mN / m para cientos de N / m. Las curvas obtenidas se conocen comúnmente como fuerza-distancia ($F - z$) las curvas, o simplemente curvas de fuerza.

Las curvas de fuerza se utilizan para medir interacciones punta muestra y determinar la magnitud de contacto. En la Fig 4 se muestra un ejemplo de curva de fuerza donde se representa la deflexión del cantilever en función de la posición de la punta respecto de la superficie de la muestra. Se puede observar como el gráfico obtenido está descrito por una serie de números que identifican distintos tramos en la curva. El tramo 1 en el que la deflexión permanece constante, representa el descenso de la punta (ascenso del piezo en Z) cuando no existe ningún tipo de interacción punta-muestra, es decir, no se ha establecido todavía ningún contacto. El tramo 2 indica que existe una flexión brusca del cantilever hacia abajo respecto a su posición inicial, esto es debido a que la punta se sitúa en una posición respecto de la muestra que puede sentir importante fuerzas de atracción (capilaridad, tensión superficial). En el momento que la punta siente dichas fuerzas de atracción se puede decir que ha entrado en contacto con la superficie de la muestra. Posteriormente, a medida que la punta sigue bajando a lo largo del tramo 2 llega un momento en el que está lo suficientemente cerca como para que las fuerzas de repulsión compensen a las de atracción y el cantilever empiece a flexionar hacia arriba, en ese momento comienza el tramo 3 hasta que el piezoeléctrico en Z comienza a bajar es decir la punta a subir respecto de la superficie de la muestra que es donde comienza el tramo 4. Este tramo se prolonga hasta valores de desplazamiento de la punta mayores que el correspondiente al comienzo del tramo 3. La razón de que esto ocurra es que el hecho de acercarse más la punta en la muestra al recorrer el tramo 4 implica mayor

penetración de la misma en la capa fluida adsorbida sobre la superficie de la muestra lo que debe implicar mayor fuerza de adhesión como así se observa en una mayor deflexión hacia abajo por parte del cantilever. Esto ocurre hasta que bruscamente el cantilever recupera su posición inicial al romperse las fuerzas de adhesión este salto brusco corresponde al tramo 6. Por último, el tramo 7 corresponde a una constancia en la deflexión en función de la separación punta-muestra pues de nuevo no hay contacto entre ellas. En la figura 11 se muestra un esquema del ensayo realizado con un AFM para obtener una curva de fuerza.

El análisis de la carga y se acercan o retracción de la descarga o curvas proporciona información sobre las propiedades elásticas y la adhesión de la muestra, respectivamente, aunque diferente información se puede extraer de them4. Los métodos más utilizados AFM para estudiar la viscoelasticidad y la adhesión de las células vivas se explican a continuación [11].

Medidas viscoelásticas

La parte acerca de una curva fuerza-distancia sigue un perfil lineal (Fig. 4). La no linealidad no representa el comportamiento no lineal de la muestra, sino que está determinada principalmente por la geometría de la punta. Las sondas comerciales de forma piramidal o cónica (Olympus, Tokio, Japón; Veeco, Santa Barbara, EE.UU.; MikroMasch, Tallinn, Estonia). Los cantiléver modificados con puntas esféricas unidos en sus extremos también se pueden obtener (Novascan, Ames, EE.UU.). Todas estas geometrías lineales llevan las relaciones a una fuerza-indentación ($F - \delta$), como resultado de aumentar la superficie de contacto entre la punta y la muestra. El $F(\delta)$ relaciones obtenidas.

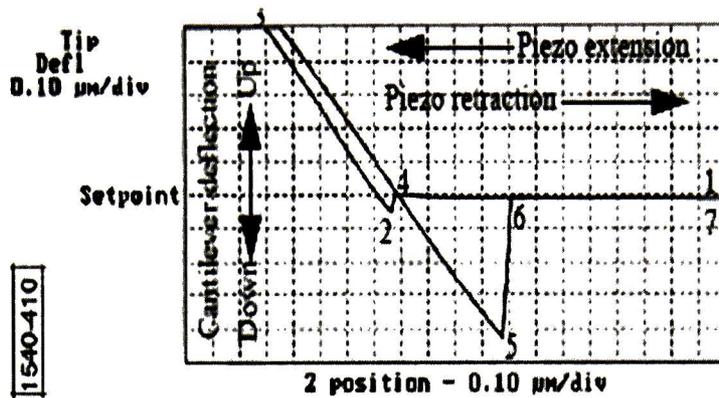


Fig 4 Curva de fuerza obtenida con un AFM

Con la punta de geometrías diferentes se describe mediante un modelo de contacto elástico de una indentación de un medio elástico. Heinrich Hertz fue el que describe y resuelve el problema de dos cuerpos elásticos en contacto (Hertz, 1881), tenga en cuenta que el modelo único que conducen a una fuerza de respuesta lineal es el de la perforación cilíndrica, ya que su área se mantiene constante durante la indentación. El enfoque más común para obtener el módulo de elasticidad o módulo de Young (E) de las células vivas lo describe la curva de descarga. En primer lugar, las curvas de F_z se transforman en $F-\delta$ las curvas mediante el cálculo de la huella de la punta en la muestra, para determinar el momento en que la punta en contacto con la muestra (punto de contacto). En segundo lugar, el modelo elástico de contacto adecuado a la geometría de la punta se coloca en la parte de carga de la curva. La elección de la parte impide acercarse a posibles artefactos relacionados con la adherencia observado en la región de retracción. Debido a la no linealidad de la respuesta de la fuerza, dos temas son cruciales para una estimación fiable de E : la determinación del punto de contacto y que sea adecuada del modelo de contacto con la geometría de la punta real. El punto de contacto se define por la fuerza (o desviación) offset y el punto vertical en la que el cantiléver comienza a desviar. En el caso de muestras blandas, el punto de contacto es difícil de determinar a simple vista debido a la desviación suave del cantiléver en hendiduras de la célula. Por lo tanto, una estimación objetiva de estos parámetros deben ser establecidos. Incluso si el módulo de Young es una estimación fiable de la rigidez de la

célula. Las células no son los cuerpos elásticos, pero si viscoelástico. La principal limitación de estos enfoques es que los parámetros obtenidos mecánica están limitados por el ancho de la ventana de tiempo utilizado durante las mediciones. Un método más robusto para investigar viscoelasticidad celular es la aplicación de las oscilaciones de baja amplitud en un amplio rango de frecuencias para estimar el módulo de corte complejo G^* . El módulo de corte complejo se divide en un componente real o en fase, que corresponde a la elasticidad o la energía almacenada, y un imaginario o fuera de la fase de componente, que corresponde a la viscosidad o pérdida de energía. La parte real se conoce como el módulo elástico (G'), Mientras que la parte imaginaria se llama el módulo de pérdida (G''). La técnica de oscilación ha sido aplicada con éxito a una amplia variedad de células vivas, incluyendo las células epiteliales del pulmón, las células de músculo liso bronquial, los macrófagos y neutrófilos en condiciones basales y bajo tratamiento mecánicas o farmacológicas [8,9]. La técnica oscilatoria a utilizarse en mediciones AFM en las células vivas, consiste en aplicar oscilaciones de baja amplitud (50-100 nm) en una hendidura de operación (δ_0). Bajo estas condiciones, el modelo de contacto elástico descrito por $F(\delta)$ se puede aproximar tomando los dos primeros términos de su desarrollo de Taylor:

$$F \simeq F(\delta_0) + \frac{\partial F}{\partial \delta}(\delta - \delta_0) + \dots$$

En el caso de un piso punta terminó cilíndrica de radio a , la expansión anterior lleva a

$$F = F_0 + \frac{2E}{(1 - \nu^2)} a(\delta - \delta_0).$$

Al sondear las muestras biológicas en condiciones de líquido la fuerza de arrastre hidrodinámico ejercida sobre el cantiléver se debe corregir a frecuencias por encima de ~ 0.3 Hz [10]. La fuerza de arrastre depende de la geometría de la viga, por el arrastre factor $b(0)$, y en la velocidad del extremo en voladizo libre $v = d\delta/dt$. Se puede expresar por $F_D = b(0)v$. Como se describe en la obra de Alcaraz y compañeros de trabajo, el factor de fricción aumenta a medida que la punta se acerca a la superficie. El factor $b(0)$

se obtiene normalmente mediante la aplicación de las oscilaciones de baja amplitud a diferentes alturas sobre la superficie de la muestra y la extrapolación a cero de separación [8,10]. La contribución de arrastre hidrodinámico en el dominio de la frecuencia tiene la forma $F_d(\omega) / \delta(\omega) = i \omega b(0)$ (donde $i = \sqrt{-1}$), y puede ser incluido en la ecuación 4 para corregir la fuerza de arrastre, la obtención debido a la suavidad de las células vivas, las mediciones mecánicas tienen que llevarse a cabo mediante cantiléver suave (decenas de mN / m) para aplicar fuerzas de baja por lo general por debajo de 1 nN. Otro factor importante a tener en cuenta es el espesor de las células. Que viven las células epiteliales recubiertas en cubreobjetos de vidrio con un espesor de 5.10 micras. Por lo tanto, la indentación también puede ser controlada con el fin de no percibir el sustrato subyacente duro [11]. La indentación puede llegar máximo en la medición de las muestras suaves sin sentir el sustrato duro puede ser estimado en 10-20% de espesor de la muestra.

El modelo más simple proviene de mecánica de medios continuos y se basa en la obra de Heinrich Hertz, el modelo describe una indentación hertziana elástica de una muestra infinitamente extensa por un penetrador de forma simple. Dos formas de uso frecuente en AFM son penetradores cónicos o parabólicas:

$$F_{\text{cone}} = \frac{2}{\pi} \cdot \frac{E}{(1 - \nu^2)} \cdot \delta^2 \cdot \tan(\alpha)$$

$$F_{\text{paraboloid}} = \frac{4}{3} \cdot \frac{E}{(1 - \nu^2)} \cdot \delta^{3/2} \cdot \sqrt{R}$$

Donde F_{conica} es la fuerza necesaria para indentar una muestra elástica con un indentador cónico, similar con lo que sería con un indentador parabólico.

La principal limitación de los sistemas comerciales de AFM en la medición de la adhesión de múltiples es el recorrido retroceso del piezovertical. Algunas mediciones de las células necesitan la adquisición de las curvas de fuerza con una amplitud de decenas de micras. El rango típico vertical para los sistemas comerciales es de 7 μm , siendo 14 μm en algunos aparatos diseñados para aplicaciones biológicas. Al llevar a cabo tanto en

moléculas individuales y múltiples ensayos de adhesión, pero también es importante la medición real del desplazamiento vertical y lateral, que sólo es posible con sensores de posición, tales como medidores de tensión. Incluso la reciente introducción de esta tecnología en los sistemas comerciales, la mayoría de ellos utilizan precalibrado de piezoposicionadores que presentan importantes efectos de histéresis y tienen una baja reproducibilidad. Receptores de adhesión el uso que se distribuirán a lo largo de la superficie celular, pero especialmente localizadas en ciertas regiones, tales como bordes de las celdas o las uniones célula-célula. Por lo tanto, la colocación exacta de la punta del cantiléver en estas áreas parece necesario, pero difícil de obtener con los sistemas comerciales. Una vez más, la dificultad de combinar los sistemas comerciales con las técnicas convencionales de microscopía óptica limita su aplicación a los estudios de la Adhesión celular.

Mecánica Celular

La mecánica es una rama de la física que tienen que ver con las fuerzas. Como tal los estudios de mecánica debido a las tensiones aplicadas las cepas, para obtener las propiedades elásticas y viscosas de los materiales. Las propiedades adhesivas de los materiales juegan un papel importante en su comportamiento mecánico. Por esa razón, la mayoría de los libros de texto que tienen que ver con la mecánica continua y el contacto tiene una sección para explicar la adhesión. En el caso concreto de la biología celular, propiedades adhesivas de las células vivas determinar su respuesta viscoelástica y viceversa. Por otra parte, una gran división de las células vivas cuando se trata de la mecánica es su disponibilidad para adherirse a las superficies, por lo tanto, sobre las células adherentes y las células no adherentes. Parece por lo tanto difíciles de aislar a la adhesión de viscoelasticidad, en las mediciones de la célula. Así, incluso su interconexión, son pocos los estudios que implican la adhesión y las medidas viscoelásticas de las células vivas. Debido al gran cuerpo de evidencia de que las fuerzas se aplican, de transmisión, y equilibrado por las células vivas y sus conexiones con otras células y el ECM, parece probable que la mecánica es un campo importante para el estudio de la biología celular. Propiedades mecánicas de las células vivas se están

convirtiéndose en tan importantes como los enfoques clásicos de bioquímica para entender mejor cómo funcionan las células. En esta sección, las principales conclusiones de las propiedades mecánicas obtenidas en las células vivas se abordan, así como los principales modelos para explicar el comportamiento de las células mecánicas [12].

Eventos Mecánicos en la Función Fisiológica

Es ampliamente aceptado que el carácter viscoelástico de células y su respuesta al entorno mecánico son determinantes cruciales de la forma, función y vitalidad. Las fuerzas dinámicas de fluido, la adhesión, y la influencia de la tensión y la frecuencia de control de la función fisiológica y la patogénesis de las enfermedades. Hay numerosos ejemplos en los sistemas inmunológico y circulatorio. Eritrocitos (glóbulos rojos), a menudo pasan a través de los capilares que son a menudo la mitad de su diámetro.

Las variaciones en la viscoelasticidad arterial se ven en condiciones tales como enfermedades cardiovasculares, enfermedad vascular periférica, anemia de células falciformes, diabetes, derrames cerebrales y otras condiciones. Así, su respuesta viscoelástica bajo cizallamiento de fluidos y deformación han sido ampliamente estudiados. Las plaquetas, aunque no tienen un núcleo, son capaces de modular rápidamente su forma y rigidez mecánica, que es de fundamental importancia para un trombo (coágulo) de formación y endurecimiento de las arterias (aterosclerosis). Leucocitos (glóbulos blancos), especialmente los neutrófilos, son un papel central en la defensa contra la infección y al hacerlo experimentar una amplia variedad de las fuerzas dinámicas [1]. Que específicamente deben reconocer los patógenos químicos, se adhieren a las células endoteliales, que las paredes del vaso de línea, y penetrar a través de la capa epitelial en el tejido circundante. Mecánica del endotelio se convierten en importantes en la regulación de la adhesión y migración de los leucocitos. Se sabe que se alinean en la dirección del flujo. El rendimiento muscular es otro proceso fisiológico en el que obvia viscoelasticidad celular juega un papel clave.

El músculo esquelético y cardíaco debe de ser rápido y eficiente de generar grandes fuerzas contráctiles. Por lo tanto, su citoesqueleto y las proteínas motoras son muy ordenados y son capaces de soportar grandes esfuerzos y deformaciones. Las

células musculares lisas son una clase separada de las células musculares en las paredes de las arterias (el músculo liso vascular), intestino, vías respiratorias, y otros órganos. El músculo liso también se debe generar la contracción, pero al mismo tiempo mantener la plasticidad y flexibilidad. Por lo tanto, su estructura es menos ordenado y más sensible a fuerzas externas. Cortante inducida por el estrés de adaptación y remodelación, junto con la adhesión celular, es importante para la acción cooperativa de estos tejidos. El mecanismo de la hiperactividad del músculo liso vascular se investiga como efector clave de la hipertensión pulmonar [12]. Del mismo modo, las células de músculo liso bronquial son en gran parte responsable de la dilatación o constricción de las vías respiratorias en los asmáticos [13]. Sus propiedades viscoelásticas en reposo y durante la estimulación, al no ser bien entendido, es un foco de intenso estudio [14].

Caracterización de la mecánica de la microescala en las células, no sólo las propiedades de células enteras o en la totalidad del tejido, es fundamental para una comprensión completa de muchos procesos celulares. La motilidad y la citocinesis (división celular) implican muchos cambios en la forma sutil que el resultado de un control dinámico de la membrana y la tensión del citoesqueleto. Células como las neuronas experimentan un crecimiento complejo y morfogénesis en respuesta a la tensión externa [15]. Comunicación entre las células, especialmente las neuronas, requiere un contacto estrecho y flexible en las ubicaciones especificadas en la superficie celular. Las proteínas y enzimas que transduce señales eléctricas o químicas deben ser transportadas y dispuestos en los andamios detallada en el sitio de las sinapsis o uniones. Las características viscoelásticas de los sitios de contacto postsinápticos (espinas dendríticas) en las neuronas del hipocampo del sistema nervioso central es el segundo foco de este trabajo. La plasticidad y la estabilización a largo plazo de estas estructuras se piensa que es una característica clave del aprendizaje y la memoria [16]. Remodelación morfológica, así como desplazamiento interno de la señalización de las vesículas y las proteínas no pueden ser descritos cuantitativamente sin un conocimiento detallado de la reología celular microescala. Para alcanzar el nivel deseado de la comprensión, los estudios de la mecánica celular y la función debe ser paralela a la investigación detallada de las propiedades específicas de física y las interacciones moleculares. Proteínas soportar la fuerza mecánica y se someten a doblar complejo en

respuesta a una variedad de estímulos [15]. Las proteínas musculares individuales se ha demostrado que se alargan de forma reversible a muchas veces sus longitudes naturales, que es fundamental para mantener el citoesqueleto de las células del músculo intacto durante el estiramiento y la contracción extensa [2]. Las moléculas flexibles que se unen, o la pareja de membrana filamentos de la proteína son actores clave en la determinación de la reología celular, la integridad del citoesqueleto, y la disposición de la señalización de las proteínas en el músculo liso y no las células del músculo [16]. Enlaces inter o intra-biomolecular están compuestos de hidrógeno muchos débiles, Van der Waals, interacciones iónicas y en complejas medidas de tres dimensiones.

Desconsolidación de los ligandos de los receptores, los antígenos de los anticuerpos, o reordenamientos estructurales en las moléculas individuales pueden seguir un camino de reacción de multi-estado que depende de la fuerza aplicada (si existe) y el momento para que la reacción ocurra [2]. Espectroscopia de fuerza en moléculas aisladas de un solo, aunque no se puede mantener todas las complejas funciones de las células vivas intactas, puede dar ideas importantes sobre la relación entre la estructura, la unión, y la función en un nivel fundamental [2].

Microreología Celular

Reología o viscoelasticidad se ocupa de las propiedades elásticas y viscosas de los materiales. Debido al tamaño micrométrico de las sondas comunes que se utilizan para estudiar la mecánica celular, el uso de la microreología término es ampliamente aceptado.

Blandura

Varias medidas viscoelásticas han llevado a cabo en diferentes tipos celulares y el uso de diversas técnicas de sondeo y todos ellos coinciden en particular: las células tienen valores de rigidez muy bajos. De hecho, podríamos hablar de la suavidad de las células, para enfatizar esta importante característica. El rango de rigideces en las células vivas pueden variar más de cuatro órdenes de magnitud, decenas de Pa a cientos de kPa,

la búsqueda de tal variación incluso dentro de una misma célula [17]. Este amplio rango de valores puede ser debido a los diferentes tipos de células, la heterogeneidad estructural de las propias células, y la instrumentación de sondeo. Células adherentes forman parte de los tejidos que tienen diferentes funciones y propiedades un tanto diferentes. Parece lógico que las células procedentes de diferentes tejidos pueden comportarse de forma mecánica diferentes. Por ejemplo, las células esqueléticas se ha demostrado que es más rígida que las células endoteliales [2]. Dado que las células son estructuras muy heterogéneas, su rigidez depende fuertemente de la región probaron [17]. Por otra parte, la velocidad a la que las células son probados también pueden influir en la que son obtenidas las propiedades mecánicas. Además, la técnica utilizada para investigar las propiedades mecánicas también puede inducir una modificación de la rigidez local. Por ejemplo, la fijación de partículas magnéticas en la superficie celular a través de receptores de la integrina aplicar en las mediciones de pinzas magnéticas u ópticas se ha demostrado que induce una reorganización CSK local. Esta reorganización se puede reflejar en las mediciones mecánicas. La diferentes supuestos adoptados en cada enfoque, tales como el valor del coeficiente de Poisson (se asume que son 0.5), la hipótesis de contacto sin fricción en las mediciones de AFM, el espesor de las células supone, o la descripción de las células como materiales continuos también pueden ser factores que determinan la variabilidad de las propiedades de las células viscoelástico[2].

Viscoelasticidad: términos, definiciones y modelos estándar

Un material viscoelástico es el que puede almacenar y disipar la energía mecánica en respuesta a la deformación por una tensión mecánica. La capacidad de almacenamiento se conoce como la elasticidad y las pérdidas de disipación se deben a los efectos viscosos. Propiedades mecánicas pueden ser descritas en términos de la respuesta al estrés de una tensión aplicada, o viceversa. Materiales puramente elásticos responder instantáneamente, mientras que los efectos viscosos actuar para retrasar la respuesta a una tensión variable en el tiempo o esfuerzo. Si una cepa se aplica a un cuerpo viscoelástico de forma instantánea y, posteriormente, se mantiene constante, las

tensiones inducidas en el cuerpo se deteriorarán con el tiempo. Este es el fenómeno conocido como relajación de la tensión. Del mismo modo, si una tensión es aplicada a un cuerpo viscoelástico como una función escalonada en el tiempo, la deformación de la tensión aumentará con el tiempo, conocido como el fenómeno de la fluencia. Si el cuerpo se carga de forma cíclica, una histéresis se desarrollará entre la carga y descarga de las curvas de tensión-deformación frente.

La medida del tiempo depende de las relaciones tensión-deformación del material que se conoce como reología. Para un sistema lineal tridimensional, el módulo de relajación de la tensión, $G(t)$, se relaciona con la dependencia temporal de la tensión, $Df(t)$, en respuesta a una cepa Dx paso inicial en el momento α , como: $Df(t) = G(t - \alpha) Dx$. Con las funciones de estrés y la tensión al revés, el cumplimiento de la fluencia, $J(t)$, describe el comportamiento temporal de la tensión en respuesta a una fuerza de paso en el momento α , como: $Dx(t) = G(t - \alpha) Df$.

Estructuras mecánicas en las células

Es ampliamente aceptado que la integridad mecánica de la célula es través de la red de proteínas filamentosas, llamado el citoesqueleto de eucariotas (núcleo que contiene) las células. Hay tres componentes principales del citoesqueleto: filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios. Una descripción detallada de la estructura y las funciones básicas de estos filamentos se pueden encontrar en los libros de biología celular de texto [18].

Espectroscopia de Fuerza Atomica (AFS)

El AFM combina una elevada sensibilidad para poder aplicar y medir fuerzas y una elevada precisión en la posición relativa entre punta-muestra en las tres dimensiones, además de la posibilidad de operar en condiciones fisiológicas. Un tipo de estudio que hace uso de las cualidades básicas de un AFM, es la AFS, mediante la cual a sido posible realizar estudios de las propiedades mecánicas y elásticas de las células enteras [22].

Conceptos básicos de AFS

El estudio de curvas de fuerza es una herramienta muy potente para analizar las propiedades elásticas y plásticas de los materiales. La AFS es un técnica que nos aporta información cuantitativa, para poder transformar los datos de una curva de fuerza directamente obtenida del microscopio se necesita un elemento de referencia a partir del cual sea posible de forma fácil obtener el valor de la fuerza que ejercemos sobre el cual esta montada nuestra punta. Teniendo en cuenta que el cantiléver tiene un comportamiento elástico podemos considerar que el comportamiento es como un muelle al cual se le aplica la ley de Hooke.

Las técnicas de sonda próxima han extendido nuestra capacidad de sentir hasta un micro-mundo o nano-mundo y en este camino han aportado una nueva manera de entenderlo a partir de técnicas microscópicas. Más allá de esto, tocar las cosas es un paso esencial para la manipulación de las cosas, y la habilidad de sentir, manipular moléculas únicas es un nuevo paso que marca una gran diferencia en la manera que tenemos de entender e interaccionar con el mundo que nos rodea reza J.K. Heinrich Horber.

El avance de la tecnología asociada a la micro fabricación de las puntas a sido uno de los paso claves en el desarrollo de los SPM en general. Otro elemento importante en el desarrollo de un AFM es el mecanismo que nos permite mover la punta muy cerca de la muestra y escanearla con mucha precisión para poder tener una buena resolución. En 1989 fue un año decisivo, ya que las muestras biológicas son blandas y fácilmente deformables, de modo que se ha de aplicar el mínimo de fuerza posible sobre la muestra para que la forma topográfica obtenida no se vea afectada por la adquisición de la imagen. Ya en los años 90 ya se pudieron hacer los primeros análisis de espectroscopias de fuerza atómica de células enteras en los que se evaluó la elasticidad. En el caso de la microscopia de fuerza lateral o de fuerza de fricción fue precisamente la aparición del AFM lo que permitió avanzar claramente en la comprensión de los procesos de fricción o tribología a escala atómica. Esta técnica ha sido muy utilizada en el estudio de materiales estructurales de elevado interés tecnológico pero también se a ha utilizado para el estudio de materiales blandos.

El desarrollo de técnicas típicamente utilizadas en el estudio de ciencias de materiales / superficies esta abriendo sus puertas al estudio de las propiedades

mecánicas y estructurales de materia procedente de sistemas biológicos. Cuando la punta entra en contacto con la superficie entonces el cantiléver se flexiona cuando una cierta fuerza vertical se aplica sobre la muestra. Esta deflexión se transforma en una señal eléctrica gracias a que el láser que se refleja en la parte trasera del cantiléver incide sobre un fotodetector, esta señal se procesa como un punto topográfico en el espacio que viene dado por la posición de la punta en los ejes “X”, “Y” y “Z”. De esta forma mientras la punta va escaneando la superficie de la muestra se va creando la imagen topográfica del área escaneada. A medida que la distancia entre la punta y la muestra se reduce se establecen ciertas interacciones como las fuerzas de van der Waals, electrostáticas, etc., a medida que la punta se sigue aproximando a la muestra la repulsión punta-muestra se hace dominante y la punta se flexiona hacia arriba: momento en el cual podemos decir que se establece un contacto real, en un sentido macroscópico. Este fenómeno se describe mejor en la Fig. 5 la cual muestra el contacto punta-célula en una curva de fuerza sobre una célula. En el caso de muestras biológicas, en contra parte el modo *tapping* se utilizan cantilévares con una constante más baja reduciendo así el posible daño que se pueda realizar. Este modo ha abierto una gran gama de posibilidades a la baja interacción con la muestra. Precisamente, la ventaja de este tipo de interacción con el material biológico está en la contraposición a la compleja dinámica de interacción punta muestra que, en algunos casos puede llegar a complicar la interacción.

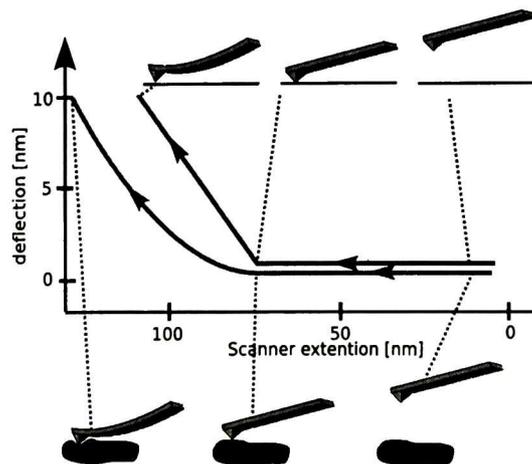


Fig. 5 Esquema que representa el contacto punta- célula en una curva de fuerza.

Por lo general, las curvas de fuerza se analizan en un determinado rango de las fuerzas de carga. Por lo tanto, los valores de deflexión deben convertirse primero en la carga de los valores de la fuerza.

Viscoelasticidad Celular

Otra propiedad importante de las células vivas es el hecho de que las células se comportan no sólo elásticamente, sino también de una manera viscosa, es decir, las células son viscoelásticas. La viscoelasticidad de las células vivas se puede medir por distintos procedimientos. Uno de los más comunes es la aplicación de una medida de fuerza o de la deformación y la medición de la respuesta correspondiente de determinar las propiedades viscoelásticas de los materiales es la aplicación de control de baja oscilaciones de amplitud. Este método dio lugar a curvas de tensión-deformación con histéresis que refleja el comportamiento viscoelástico de células vivas. Ambas respuestas elástica y viscosa mostró también a depender de la velocidad a la que se aplicó la deformación, las células se comportaron más rígido cuando sondeó a tasas más altas. En particular, tanto G' y G'' , seguido de un poder débil de baja en las frecuencias bajas, con G'' se aproxima a un líquido puramente newtoniano a frecuencias superiores a 100 Hz [19]. La relación de tensión-deformación de las células vivas se ha demostrado que es bastante lineal para las deformaciones de baja o de las fuerzas aplicadas. El uso de este método sencillo, se ha observado que las células responden inicialmente como un cuerpo elástico y luego o bien la fuerza y la deformación de relajarse en el tiempo. Módulos elástico y viscoso, los factores de amortiguamiento y los tiempos de relajación de las células vivas se han calculado utilizando esta técnica (AFM). Un método más robusto para generalmente no lineal, lo que refleja una mayor rigidez aparente [5]. Este efecto puede ser debido al sustrato subyacente duro en el que crecen las células adherentes y unas inherentes características celulares, denominado como el endurecimiento por deformación. Se ha observado el efecto de la rigidez aparente mayor de las células vivas investigado en hendiduras de alta con AFM como una evidencia de endurecimiento por deformación [20]. Sin embargo, recientes mediciones AFM teniendo en cuenta espesor de las células han demostrado un comportamiento lineal, aun cuando las células fueron indentadas > 50% de su espesor [21]. Ahora es ampliamente aceptado que las células

vivas se comportan más rígido como su resistencia a la tensión interna aumenta. Esta rigidez celular inducida por la tensión previa se ha observado en una variedad de tipos de células en diferentes tratamientos que se modifica el pretensado interno por ambos estímulos bioquímicos o mecánicos [21]. Mediante la regulación de CSK pretensado mediante el tratamiento con agonistas de células contráctiles y relajantes. Las medidas viscoelásticas realizadas en las células vivas cultivadas en soportes deformables mostraron una mayor rigidez cuando se estira. Estos resultados confirman la hipótesis de una tensión CSK preexistentes (principalmente concentrados en el actina CSK), los cuales juegan un papel importante en la estabilidad de las células mecánica y rigidez.

Las medidas mecánicas de las células vivas se obtienen generalmente a través de la llamada distancia curvas de esfuerzo-: una forma de onda triangular se aplica a la dirección vertical, y la deflexión se mide como la punta de los guiones de la muestra. Estudios de adherencia se llevan a cabo utilizando esta técnica, pero el análisis de la parte de retracción de la curva. La medición de la torsión del cantiléver, como la punta escanea la superficie horizontal de la muestra, nos permite el estudio de la propiedades de fricción. El uso de cantilever suave (primavera constante de $\sim 10 \text{ mN / m}$) nos permite aplicar y medir fuerzas a nivel pN, que es el orden de magnitud de las fuerzas que intervienen en los procesos celulares. La elasticidad de los materiales se describe comúnmente a través de su módulo de Young (E), y la viscoelasticidad utilizando el módulo de corte complejo ($G^* (\omega)$), siendo ω la frecuencia de excitación). E obtenidos a partir de la distancia de alta amplitud de fuerza curvas ajustadas con un elástico de cierto contacto modelo [5]. Aparte de las aplicaciones de nanoindentación, el sistema nos permite medir la adherencia propiedades de las células vivas. Propiedades de adherencia son muy importantes para la estabilidad estructural y la mecánica de las células vivas. Adhesión refleja la interacción mecánica de las células con su entorno. Las células vivas expresan diferentes proteínas de membrana (como selectinas o integrinas) para regular su adherencia a las células vecinas o de la matriz extracelular, en la Fig 6 se puede observas una curva de fuerza en obtenidas por este sistemas en un sistemas celular de alveolos pulmonares.

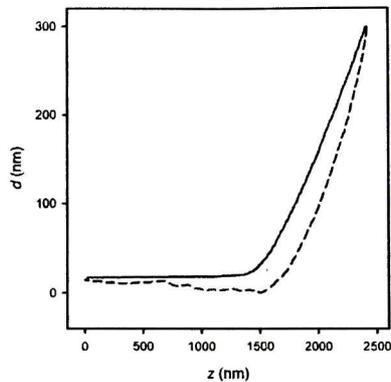


Fig. 6: Desviación distancia (dz) curva obtenida con una punta esférica en voladizo ($R=2500\text{ nm}$, $k=0,01\text{ N/m}$) en una célula del epitelio alveolar en la cultura (de pico a pico de amplitud 2.5 m/s a 0.3 Hz). Líneas continuas y discontinuas es sinónimo de acercamiento y retroceso curvas, respectivamente.

Las imágenes son obtenidas mediante el escaneo de la superficie de la muestra con la punta del cantiléver. La agudeza de la punta, además de otras características tales como la rigidez de la muestra, determina resolución de la imagen. Los cantiléver blandos de Nitruro de silicio AFM con puntas piramidales son comúnmente utilizados para la obtención de imágenes de alta resolución de las células vivas. Puntas piramidales están embotadas o redondeadas en el ápice.

Al probar la mecánica celular, una limitación importante aparece con consejos cantiléver disponible en el mercado AFM. El uso común de la geometría piramidal o cónica. Tal geometría de la punta da lugar a una geometría de contacto no está bien definido, y una fuerza de respuesta no lineal debido a la creciente área de contacto entre la punta y muestra. El uso de puntas de composición plana o cilíndricas con radio conocido puede reducir esta limitación mediante la imposición de una zona de constante contacto.

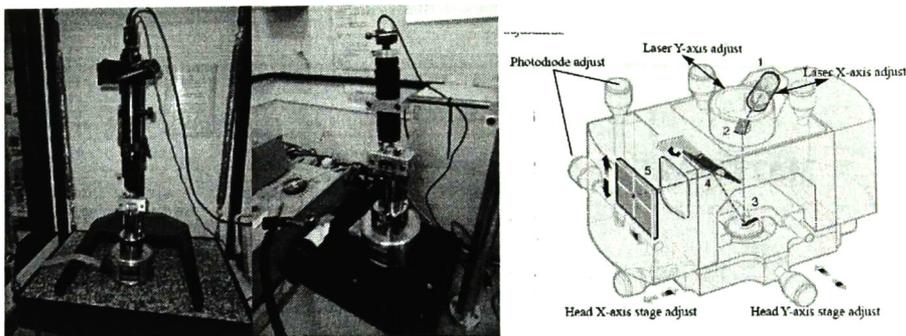


Fig 8 Microscopio de fuerza atómica Nanoscope III Multimode ubicado en los laboratorios de microscopía de la Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Control en la calibración del barredor piezoeléctrico

Ambos microscopio cuentan con escáners que pueden barrer áreas hasta de $100 \times 100 \mu\text{m}^2$, y hasta 3 (Dimension) y 10 (Multimode) μm en la dirección vertical. Como primer paso antes de realizar los experimentos se corroboró la correcta calibración del escáner. La calibración del mismo permite corregir la variación del piezoeléctrico para que el barrido sea el correcto. Para este fin se utilizan grillas o rejillas de calibración cuyas dimensiones se conocen con precisión. En este trabajo se utilizaron tres grillas comerciales para verificar la calibración del barredor piezoeléctrico del AFM multimodo propiedad del Centro de Microscopías Avanzadas de la UBA.

Calibración

Para el óptimo funcionamiento del equipo, además de asegurar la calidad y veracidad de las imágenes, se realizaron varias calibraciones para las mediciones realizadas en medio líquido, considerando la configuración del nanoscope III multimodo, localizado en el Centro de Microscopías Avanzadas CMA de la Universidad de Buenos Aires. En el caso de las medidas en medio líquido se realizó una serie de medidas sobre una muestra de referencia de oro recocido inmerso en una solución acuosa salina de búfer de fosfatos PBS. La Fig. 10 nos muestra las grillas de cuadros que

nos permite identificar si existe un desfase en las direcciones X y Y de la sonda al momento de hacer el barrido, o si mantiene las formas como en el caso de la grilla de barras como lo muestra la Fig 11. La Grilla de espícula (Fig 9) no arroja información del eje Z, además sobre el estado de la sonda, si estas desgastada, sucia y quebrada.

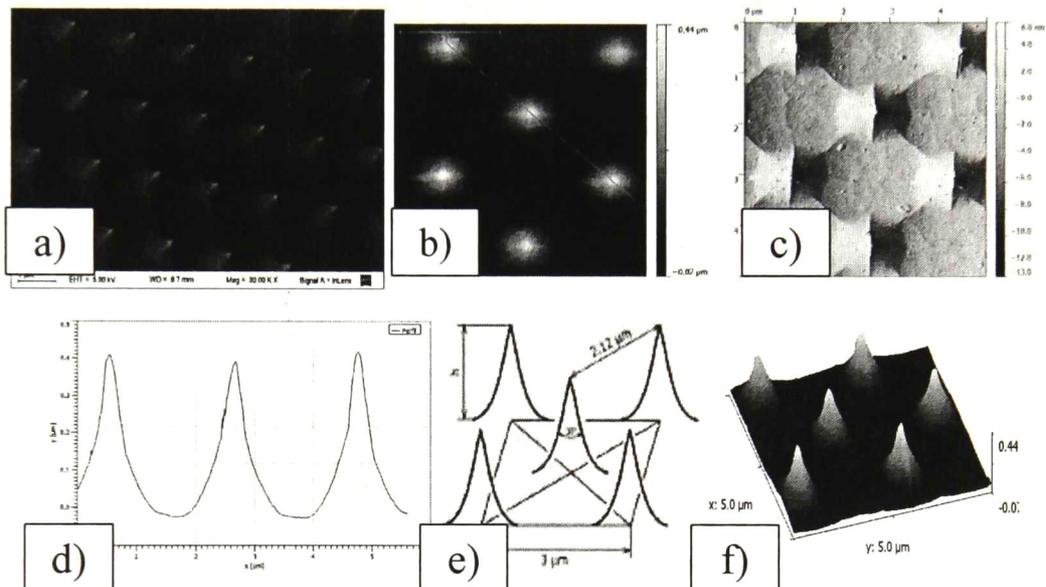


Fig.9 *Rejilla de referencia modelo TGT01 de la firma NT-MDT. Imágenes SEM (a) y AFM de topografía (b) y de deflexión (c) de la rejilla. En la gráfica (d) se presenta un perfil mediante el que se corrobora las especificaciones de forma de la punta de acuerdo con el fabricante. Las imágenes (e) y (f) son vistas en tres dimensiones de (a)*

El análisis del perfil de la grilla de espículas o rejilla de puntas y de sus imágenes, nos permitió asegurar que la punta de la sonda está en óptimas condiciones, es decir que no está dañada, contaminada o desgastada.

La rejilla o grilla NanoGauge NGR-2 de Nanodevices (Santa Barbara, EEUU) es una grilla de calibración en los ejes X Y Z. Consiste en una serie de diagramas en forma de cuadrados dispuestos con una periodicidad. En la Fig. 10 se pueden observar las imágenes de este arreglo, en la partes izquierda de la serie de imágenes se observa una microfotografía de SEM y la de AFM las cuales fueron obtenidas en el modo de contacto CM-AFM. El análisis de las dimensiones de las mismas proporciona

características que coinciden con las informadas por el fabricante.

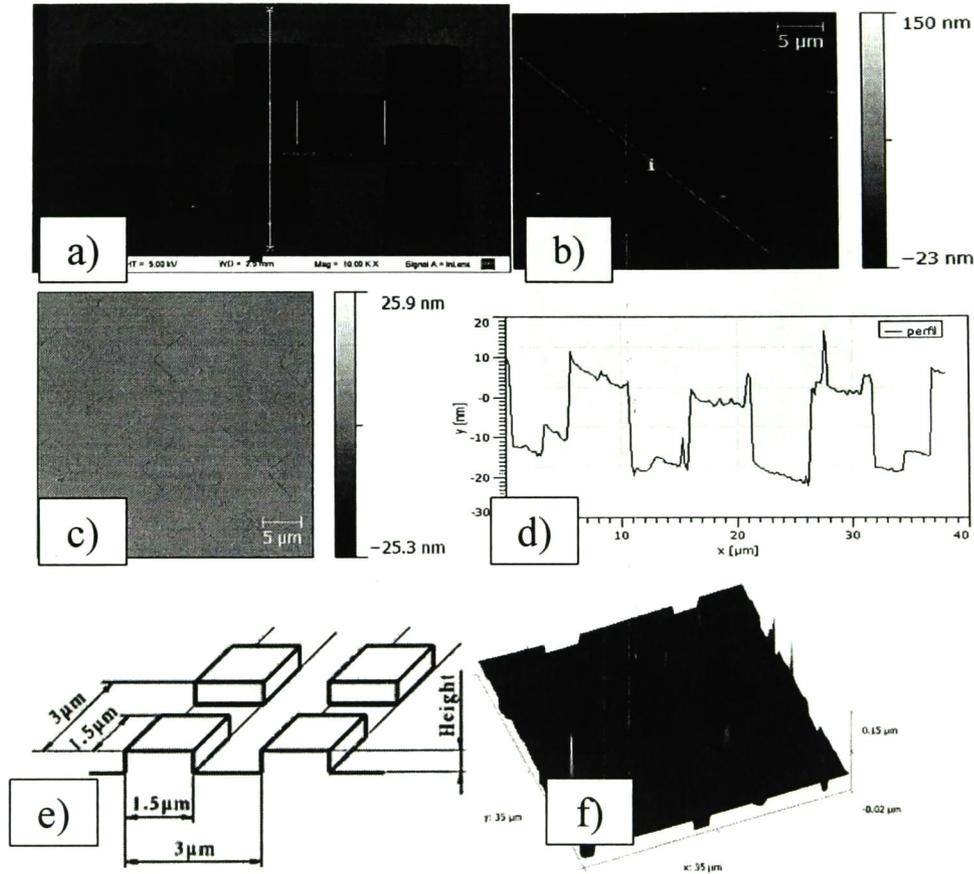


Fig. 10. Imágenes de la grilla NanoGauge NGR-2. (a) Micrografía obtenida por microscopía electrónica de barrido y (b) imagen de topografía por AFM obtenida en modo contacto en ambiente de nitrógeno seco. Se analizó la imagen de AFM para medir la profundidad de las depresiones y la periodicidad de la grilla. Utilizando la herramienta del software (Section Analysis) se obtuvo un perfil de alturas en la dirección vertical (c) y uno en la dirección horizontal (d). En cada panel se muestra la sección graficada y los valores de altura y distancia entre los pares de cursores. Cada valor se corresponde con el color de los cursores. Los valores medidos se encuentran dentro del rango especificado por el fabricante en (e) y (f) se muestra la imagen en 3D.

Se utilizaron también grillas de la empresa NT-MDT (Moscú, Rusia) de calibración en la dirección vertical, que consisten en arreglos periódicos de escalones de

período nominal 3mm. Las imágenes se tomaron en el modo de contacto a una deflexión (deflection point) de 0.5 V utilizando una sonda de nitruro de silicio con una constante de resorte de 0.35 N/m. A partir de estas mediciones, y corroborando que los parámetros medidos coinciden con las especificaciones de las rejillas de referencia, se puede concluir que el piezoeléctrico del escáner está calibrado en cada uno de los ejes.

En la Fig 11 se presentan las imágenes obtenidas para estas grillas y el análisis correspondiente, en donde se observa que las dimensiones obtenidas concuerdan con las del fabricante. Estas imágenes fueron proporcionadas por el CMA de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA.

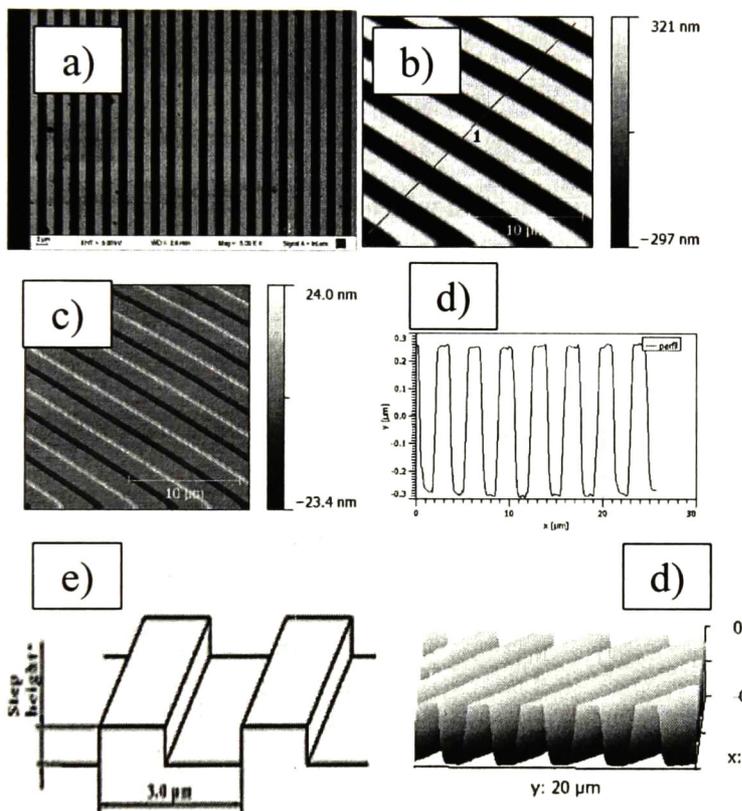


Fig. 11. Imágenes de topografía de las grillas TGZ01 y TGZ03. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido de la grilla TGZ01 (5000 X) (a) y TGZ03 (30000 X) (d). Las imágenes de las grillas TGZ01 (20x10 μm, z =200 nm) (b) y TGZ03 (20x10 μm, z =2000 nm) (e) fueron obtenidas en el AFM en modo de contacto

intermitente en presencia de nitrógeno gaseoso seco. En las secciones (c) y (f) se presentan los valores de altura y distancia entre los pares de cursores donde cada valor se corresponde con el color de los cursores. Los valores obtenidos concuerdan con los informados por el fabricante.

Ya calibrado el equipo, el paso siguiente fue relacionarse con el protocolo para realizar las medidas en medio líquido así como la preparación del equipo, las condiciones de seguridad para el usuario y para el equipo. Para este fin se utilizó una muestra ya conocida, oro recocido. La matriz en la que fue sumergida esta muestra de referencia fue PBS preparada en el mismo laboratorio. La Fig 12 muestra las imágenes obtenidas, que corresponden a resultados esperados. La realización de estas medidas permite además un entrenamiento para este tipo de medidas en medio líquido. Las condiciones de medidas fueron las siguientes: un tamaño de barrido (scan size) de 20 μm con una deflexión inicial (deflection setpoint) de 0.5 V en modo de contacto CM-AFM a 512 líneas, con un punta triangular de nitruro de silicio de constante de resorte de 0.32 N/m.

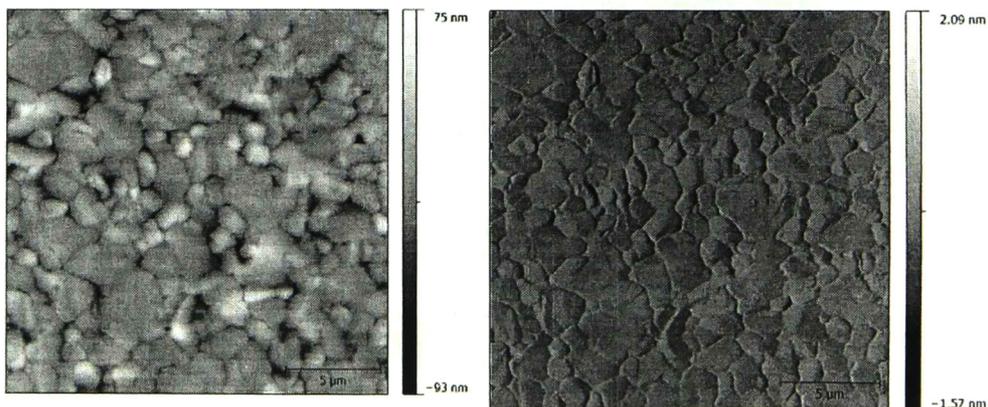


Fig. 12 Oro recocido inmerso en PBS, preparación para realizar medidas en medio líquido.

Las imágenes de SEM de las grillas son cortesía del Centro de Microscopias Avanzadas de la Universidad d Buenos Aires a cargo de la Dra. Lía Pietrasanta.

Primeros Intentos con células

La primeras pruebas que se hicieron para observar si era factible o no el poder observar células, fueron hechas en epitelio de cebolla que se fijó por adherencia capilar, lo que no requiere ningún tipo de preparación previa del sustrato. Se requirió un sustrato rígido y limpio, por lo que se optó por un portaobjetos de vidrio.

En la Fig. 13, la imagen de fase destaca la presencia de estructuras vegetales que no son identificadas en la imagen de topografía, ¿acaso la fase de este tipo de mediciones nos proporciona más información de la que se puede ver por Microscopía óptica convencional? ¿El AFM nos aporta mucho más información además que su alta resolución?; la respuesta es sí dado que las estructuras presentas están en el interior de la célula. Con esto se puede aplicar el estudio de biología y medicina ya que como se ha mencionado en este trabajo alcanzan resoluciones que difícilmente con otras técnicas sería posible. Además de que estas técnicas no son invasivas.

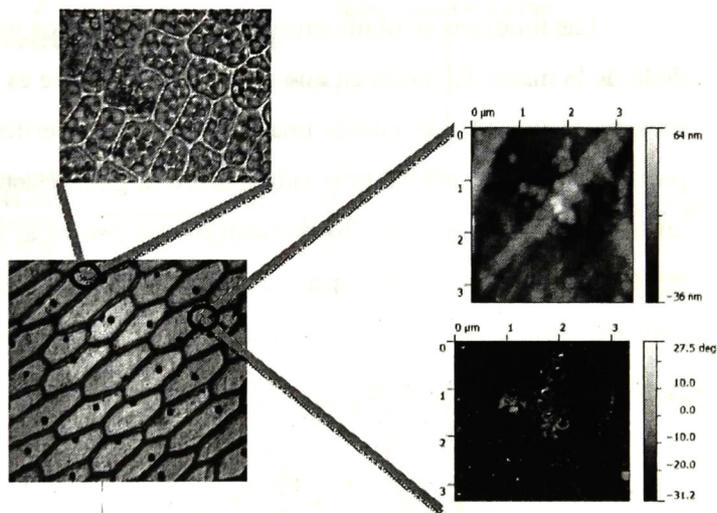


Fig. 13 Primero intentos con células, comparación entre microscopía óptica convencional y TM-AFM.

Una vez culminada la parte experimental donde se pudo observar células sin dañar las estructuras, donde se seleccionando correctamente las puntas, fuerza

suministrada a la muestra, tiempo de viabilidad y preparación del sustrato, el siguiente paso fue utilizar muestras sanguíneas y poder observar sus componentes celulares y caracterizarlos. La idea central fue utilizar células sanguíneas por varias razones; la principal fue por su fácil acceso, son más resistentes a agentes externos, y no se necesita mayor cuidado de manejo, limpieza e incubación, ya que el mismo cuerpo humano cumple con las condiciones anteriores. Las primeras medidas fueron en modo *tapping*, o *TM-AFM*, con punta de Silicio en forma de viga con una frecuencia de resonancia de 92.2 KHz y una constante de resorte de 3 N/m. Estas medidas se realizaron con el fin de establecer la metodología que se utilizaría en mediciones posteriores. Además de poder delimitar el tipo de punta y sus características físicas, además de las condiciones de medida.

Preparación de las Muestras

Una extensión o frotis sanguíneo consiste en recubrir parcialmente un portaobjeto con una gota de sangre, de tal manera que las células de ésta se dispongan formando una sola capa de ellas. Esto puede hacerse manual o automáticamente.

Las muestras se obtuvieron de sangre periférica por medio de un pinchazo de un dedo de la mano. El modo en que se procesa la sangre es por medio de un frotis como la muestra la Fig 14. Se coloca una gota de sangre periférica en la parte superior de un portaobjetos colocándose otro vidrio sobre la gota. Hasta que por capilaridad se forme una línea de sangre entre los dos vidrios. Se desliza el vidrio superior para formar una película lo más uniforme posible, cuidando que sea de un solo movimiento y la fuerza aplicada. Por lo que se le suministra una fuerza se corre el riesgo de deformar los glóbulos rojos.

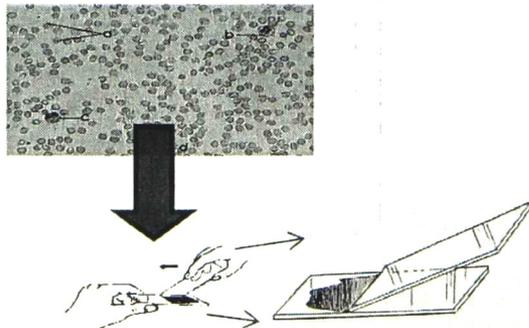


Fig. 14 Preparación de un frotis celular para su posterior análisis.

Una vez ya formado la extensión sanguínea se procede con el análisis de las células como se ha mencionado con anterioridad se analizan en distintos medios. En la Fig 15 se muestra el soporte de la sonda con la que se realizaran las mediciones, el HOLDER o soporte va sobre el piezo y controla los movimientos del scan. Los modos con los que se trabajó en este trabajo consisten en 3 modos principalmente:

- Contacto en aire y en liquido
- Tapping o contacto intermitente
- Modo Acústico o AFAM

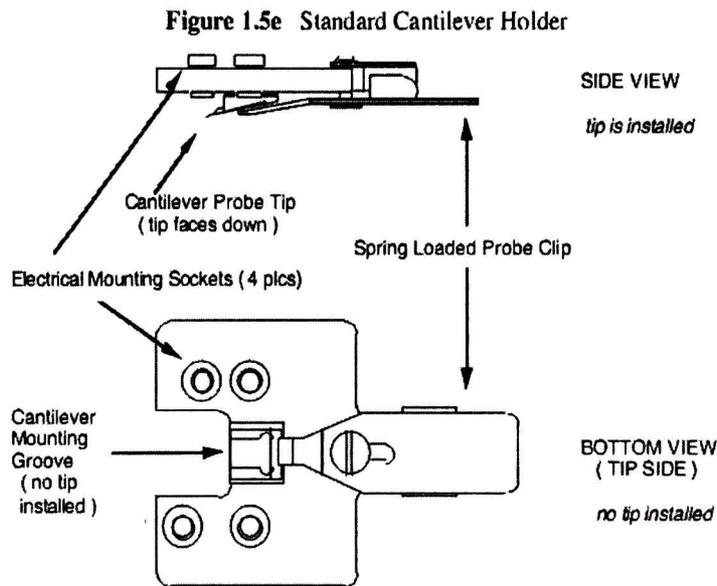


Fig. 15 Soporte donde va colocada la sonda o punta de trabajo.

Para trabajar en medio líquido se necesita de una celda especial, además de una metodología ya estandarizada para este modo de trabajo. La celda para medio se muestra en la Fig 16, con la cual se trabaja ya sea en agua, alguna solución buffer o un medio de cultivo.

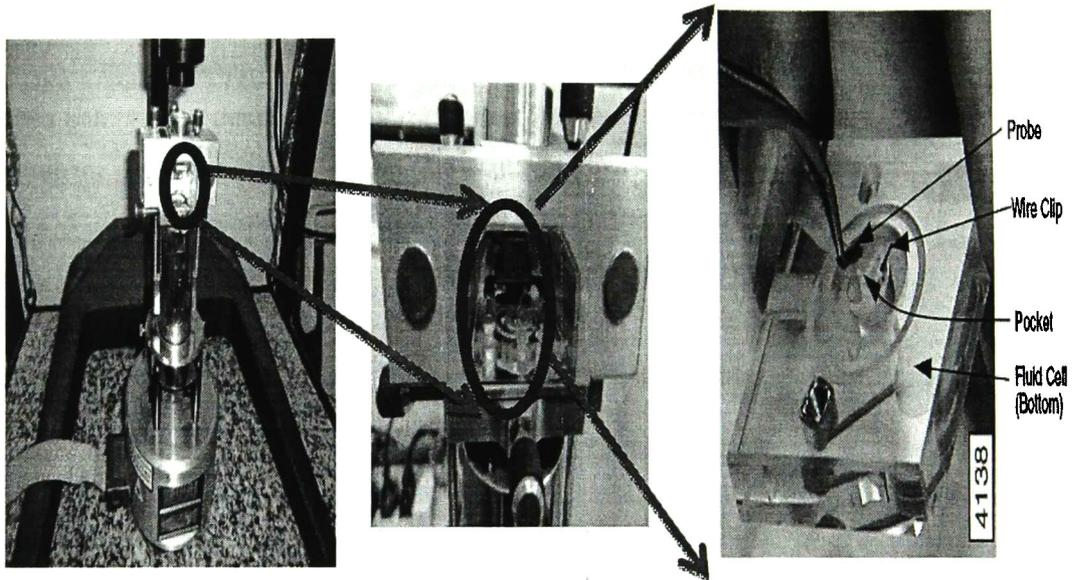


Fig. 16 Se muestra la celda necesaria para realizar medidas en un medio líquido

Lo primero que se realiza es colocar la muestra de observación sobre el soporte adecuado (platina metálica de 0.5-1 cm de diámetro) e introducirlo en el cabezal, posteriormente viene la alineación del láser sobre el cantiléver que sigue el procedimiento descrito: Colocar el *cantiléver* de silicio del usuario en el tip-holder (Fig 16) con la ayuda de unas pinzas e introducir el tip-holder en el cabezal. Aseguraos que la muestra se encuentre a una altura tal para que la punta no se pueda romper la punta de la sonda. La disposición vertical de la muestra se puede ajustar con el botón de control del motor situado en la parte derecha de la base. Este botón presenta dos posiciones: down. El control de la distancia punta-muestra se hará gracias a la visualización óptica con cámara web acoplada. El encendido del microscopio se realiza a través del controlador un botón que controla la intensidad de la luz. Se procede, a enfocar la punta. Una vez alineado el láser se enciende la mesa de aire y se procede a realizar las mediciones como lo muestra la Fig. 17



Fig 17 Intensidad de la señal del fotodiodo, cual nos indica si el láser está incidiendo en la sonda

Se ha de procurar que la intensidad del láser sea la máxima posible. Con esto, hemos conseguido la máxima resolución en vertical.

Una vez obtenido la máxima intensidad del láser, hacemos que la señal vertical del foto-detector alcance un valor lo más cercano a cero con la ayuda del botón de ajuste del fotodiodo. El valor de esta señal oscila desde -2 hasta -3 y el contador de la parte inferior lo más cercano a 0.

Modos de funcionamiento del AFM

Modo de Contacto Intermitente (IC-AFM)

Con el deseo de reducir los efectos nocivos fuerzas laterales que se producen durante la captura de datos en modo de contacto, se desarrolló esta técnica [23], y posteriormente se aplicó en algunos estudios de imágenes de células vivas [24]. En este modo de funcionamiento de la base de la sonda es impulsada sinusoidalmente a una frecuencia cercana a la frecuencia de resonancia del cantiléver. La punta oscila verticalmente con una amplitud de libre normalmente se establece en el rango de 10-100 nm. En lugar de utilizar la desviación de los cantiléver estáticos (DC) como una señal de retroalimentación (como se hace para el modo de contacto), se utiliza la amplitud de la oscilación de la señal de desviación vertical se usa para la retroalimentación del piezo. A medida que la sonda se acerca a la superficie de la muestra, la amortiguación de las oscilaciones de la punta se producen contacto intermitente debido a las fuerzas de con

experiencia en el extremo inferior de su ciclo de oscilación. Durante la exploración lateral, el z-piezo ajusta la altura media de la sonda de tal manera que la amplitud, y por lo tanto el nivel de amortiguación, se mantiene constante. Las fuerzas laterales se reducen drásticamente debido a la punta sólo se pone en contacto intermitente con la superficie. Además, la detección de fase de la oscilación de la punta (en relación con la señal de la unidad) proporciona una medida de la naturaleza disipativa de interacción con la punta, capaz de discernir las propiedades del material, tales como la adherencia o viscoelasticidad.

En la mayoría de los casos, la sonda no puede ser accionada directamente, sino a través de una señal de adicional puesta en el piezo. Por otra parte, al acercarse a una muestra suave, como una célula, las interacciones de amortiguación no están bien localizadas en altura debido al acoplamiento hidrodinámico de los movimientos de la punta en la superficie de la viscoelástica. Esto evita que la determinación precisa de las fuerzas de la imagen, pero las mejoras se realizaron de manera simultánea el seguimiento de la media de la DC-la desviación de la señal (un mejor indicador de la aparición de interacciones superficiales directo) [30]. La señal de desviación se pretende reflejar las propiedades elásticas de la interacción punta-muestra, mientras que la señal de fase indica las propiedades viscoelásticas. Estas características siguen siendo el mejor modo de aprovechar de manera cualitativa y depende en gran medida los parámetros de imagen. Por ejemplo, el contraste de fase a menudo se puede revertir resonancia, en función de la elección de la frecuencia de la unidad en relación con la palanca de. Sin embargo, para superficies muy suaves y el adhesivo, la punta puede no salir de la muestra dentro del rango de amplitud necesaria para bajas normales de la fuerza de aplicación. Esta es probablemente la razón por la que imágenes de células con el modo de tocar sólo ha sido alcanzado en un puñado de estudios. El éxito depende, naturalmente, del tipo de célula, y la propuesta de endurecimiento viscoelástico de de la superficie. El uso de técnicas de accionamiento magnético oscilatorio (MAC modo, Molecular Imaging Inc.) ha demostrado una reducción dramática de las excitaciones de líquidos no deseados (directamente una palanca oscilante magnetizado), pero las aplicaciones de imágenes de células aún no se han se dio cuenta (probablemente debido al aumento de la rigidez de las palancas magnético recubierto). Aprovechar el modo no

se empleó en los experimentos para el trabajo actual, se debe poder de las medir cuantitativas viscoelasticidad en un rango de frecuencia extendida. Frecuencias fisiológicamente relevantes suelen ser del orden de 1 Hz, que es inaccesible tapping modo. Un pariente cercano de contacto y modos de tocar es la técnica de la fuerza-modulación, donde las fuerzas de contacto CC se utilizan para la retroalimentación de altura, pero la sonda (o la muestra) también oscila a una frecuencia por debajo de su resonancia y por encima de la respuesta en frecuencia del circuito de realimentación [36]. Puesto que los efectos de resonancia que se evitan, las propiedades elásticas y viscosas de la muestra son más fáciles de calcular a partir de la en fase y fuera de la fase de los componentes de la oscilación de la punta (respuesta lineal). Sin embargo, incluso con imágenes muy lenta, la respuesta de retroalimentación requiere frecuencias de modulación que se ~ 1 kHz, utilizar sondas muy suaves (con resonancias dentro de este rango). Modulación de Fuerza no evita las fuerzas laterales perjudiciales, como la punta se mantiene en contacto a través de la imagen. Por lo tanto, como con el tapping modo, sólo una pequeña reporte de experimentos se han reportado con modulación de la fuerza a las células vivas de la imagen.

Modo Contacto (CM-AFM)

El modo más común de funcionamiento de la AFM se llama modo de contacto, donde la punta se pone en contacto estable con la muestra (interacción repulsiva). Resolución lateral en el modo de contacto (y la mayoría de los otros modos de imagen AFM) es limitada en última instancia por la convolución de la punta con la muestra, dado por la geometría de la punta, la rugosidad de la muestra y el nivel de indentación. La micro-escala de la geometría de la punta está bien definido (por lo general piramidal), La indentación aumenta el área de interacción punta-muestra, lo que reduce la resolución lateral. Este artefacto es, naturalmente, depende de la elasticidad local de la muestra, proporcionando así la sensibilidad a la más rígida las estructuras. Las imágenes depende de los tiempos de respuesta diferentes en el sistema de retroalimentación (palanca, la muestra, piezo, ancho de banda de fotodiodos, etc), el número de puntos de datos obtenidos en la exploración de trama, y posible destrucción de corte de la muestra. El E cambio en la fuerza de interacción se acciona a una velocidad (establecido por las

ganancias de realimentación) que supera la frecuencia de respuesta de cualquiera de los componentes involucrados, a continuación, las características topográficas no se realizan correctamente. El aumento de la fuerza aplicada o la velocidad de exploración lateral aumentarán la destrucción de corte inducida por la fricción de la muestra. El modo de contacto se puede utilizar para las células vivas de la imagen, pero generalmente se limita a relativamente rígida, las células bien adherida de los tejidos conectivos, con citoesqueletos que puede soportar grandes cargas (las células musculares, fibroblastos, macrófagos, células óseas, endoteliales, epiteliales, etc.). Los primeros estudios utilizan las fuerzas de imágenes en el orden de 10 nN y, con una resolución posible de ~ 30 nm, informaron las estructuras fibrosas que se muestra para reflejar los filamentos del citoesqueleto del interior de la célula (Henderson et al., 1992). Las características de la superficie de la membrana tales como microvellosidades (picos en las células epiteliales), no eran visibles a menos que se fijaron las células (rígidamente entrecruzado con glutaraldehído o paraformaldehído). [40]

La mejora de la sensibilidad se logró con el control de temperatura y la calibración de la fuerza, con las curvas fuerza-distancia antes y después de cada imagen, ha permitido imagen estable con una fuerza de ~ 1 nN. Esto dio lugar a una determinación fiable de la dinámica del volumen celular, la definición de complejo cerca de la membrana del citoesqueleto de redes, y la identificación de los poros de la fusión de exocitosis en pozos de membrana. Lo más importante, el uso de células muy rígidas (módulo de Young superficie de aproximadamente 400 kPa). Las imágenes producidas mostraron la superficie de las células, ya sea lisa o granular, dependiendo de la región de la célula, y sólo en ciertos lugares se observan estructuras filamentosas. Las partículas de la superficie granular son imágenes tan pequeñas como 5 nm (con tamaños de escaneo pequeño), lo que sugiere una sensibilidad a las proteínas de membrana. Imágenes con las fuerzas de 100 pN, el aumento de la presencia de elementos filamentosos, lo que sugiere que incluso en este nivel relativamente bajo de la fuerza, deformación de la superficie se produce (contraste topográfico y elástico en las imágenes). Por otra parte, las fuerzas electrostáticas sin contacto parcialmente contribuyen al perfil de la superficie observada, y que la mejor resolución se obtiene en las imágenes de la fricción (fuerza lateral del canal, adquirido al mismo tiempo). Por lo

tanto, con el modo de contacto, la separación clara de características topográficas, elástico, propiedades de fricción, la superficie de electrostática, y otros sigue siendo un reto importante. Si las estructuras de interés son dinámicas en una escala de tiempo más corto que el tiempo de formación de imágenes, sólo una representación "difusa" de la superficie se puede lograr (con independencia de la fuerza de la imagen).

Curvas de Fuerza-Distancia

La evaluación cuantitativa de las propiedades mecánicas de una superficie con AFM requiere utilizar las curvas de fuerza-distancia. Después de un curso inicial de enfoque (con el motor paso a paso), el perfil vertical de las fuerzas de interacción punta-muestra se evaluó mediante la exploración de la sonda con el z-piezo a través de una serie de separaciones de la muestra punta-tanto contacto y los regímenes de no-contacto (mantener la posición xy fijos); De esta manera la naturaleza de las fuerzas de la muestra-punta se puede evaluar. Estos son: de largo alcance electrostática o de corto alcance de van der Waals, repulsión duro o la deformación viscoelástica, no adhesión específica a la superficie.

En la Fig 18 observamos las interacciones en relación de la distancia y las curvas de esfuerzo:

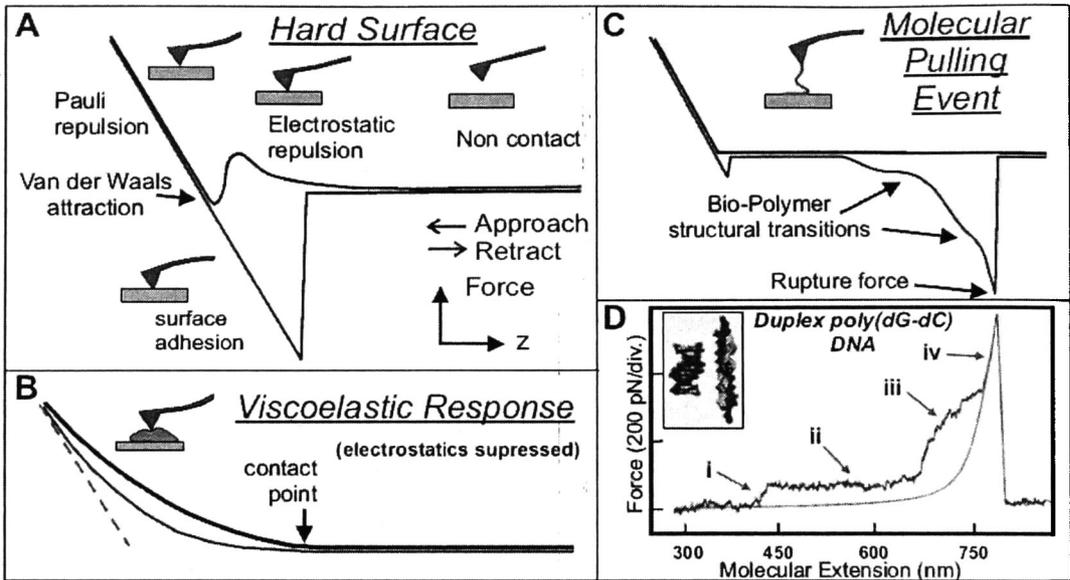


Fig 18 Modelos de curvas de fuerzas representativas

(A) Cuando una punta de AFM se acerca a la superficie de la muestra, un número de tipos de fuerzas se dejan sentir a través de diferentes muestras de punta separaciones (por ejemplo, rango de tiempo electrostática, de corto alcance de van der Waals, y difícil de Pauli-repulsión). Las fuerzas de adhesión se pueden medir la retracción.

(B) Si la superficie es suave en comparación con el resorte de la palanca constante (por ejemplo, una célula viva), deformación de la superficie o el sangrado se produce. La fuerza se incrementará gradualmente y de forma no lineal, (difícil de localizar con precisión), en función de la geometría de contacto y el módulo de elasticidad de la superficie. Deformación viscoelástica se observa como una histéresis entre el enfoque y las curvas de retracción en la zona de contacto.

(C) las moléculas individuales se pueden estirar de una superficie, la medición de fuerzas de unión (punto de ruptura) y la fuerza inducida por las transiciones estructurales intramoleculares.

(D) Un ejemplo de las transiciones estructurales inducidos en las moléculas de ADN de doble cadena. A las fuerzas bajo (i) el perfil de la extensión es un reflejo de la elasticidad entrópica de la molécula, pero a 65-70 pN una meseta (ii) identifica una reorganización

estructural de la (recuadro) de doble hélice. A mayor fuerza ($\sim 300\text{pN}$, iii), el derretimiento de los nucleótidos que une las dos cadenas se observa, más allá de que la elasticidad de hebra prevalece (iv, la curva roja es un ajuste para el modelo de cadena libremente articulado).

Cuando una muestra rígida es tocada por la punta y la repulsión establecida, se será una correspondencia exacta de las deflexiones palanca con el movimiento de la z-piezo (lineal con una pendiente de 1), siempre y cuando no linealidad en el fotodetector o la palanca se evita. Así es como la sensibilidad de la desviación del haz óptico está calibrada. Una vez que esta sensibilidad se establece la separación de la muestra-punta y hendiduras en las curvas posteriores se calcula (1) la fuerza constitutiva de cero o nivel de referencia de deflexión (lejos de la superficie), (2) establecer el punto de contacto, z_c , y (3) restando movimientos de desviaciones de la punta del piezo a medida que la sonda se reduce a la superficie de la muestra, permite la detección precisa de la aparición de las interacciones de la muestra-punta. Interacciones que varían gradualmente con la separación, tales como las fuerzas electrostáticas elástica o débil, complican la evaluación de la ZC. En soluciones salinas líquido utilizado para los experimentos de células vivas, de largo alcance, electrostática y de van der Waals son generalmente insignificantes. Al empujar la punta más en una muestra suave (rigidez comparable o menor que la rigidez de la palanca) un aumento no lineal en la fuerza, medida que se observa. La no linealidad se debe a que el área de contacto entre la punta y la muestra aumenta con indentación. Para el aumento no lineal de la fuerza se describe por contacto con la mecánica de Hertz como:

$$F_s = \frac{4ER^{1/2}}{3(1-\nu^2)} \delta^{3/2}, \quad \text{spherical indenter of radius } R \gg \delta, \text{ or}$$

$$F_c = \frac{2E \tan(\theta)}{\pi(1-\nu^2)} \delta^2, \quad \text{conical indenter of half-opening angle } \theta.$$

Aquí E y ν son el módulo de Young y la relación de Poisson de la muestra,

respectivamente. La indentación se calcula como $d = z - d_z$, z con el movimiento z -piezo en relación con z_c (abajo es positivo para la punta de exploración, hasta es positivo para la muestra de barrido) y d la señal de desviación en relación con la falta de contacto, la desviación. Regiones indentación ajuste de las curvas fuerza-distancia con estas declaraciones fórmulas los valores de la constante elástica $E / (1-\nu^2)$ y el z_c punto de contacto, como los dos parámetros de ajuste (siempre y cuando los factores de punta geométrica, como el caso de R que es el radio de curvatura de la punta).

RESULTADOS

Los primeros intentos se realizaron Se describirá a continuación los resultados obtenidos de las mediciones realizadas, para más detalle de las condiciones de medida y puntas utilizadas ver el Apéndice.

Se varió solo el tiempo de secado y la técnica con la que se podía observar y ser menos invasivo con las células. Se eligió el epitelio vegetal de la cebolla por ser células planas y sin tanta rugosidad siendo las más planas, sencillas y de preparación sencilla. En las imágenes siguientes se observa células vegetales por medio de contacto intermitente y posteriormente de contacto. Lo trascendental de esta técnica es la nula invasión al sistema, lo que implica es que el sistema permanece casi intacto o con muy poca alteración pudiendo observar al sistemas en su estado más puro, en Fig. 19 se observa una serie de imágenes obtenidas en el modo de trabajo de contacto intermitente con un scan size de 3.2 micras y con una frecuencia de resonancia de 92.522 KHz.

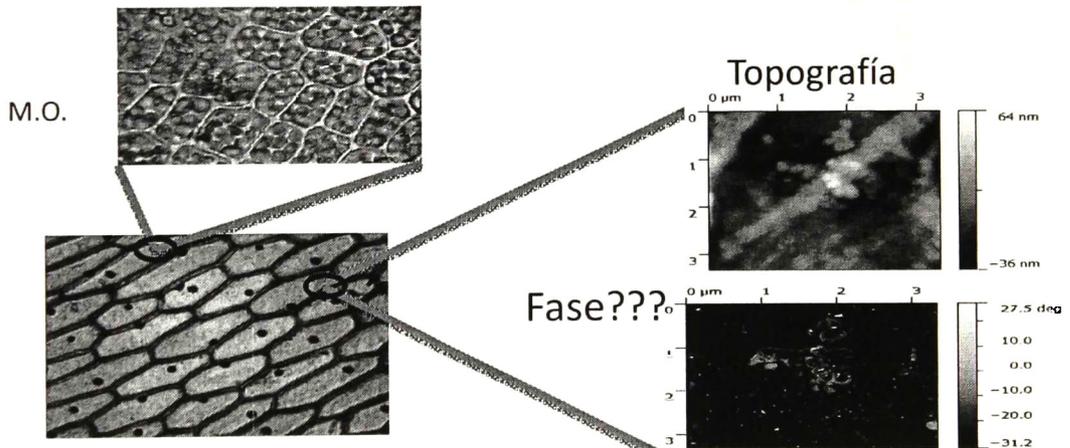


Fig 19 Primeros intentos con AFM con células vivas.

Una vez que terminada la primer parte donde se puede observar células sin dañar las estructuras, seleccionando correctamente las puntas, fuerza suministrada a la muestra, tiempo de viabilidad y preparación del sustrato, el siguiente paso fue utilizar

muestras sanguíneas y poder observar sus componentes celulares y poder caracterizarlos. Como muestran las siguientes imágenes. Se pensó en utilizar células sanguíneas por varias razones; la principal fue por su fácil obtención, son más resistentes a agentes externos, y no se necesita mayor cuidado de manejo, limpieza e incubación, ya que el mismo cuerpo humano cumple con las condiciones anteriores. Lo primero que se observó en el frotis fueron glóbulos rojos por estar en mayor cantidad, como lo muestra la Fig. 20. Las células de la línea blanca son más escasas o difíciles de encontrar. Las primeras medidas fueron en modo *tapping*, con punta de Silicio que tenía una frecuencia de resonancia de 92.1522 KHz, estas medidas se realizaron con el fin de hacer un sondeo para establecer a metodología que se utilizaría en mediciones posteriores. Además de poder delimitar el tipo de punta y sus características.

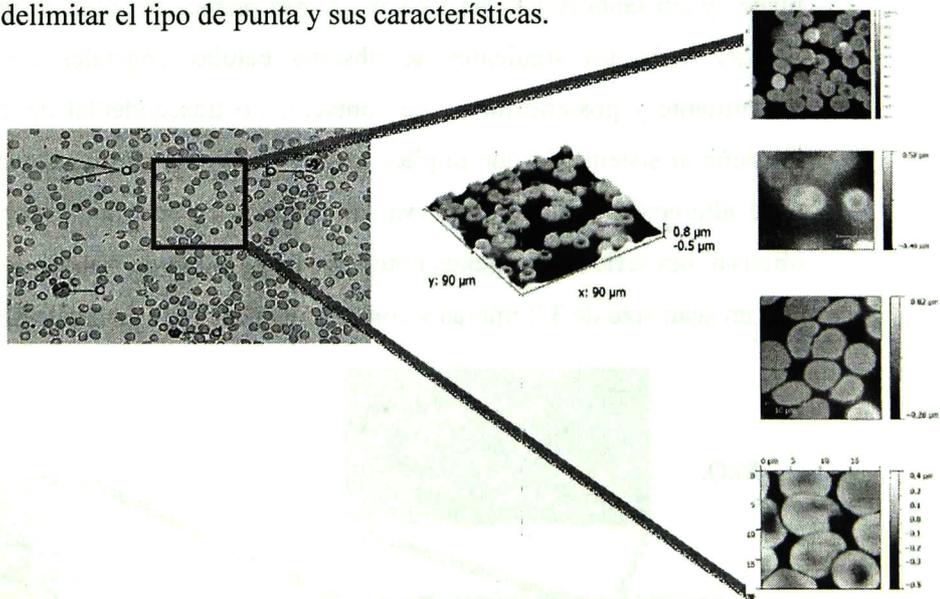


Fig. 20 frotis celular de sangre periférica. Punta de Si con frecuencia de 95.1522 KHz y un drive amplitud de 113 mV.

Las células se fijaron sobre vidrio, un sustrato rígido sin ningún tipo de preparación, esto ya ahorra bastante tiempo, además agiliza las medidas ya que en otro tipo de células, o sistemas biológicos la adhesión al sustrato es una parte crucial de las mediciones, ya que si no está fijo el material al sustrato no es posible la medida, que en

este caso no fue necesario, ni funcionalizar la superficie por algún tipo de adhesivo, o las células. La importancia de observar un frotis de glóbulos rojos y observar células redondeadas con bordes definidos, es descartar una esplenectomía y por lo tanto una anemia falciforme. Las medidas en diámetro corresponden a 7 micras que es lo normal en un eritrocito.

La relevancia medica de medir y observar correctamente los globulos rojos, y sus dimensiones adecuadas es la de descartar, la presencia de esferocitos, que son eritrocitos mas pequeños de lo normal, y su pared celular es más debil, esto se da cuando una de las cadenas de hemoglobina esta dañada provocando desestabilidad en el tamaño celular, la esplenectomía sucede la cuando se retira una porción del bazo, éste órgano interviene en la hematopoyesis y es por eso que despues de un procedimiento quirúrgico de este tipo se altera la formacion de eritrocitos funcionales, asi que es una buena forma de poder monitorear a la población de este tipo de célula. La Fig 21 muestra uno frotis celular analizado por medio de el modo de contacto intermitente, lo relevante es que se logar ver las estructuras celulares intactas , siendo esto lo mas relevante de la tecnica y de este tipo de microscopias.

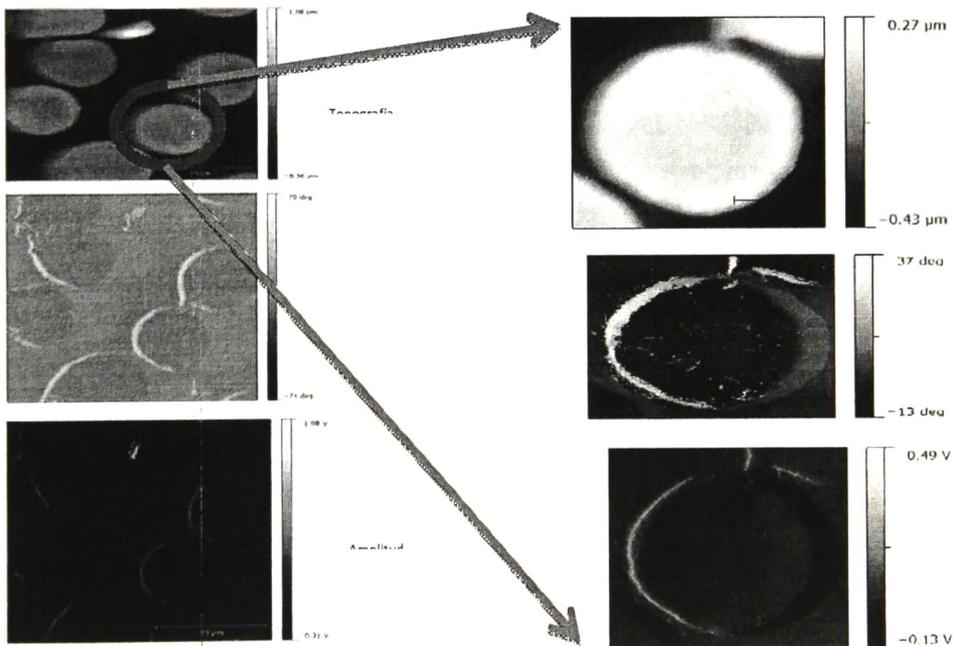


Fig 21 extension celular de G.Rojos.

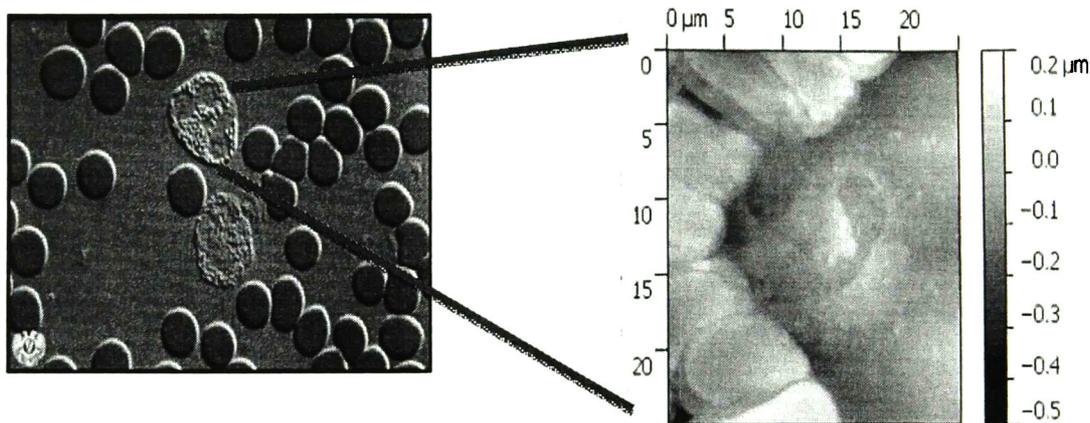


Fig. 22 Segmentado encontrado en el frotis de una persona fumadora; diagrama de un eosinofilo, célula encargada de la defensa contra ectoparásitos.

La Fig. 22 fue obtenida en el modo de trabajo *tapping*. Se muestra un segmentado encontrado en el frotis de una persona fumadora, con un régimen de 10 cigarrillos diarios. Este tipo de célula se presenta muy rara vez en sangre periférica, disminuyendo su concentración cuando la persona está en contacto con un agente infeccioso, ya que su función biológica es de señalización y la activación de la demás respuesta celular. Además estas células solo se incrementa en presencia de anemia perniciosa y falta de ácido fólico, los valores normales de estas células en sangre es tan alrededor del 45%. Si se encuentran disminuida es probable deberse a infección bacteriana o quemaduras. Otras de las células segmentadas son los eosinofilos, células encargadas de la defensa contra ectoparásitos. Su trabajo es la de ser sacrificable en presencia de los parásitos degranulándose, la importancia de este imagen reside en que podemos observar la cromatina laxa y sus gránulos con mayor detalle que en una tinción, además que un frotis se puede observar si estas células están disminuida o aumentada.

La otra técnica con la que se trabajo fue en AFM modo contacto. En este modo de trabajo se obtuvieron imágenes de menor resolución pero con la ventaja de que se obtuvo el coeficiente de fricción de los glóbulos rojos en personas fumadoras (más de 10 cigarrillos diarios), y en personas no fumadoras. En la fig 23 se muestra una galería de

imágenes de un frotis sanguíneo que va desde una barrido amplio hasta tomar una sola

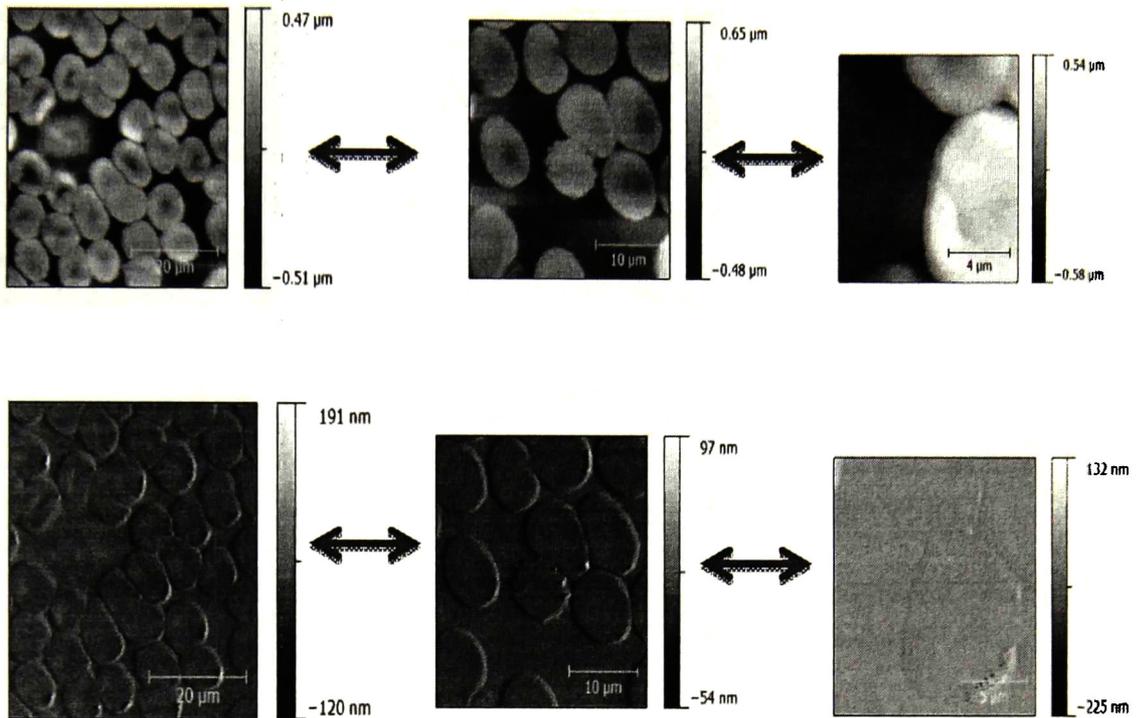


Fig 23 Muestra una serie de imágenes obtenidas en modo de Contacto

Si se compara con el modo de Contacto Intermitente se observa que la resolución varía mucho de un modo de trabajo a otro. Teniendo una mejor resolución en modo de Contacto Intermitente. Pero en modo de Contacto se obtiene información que en otros modos no se podría, como el caso del coeficiente de fricción.

Por este modo de trabajo se pueden observar otro tipo de estructuras sanguíneas, como el caso de las plaquetas, involucradas en el proceso de la coagulación. Además de segmentados, célula encargada de la primera respuesta celular. En la Fig 24 se muestran las estructuras mencionadas con anterioridad.

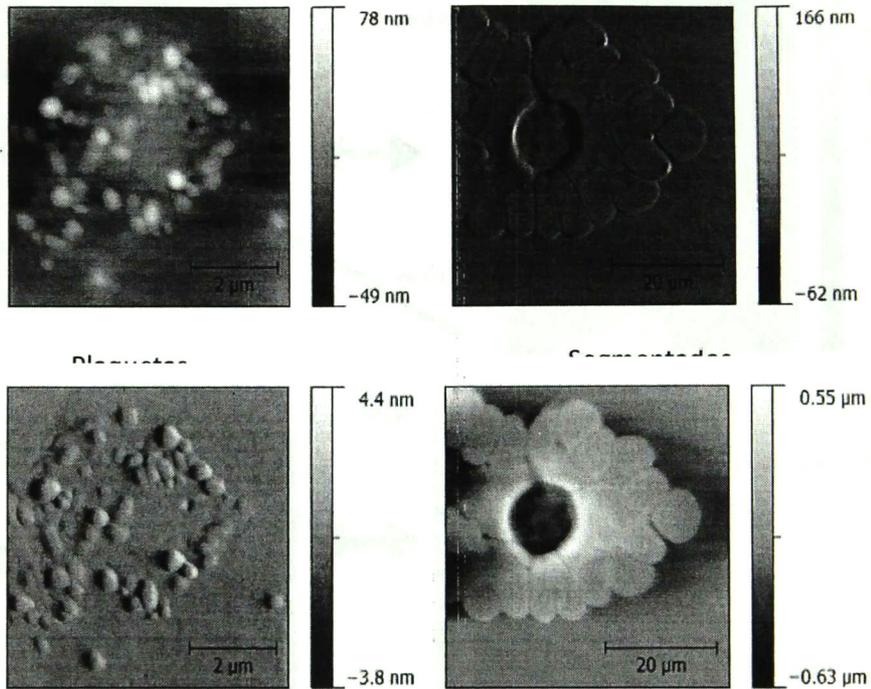


Fig 24 Estructuras sanguíneas observadas por AFM con un deflection point de 0.5 V con una punta de Si

El otro modo de trabajo con el que se realizaron los experimentos propios de este trabajo fue la obtención del coeficiente de fricción de un Eritrocito de personas con diferente grado de tabaquismo. El coeficiente de fricción se obtuvo graficando la fuerza normal contra la fuerza lateral, obteniéndose una pendiente que viene a ser el coeficiente de fricción. Se realiza un barrido de fuerza y se obtienen los valores de las fuerzas por medio de un programa de Matlab y se obtiene la recta. En las Fig 25 se presentan las gráficas de los coeficientes de fricción, obtenido el graficar Fuerza Normal contra Fuerza Lateral y la pendiente de la recta obtenida corresponde al coeficiente de fricción (μ).

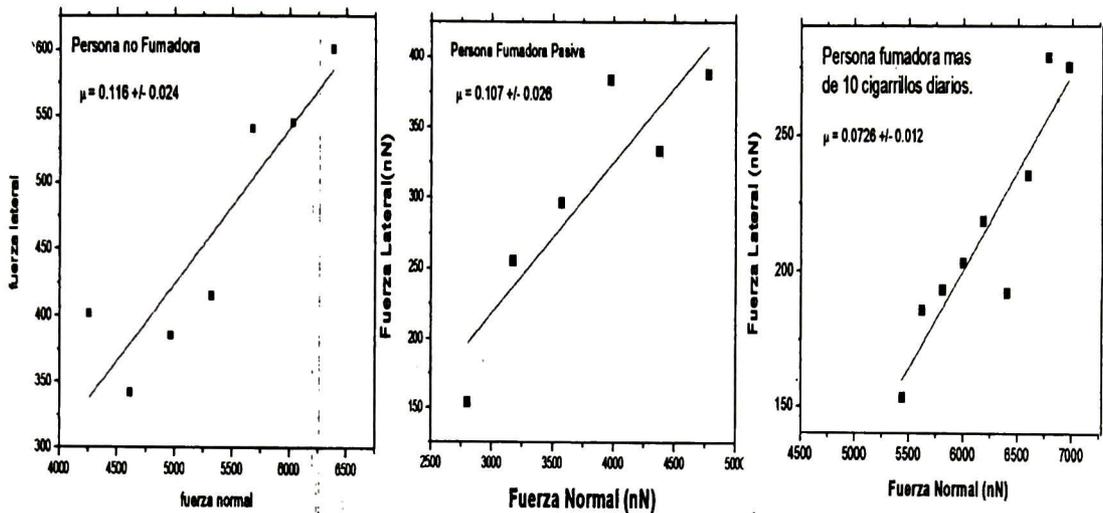


Fig 25 Coeficiente de fricción de un eritrocito de personas con distinto grado de tabaquismo.

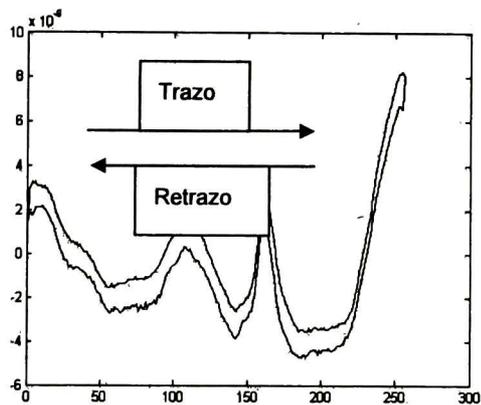


Fig26 Imágenes de trazo y retrazo de las células con distinto grado e tabaquismo.

Quando se realizan los cálculos en el programa de fuerza normal y lateral, también se obtiene los valores de trazo y retrazo (Fig 26), análisis estadístico de la fuerza de torsión,

coeficiente de fricción. Es sabido que en células con la presencia de la molécula de carboxihemoglobina modifica la membrana eritrocitaria [18]. Con esto se relaciona el estado físico de la membrana con el coeficiente de fricción y por ende, con la salud del paciente, ya que al aumentar la presencia de carboxihemoglobina en la membrana los glóbulos obstruyen los vasos capilares provocando los problemas circulatorios muy notorios en el tabaquismo. La causa más sobresaliente del tabaquismo es que interfiere con el metabolismo de las grasas y aumenta considerablemente el colesterol en las persona con este *hábito*. Por lo tanto La versatilidad del equipo nos ayuda a obtener imágenes de trazo y retraso y con ayuda de estas poder relacionar el coeficiente de fricción con la interacción punta-superficie.

La otra metodología utilizada fue realizada en el Centro de Microscopias Avanzadas de la Facultad de de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Se realizaron en medio líquido en el modo de trabajo de Contacto.

Las primeras medidas se realizaron sobre células fijadas en un sustrato rígido, siguiendo la metodología de México, se utilizó una atmósfera controlada de N_2 a un flujo constante. La Fig 28 muestra una extensión de eritrocitos, obteniéndose se un perfil de la imagen para corroborar que realmente son correctas las dimensiones de la topografías del globulo rojo. Estos tipos de perfiles se realizaron con un tratamiento de imágenes con el programa propio del microscopio.

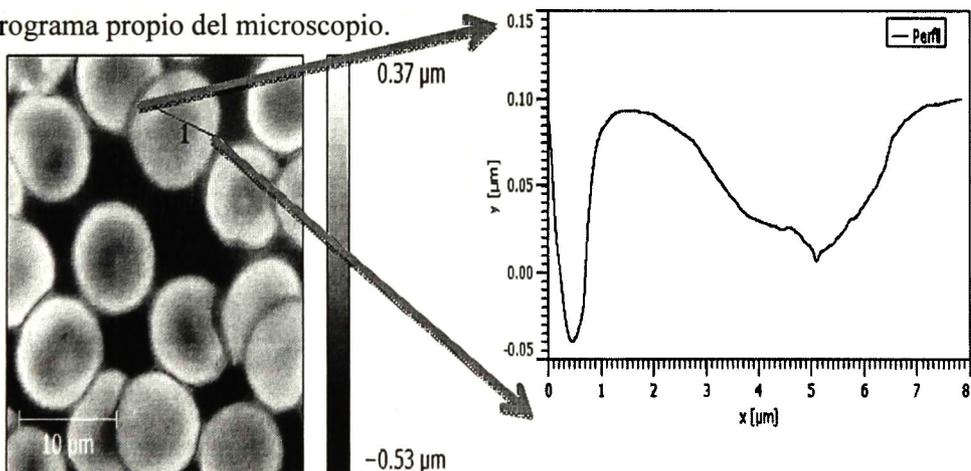


Fig 28 Perfil de un Eritrocito realizado con el Digital Instrumental.

Los perfiles de las imágenes que obtenemos nos muestran si la imagen

corresponde realmente a un sistema existente y no son artefactos y evidencias erróneas del sistema en estudio. En este caso corresponden a las medidas con un glóbulo sano.

Se trató de medir glóbulos rojos en medio líquido, por medio de un frotis convencional, en presencia de una solución buffer de PBS, con lo cual no se obtuvieron resultados ya que las células no se quedan fijas al sustrato y por lo tanto no se obtuvo las medidas. Posteriormente se utilizó fibronectina para fijar las células obteniéndose los mismos resultados. Por lo que se procedió a obtener curvas de fuerza mismas que si fueron obtenidas satisfactorías. Con las mismas células se obtuvieron medidas pero en aire en presencia de un flujo constante de Ni, con condiciones constantes de humedad y temperatura; 24 ° C y 33% de Humedad.

Una vez corroborado todos los parámetros se siguió con el programa y se obtuvieron imágenes de glóbulos rojos como los muestra la Fig 29

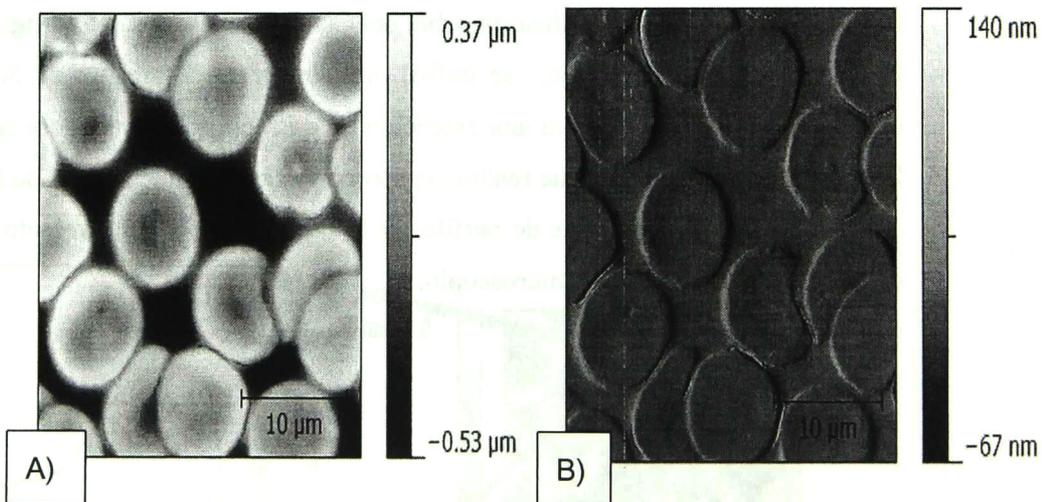


Fig 29 A) muestra la topografía de un extenso celular, en el B) se muestra al Amplitud de este frotis celular donde se realzan o se diferencian algunas estructuras que en topografía nos tan claros

Una vez que se pudieron observar los eritrocitos se procedió a las mediadas de propiedades elásticas de las células partes medular de esta tesis. Se realizó un *force volumen* en el equipo sobre un grupo de células HeLa y tratar de ajustar las curvas al modelo de Radmacher y así poder obtener su módulo de Young. Esta aproximación

toma en cuenta el modelo de Hertz y se ajusta a los parámetros propios del modelo.

Como paso primero, se obtuvieron las curvas de fuerza en las indentaciones de las células epiteliales cultivadas en el laboratorio. Una vez viables las células y alcanzando una población optima se procedió a indentar. Primero se seleccionó un área donde fuera seguro que estuviéramos sobre la célula. Las indentaciones se hicieron sobre la porción celular que se muestra en la siguiente imagen.

Las células de cultivaron en medio DMEM ver apéndice II), para efecto de obtener las curvas de fuerza se mide primero el material de referencia que en este caso fue mica mismo que fungió como soporte rígido. Una vez ajustado el microscopio se realizan las medidas ver Fig 30.

En la imagen de la célula HeLa fija fue cortesía de Catalina von Bilderling, alumna de doctorado de la Facultad de ciencias exactas y naturales de la Universidad de Buenos Aires.

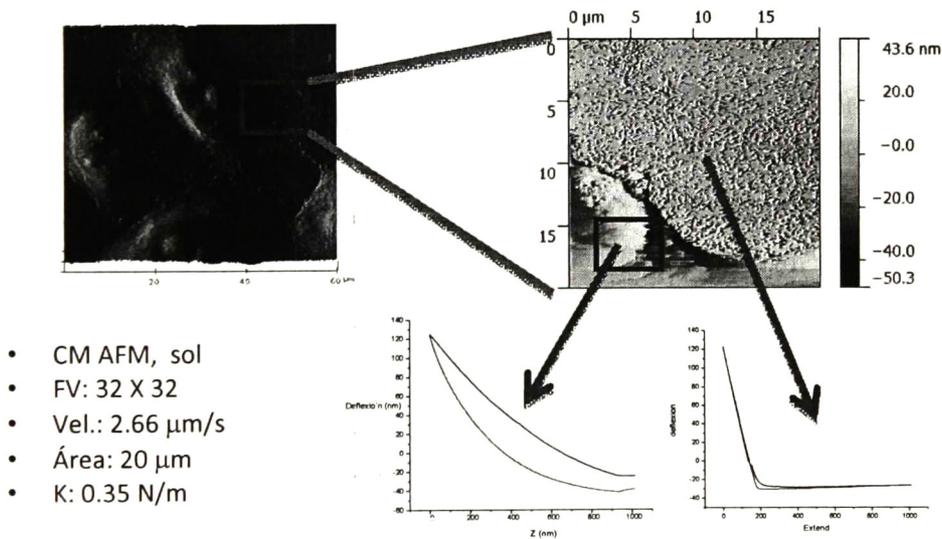


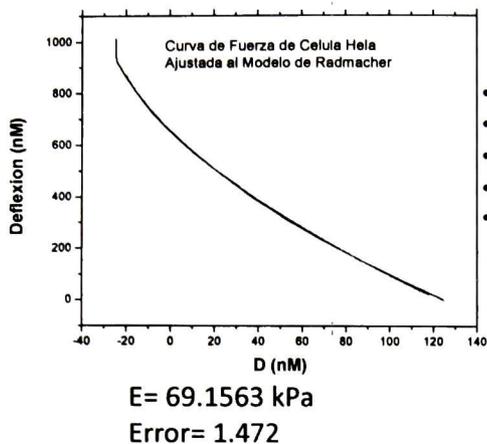
Fig 30 células HeLa Fijas y vivas y las curvas de fuerzas obtenidas correspondientemente (Cortesía de CMA, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA)

Una vez obtenidas las imágenes se analizaron en el programa del equipo obteniéndose un archivo .txt el cual se graficó y se ajustó al modelo de Radmacher. Las siguientes gráficas muestran las curvas de fuerza y la de la curva perfectamente ajustada a este modelo. Con el cual se puede determinar el módulo de elasticidad. Las curvas obtenidas se compararon con indentaciones en mica y en la célula, con lo que se comparó la forma de las mismas siendo características propias de cada material.

Las características de las mediciones fueron hechas con una punta de Si_3Ni_4 con un $K= 0.24$ siendo la nominal esta constante de resorte, la primera apreciación de las curvas es que presenta la forma características de las células HeLa reportadas por Radmacher en su trabajo, una vez obtenida estas curvas, así por si solas no representan nada, se tiene que analizar y ajustarla a un modelo que nos dilucide el comportamiento de esta estipe celular.

A diferencia de la dureza, el módulo de elasticidad es una constante del material y es independiente de la forma de indentador, sin embargo la dificultad para analizar las curvas de carga-descarga es precisamente el modelo del curso del área proyectada durante la descarga. El modelo subyacente usualmente en su forma de ecuación matemática describe el tiempo-dependencia.

Aplicando el modelo de Radmacher y obtenido los valores del módulo de elasticidad nos da un valor de 131.0425KPa, comparado con valores reportados en la literatura, (Ida Dulinska et al; 2005). Se usó un valor de radio de Poisson de 0.5° obtenido de distintas células por medio de elastografía de resonancia magnética (Inglof Sack et al; 2000). Este análisis nos demuestra y dilucida que existe un modelo que cumple y ajusta para células e indentaciones y que podemos comprender el tipo de contacto que hay entre punta muestra, para determinar los valores de elasticidad de las células, como lo muestra la Fig 31 que es uno de los objetivos buscados de este trabajo.



- CM AFM, sol
- FV: 32 X 32
- Vel.: 2.66 $\mu\text{m/s}$
- Área: 20 μm
- K: 0.35 N/m

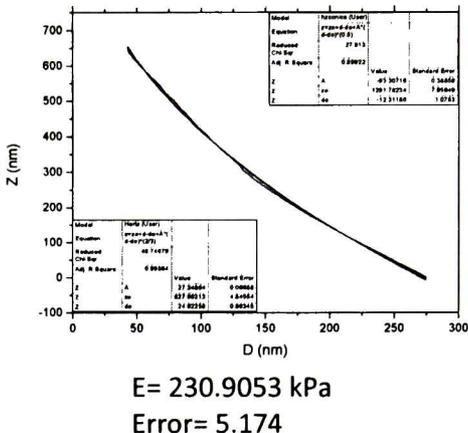


Fig 31 determinación del módulo de elasticidad aplicando el modelo de Radmacher basado en un contacto Hertziano.

Por lo tanto Se determinó la respuesta elástica de la célula HeLa en experimentos de indentación. El modo de trabajo más novedoso y que aun esta en desarrollo y que viene a formar parte de las perspectivas y trabajo futuro es el modo acústico, Se pone en evidencia las diferencias en rigidez presentes en Glóbulos Rojos ¿Estamos ante una forma de pensar la relación estructura - función de una célula?

Con el modo acústico se obtuvieron una serie de imágenes donde se observa que se tiene mejor resolución de las estructuras celulares en comparación del modo *tapping*. Esta técnica se basa en obtener las frecuencias naturales y en contacto de las sondas, se hace un barrido en la frecuencia optima de la sonda en contacto y se obtienen imágenes que se presentan a continuación. Las imágenes en la Fig 32 fueron realizadas por AFAM convencional obtenidas con puntas de Si con una frecuencia de resonancia de 376.6 KHz, esta técnica nos permite ubicar e identificar diversos materiales que resuenan a distintas frecuencias, la importancia y relevancia de esta técnica en sistemas biológicos es que estos sistemas son muy complejos y con gran cantidad de elementos y esta técnica es muy útil para poder observar y diferenciar las diferentes estructuras, obteniendo mayor resolución en este modo de trabajo mostrando una amplia ventaja sobre las otras técnicas en el área biológica.

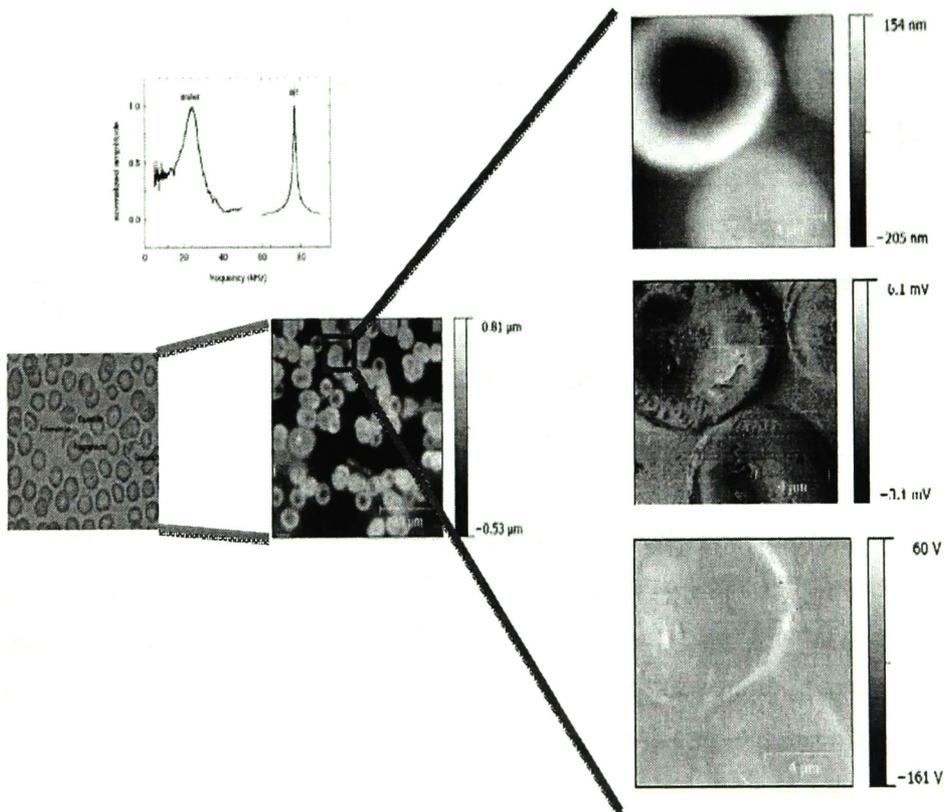


Fig 32 Modo de trabajo AFM uno de las aplicaciones más Novedosas al aérea de la Biología

En la Fig. 32 se observa claramente tres zonas que permiten diferenciar estructuras y materiales propios de las células, ya que por la diferencia de rigidez de contacto con la punta, el cantiléver resuena a diferentes frecuencias. Se observan zonas de color amarillo y rojo claro que sus frecuencias son muy cercanas y por lo que se puede deducir es que son parecidos en módulo de elasticidad, y zonas en color rojo que son completamente diferentes. Cabe mencionar que esta descripción es meramente cualitativa, en cuanto a lo cuantitativo se realizara en trabajos posteriores.

CONCLUSIONES

La medición de AFM de la rigidez celular puede ser empleada como un método directo para la detección de las propiedades elásticas de la membrana celular de eritrocitos y del citoesqueleto. Esto demuestra la capacidad de detectar cambios de la membrana que se puede correlacionar con las alteraciones estructurales típicas de ciertas enfermedades de la sangre como esferocitosis, talasemia y deficiencia de G6PD. El posible uso de AFM para detectar las poblaciones de los eritrocitos en muestras de sangre de pacientes con anisocitosis sugiere que puede aplicarse no sólo a la rigidez característica de la célula, sino también para detectar la patología de los eritrocitos en una población total de glóbulos rojos.

Se definió y aprendió sobre la metodología para el manejo del microscopio de fuerza atómica (AFM) y de sus modos de funcionamiento y accesorios relacionados (espectroscopia de fuerzas y microscopia de fuerzas laterales, AFAM). Así mismo, se aprendió e implementaron métodos para la preparación de muestras biológicas fijadas sobre superficies de mica, aptas para ser estudiadas mediante microscopia de fuerza atómica. Al igual que también, se realizaron estudios de fricción por mediciones de nanofricción y propiedades mecánicas empleando puntas de silicio. En donde se pudo determinar por medio de un estudio preliminar, sobre los cambios de fricción que existen entre los glóbulos rojos de un paciente fumador, contra un paciente no-fumador, observándose que existía menos fricción en el paciente fumador que en el no-fumador, demostrando con esto la capacidad de la técnica para determinar las características superficie celular.

El AFM alcanza una resolución sub-nanométrica y además requiere de solo una preparación de muestra simple, sin la necesidad de recubrimientos conductores. El AFM es una técnica versátil, y podemos aprovechar sus distintos modos de operación (contacto, oscilante o tapping, etc), para extraer valiosa información. En el campo

información extra y detecta variaciones directamente en viscoelasticidad e indirectamente en composición, adhesión y fricción. A partir del modo de espectroscopia de fuerzas se puede obtener información sobre la adhesión, la dureza y la deformación plástica que experimenta la muestra al estar sometido a una fuerza. El AFM posibilita trabajar en todo tipo de ambientes: Al aire, en líquidos y diversas atmósferas (inerte, oxidante, reductora, etc.). El AFM posibilita el estudio de la morfología del de las células finalmente.

PERSPECTIVAS

Las perspectivas del trabajo futuro contemplan medir cuantitativamente por AFAM, y obtener valores precisos de módulos de elasticidad puntuales. Además de poder observar en tiempo real lo que pasa con las células en presencia de un agente altamente toxico a niveles nanométricos. Se pretende funcionalizar puntas del AFM con nanotubos de carbono para alcanzar mayor resolución y obtener mejores resultados de los modos convencionales y modificados del AFM.

Las puntas utilizadas fueron varias, van desde puntas de nitruro de silicio, silicio y puntas recubiertas de carbono tipo diamante. Las siguientes imágenes muestran las características y morfología de cada una de ellas.

Las puntas de diamante fueron utilizadas en las mediciones de AFAM, TAPPING y en CONTACTO en medio seco para células que van desde glóbulos rojo, serie blanca y células infectadas con malaria.

Las condiciones de las medidas se hicieron buscando condiciones similares ya se de de humedad y temperatura, estos para metros fueron de 30° C y 20 % de Humedad.

Puntas para modo oscilante o tapping y de contacto en aire.

	value	range
Resonant Frequency	300 kHz	± 100 kHz
Force Constant	40 N/m	20 N/m to 75 N/m
Length	125 μm	± 10 μm
Mean Width	30 μm	± 5 μm
Thickness	4 μm	± 1 μm
Tip Height	17 μm	± 2 μm
Tip Set back	15 μm	± 5 μm

Tip Radius < 15 nm

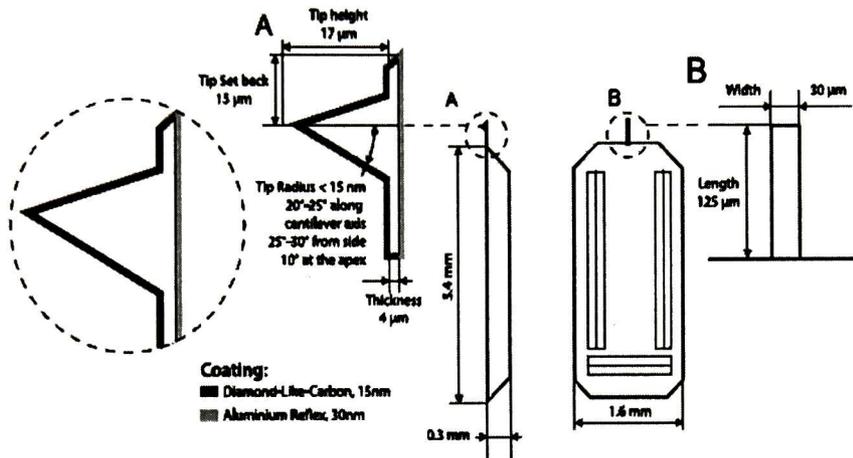
Reflex Diamond-Like-Carbon coating on tip
Coating side of the cantilever, 15nm thick;

Aluminum coating on detector side of the cantilever, 30 nm thick;

Half Cone 20°-25° along cantilever axis

Angle 25°-30° from side

10° at the apex



	value	range
Resonant Frequency	300 kHz	± 100 kHz
Force Constant	40 N/m	20 N/m to 75 N/m
Length	125 μm	± 10 μm
Mean Width	30 μm	± 5 μm
Thickness	4 μm	± 1 μm
Tip Height	17 μm	± 2 μm
Tip Set back	15 μm	± 5 μm
Tip Radius	< 15 nm	

Reflex Coating Diamond-Like-Carbon coating on tip side of the cantilever, 15nm thick;

**Aluminum coating on detector side of
the cantilever, 30 nm thick;**

Half Cone 20°-25° along cantilever axis

Angle 25°-30° from side

10° at the apex

	range	
value		
Resonant Frequency	150 kHz	± 75 kHz
Force Constant	5 N/m	1.5 N/m to 15 N/m
Length	125 μm	± 10 μm
Mean Width	25 μm	± 5 μm
Thickness	2.1 μm	± 1 μm
Tip Height	17 μm	± 2 μm
Tip Set back	15 μm	± 5 μm

Tip Radius < 15 nm

Reflex Diamond-Like-Carbon coating on tip

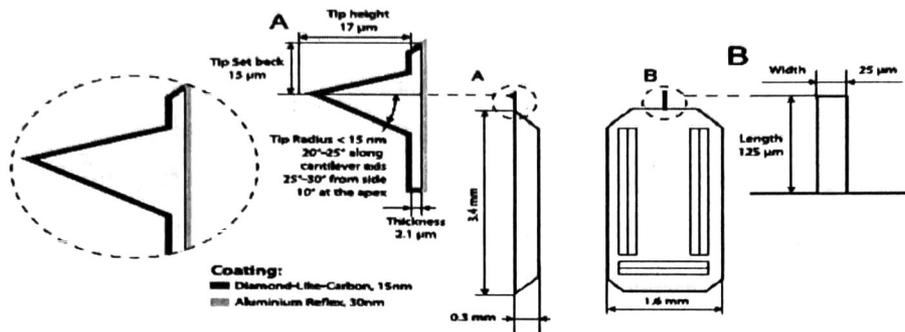
Coating side of the cantilever, 15nm thick;

**Aluminum coating on detector side of the
cantilever, 30 nm thick;**

Half Cone 20°-25° along cantilever axis

Angle 25°-30° from side

10° at the apex



Para las medidas en líquido se utilizaron puntas triangulares de silicio y nitruro de silicio con las especificaciones descritas en la siguiente tabla. Se tomaron de las especificaciones del fabricante.

<i>Modelo</i>	<i>RTESP</i>	<i>NP</i>	<i>OTR4-10</i>
Material	Silicio	Nitruro de silicio	Nitruro de silicio
Cte. elástica (K)	40 N/m	(0.58; 0.12; 0.32; 0.06) N/m	(0.08 ; 0.02) N/m
Frec. de resonancia	300 kHz	(57; 20; 56; 18) kHz	(34 :11) kHz
Radio de curvatura	8 nm	20 nm	15 nm
Longitud	125 μm	(120; 205; 120; 205) μm	(100 y 200) μm
Forma	Rectangular	Triangular	Triangular
Cobertura	No tiene	Oro	Oro
Modo de operación	TM en aire	CM en aire. CM y TM en solución. FS.	CM y TM en solución. FS

Tanto la microscopía como las técnicas de cultivo celular han permitido desarrollar enormemente el campo de la biología celular. La primera porque permite ver a las células en su contexto global, pero también localizar sus constituyentes (organelos, proteínas, ácidos nucleicos, etc...). La segunda, porque después de aislar y cultivar una población celular particular, se pueden estudiar sus propiedades. Cada tipo celular requiere condiciones de cultivo particulares. Ellas dependen de la especie y del estado de desarrollo del individuo del cual se obtuvieron y de las condiciones de cultivo propiamente tales (medio de cultivo con suero fetal bovino, medios de cultivo definidos, dependencia de capas alimentadoras, requerimientos de temperatura, CO₂, matrices que permiten su adhesión, etc...). En su gran mayoría estas condiciones se determinan en forma empírica. Por su parte, el tiempo que una célula se mantiene en cultivo depende de la capacidad proliferativa *in vitro* de estas células. Así, por ejemplo, las células transformadas ya sea porque fueron inmortalizadas por alteraciones genéticas o porque derivan de tumores, pueden mantenerse por meses e incluso años en cultivo. Sin embargo, inevitablemente pierden algunas propiedades.

Las células se colocan en unos pocillos de diámetro determinado, en la siguiente tabla se muestran las características de estos contenedores.

Placas multipocillo (multiwell-plates)

Nombre común	Pocillos	Diámetro	Area/pocillo	Area /placa
P96	96	8mm	0.5 cm ²	48 cm ²
P48	48	11mm	1 cm ²	48 cm ²
P24	24	16mm	2 cm ²	48 cm ²
P12	12	22mm	4 cm ²	48 cm ²
P6 *	6	35 mm	10 cm ²	60 cm ²

MEDIO DE CULTIVO (DMEM COMPLETO): DMEM suplementado con suero de ternera al 10%, glutamina 2mM, antibióticos (100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina) y aa no esenciales.

INACTIVACIÓN de proteínas del complemento del suero ("des-complementación"): Descongelar una botella de suero a 37oC, aumentar entonces la temperatura del baño (con la botella dentro) hasta 56oC, incubar a esta temperatura 45min, enfriar la botella en baño de hielo y agua, filtrar (opcional, aunque no recomendable), distribuir en alícuotas (25-50 ml) y guardar a -20oC. Para preparar medio de cultivo, usar una alícuota recién descongelada.

TEMPERATURA de los medios:

Los medios y soluciones que entren en contacto con las células han de estar preferiblemente a 37oC (o, como muy bajo, temperatura ambiente), para no alterar el metabolismo celular. Siempre desinfectar con etanol las botellas que pasen por el baño antes de trabajar con ellas. ALMACENAMIENTO de distintos componentes de medios de cultivo, y otros medios/reactivos. A 4oC, stock DMEM, PBS, PBS/EDTA, DMEM completo, suero inactivado con DMSO A -20oC, suero inactivado, tripsina/EDTA, stocks de tripsina, glutamina, antibióticos, aa.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Gerad J. Tortora, Sandra Grabowsky, Principios de anatomía y fisiología;; Oxford university press,2002.
- [2] Felix Rico Camps, Study of viscoelasticity and adhesion of human alveolar epithelial cells by atomic force microscopy The importance of probe geometry, tesis doctoral, 2005.
- [3] Petri P. Lehenkari, Guillaume T. Charras, Stephen A. Nesbitt and Mike A. Horton, New technologies in scanning probe microscopy for studying molecular interactions in cells, review in molecular medicine,2000
- [4] J. A. Dvorak. The application of atomic force microscopy to the study of living vertebrate cells in culture. *Methods*, 29(1):86–96, 2003.
- [5] J. Alcaraz, L. Buscemi, M. Grabulosa, X. Trepata, B. Fabry, R. Farre, and D. Navajas. Microrheology of human lung epithelial cells measured by atomic force microscopy, *Biophys.J.*, , 2003.
- [6] R. E. Mahaffy, S. Park, E. Gerde, J. Kas, and C. K. Shih. Quantitative analysis of the viscoelastic properties of thin regions of fibroblasts using atomic force microscopy. *Biophys.J.*, 86(3):1777–1793, 2004.
- [7] R.Lal, M.F.Arnsdorf, Multidimensional atomic force microscopy for drug discovery: A versatile tool for defining targets, designing therapeutics and monitoring their efficacy,ELSIEVER,2010
- [8] B. A. Smith, B. Tolloczko, J. G. Martin, and P. Grutter. Probing the viscoelastic behavior of cultured airway smooth muscle cells with atomic force microscopy: stiffening induced by contractile agonist. *Biophys.J.*, 88(4):2994–3007, 2005.
- [9] X. Trepata, M. Grabulosa, F. Puig, G. N. Maksym, D. Navajas, and R. Farre. Viscoelasticity of human alveolar epithelial cells subjected to stretch. *Am.J.Physiol.-Lung Cell.Mol.Physiol.*, 2004.
- [10] Torunn Berge, E. Lucy Haken, Michael J. Waring, and Robert M. Henderson, The binding mode of the DNA bisintercalator luzopeptin investigated using atomic force microscopy, Journal of Structural Biology, 2003
- [11] J. Domke, S. Dannohl,W. J. Parak, O.Muller,W. K. Aicher, and M. Radmacher. Substrate dependent differences in morphology and elasticity of living osteoblasts

investigated by atomic force microscopy. *Colloids Surf.B Biointerfaces*, 19(4):367–379, 2000.

[12] Victor J. Morris, Andrew R. Kirby, Atomic Force Microscopy for Biologist, 2^a Edicion;Imperial College Press; 2010.

[13] E. K. Dimitriadis, F. Horkay, J. Maresca, B. Kachar, and R. S. Chadwick. Determination of elastic moduli of thin layers of soft material using the atomic force microscope. *Biophys.J.* , 2002.

[14] B. Fabry, G. N.Maksym, J. P. Butler, M. Glogauer, D. Navajas, N. A. Taback, E. J.Millet, and J. J. Fredberg. Time scale and other invariants of integrative mechanical behavior in living cells. *Phys.Rev.E*, 2003.

[15] Martin Stolz, Functional analysis of biological matter across dimensions by atomic force microscopy (AFM): from tissues to molecules and, ultimately atoms, tesis para obtener el grado de doctor, universidad Basel. 2004

[16] Ida Dulin´ska a,b, Marta Targosz a, Wojciech Strojny c, Maygorzata, Lekka b,*, Pawey Czuba a, Walentyna Balwierz c, Marek Szymon´ski, Stiffness of normal and pathological erythrocytes studied by means of atomic force microscopy, ELSEIVER, 2005.

[17] C. Rotsch and M. Radmacher. Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study. *Biophys.J.*, 78:520–535, 2000.

[18] Lodish,Berck,Kaiser, W.H Freeman, Molecular Cell Biology, 6^a edicion, USA. 2007

[19] X. Trepate, M. Grabulosa, L. Buscemi, F. Rico, R. Farre, and D. Navajas. Thrombin and histamine induce stiffening of alveolar epithelial cells. *J.Appl.Physiol*, , 2005.

[20] D. Stamenovic. Microtubules may harden or soften cells, depending of the extent of cell distension. *J.Biomech.*, 38(8):1728–1732, 2005.

[21] R. E. Mahaffy, S. Park, E. Gerde, J. Kas, and C. K. Shih. Quantitative analysis of the viscoelastic properties of thin regions of fibroblasts using atomic force microscopy.*Biophys.J.* 2004.

[22] Bhanu P. Jena,J. K. Heinrich Hörber, Atomic force microscopy in cell biology , capitulo 4, 1996

[23] J.W.Weisel,H Shuman and R.I.Litvinov,Protein-protein unbinding induced by

forces: single-molecule studies, ELSEVIER, 2003

[24] H.K. Blackey, G.H. Sanders, M.C. Davies, C.J. Roberts, In-situ Atomic Force Microscopy Study of β -Amyloid Fibrillization, JOURNAL MOLECULAR BIOLOGY, 2000

[25] A.A. Elena, Caracterización de la entrada de Ca^{2+} capacitativa en células trabiculares, Tesis Doctoral, 2007

[26] H. Enrique, Prácticas de Histología, FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO, ISBN: 978-84-690-7712-2, 2009.

[27] Bushan editor, Handbook of nanotechnology Springer.

[28] F.H.A. Luis, manufactura y análisis numérico de sistemas-micro-electro-mecánicos (MEMS), Tesis Doctoral, 2007.

[29] José María Súnico, Nano-Tecnología y Observación Biológica, Universidad de Madrid, 2005.

[30] Daniel J.M. Müller, Harald Janovjak, Tiina Lehto, Lars Kuerschner, Kurt Anderson, Observing structure, function and assembly of single proteins by AFM, ELSEVIER, 2002.

[31] Yurii G. Kuznetsov, Sarah Daijogo, Jiashu Zhou, Bert L. Semler and A. McPherson, Atomic Force Microscopy Analysis of Icosahedral Virus RNA, ELSEVIER, 2005.

[32] Claudio Rivetti, Simone Codeluppi, Giorgio Diecia and Carlos Bustamante, Visualizing RNA Extrusion and DNA Wrapping in Transcription Elongation Complexes of Bacterial and Eukaryotic RNA Polymerases, J. Mol. Biol., 2003.

[33] Daniel J. Müller, Wolfgang Baumeister, and Andreas Engel, Controlled unzipping of a bacterial surface layer with atomic force microscopy, PNAS, 2000.

[34] Arthur C. Guyton, John Hall, Tratado de fisiología médica, McGraw-Hill International, 2001, 10ª Edición.

[35] Carlos J. M. Vera Hernández M.D., Bases moleculares de la biomecánica de la membrana eritrocitaria y sus potenciales aplicaciones biomédicas

[36] Minjun, Ning Xi, Nanomedicine a systems engineering approach, Pan Stanford

publishing,2009, USA.

[37] T. Pradeep , Nano: the essentials Understanding nanoscience and nanotechnology; McGraw-Hill, 2007, USA

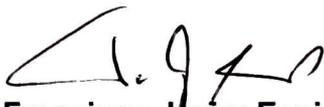
[38] Hans-eckhardt Schaefer, Nanoscience: the science of small in physics, engineering, chemistry, biology, and medicine, Springer; 2010.

[39] Ricardo Garcia, Amplitude modulation atomic force microscopy, Wiley-VCH.

[40] Ingolf Sack, Bernd Beierbach, Uwe Hamhaber, Dieter Klatt¹ and Jürgen Braun Non-invasive measurement of brain viscoelasticity using magnetic resonance, elastography;; NMR IN BIOMEDICINE; 2007.

[41] McKenzie Shirlyn. B. Hematologia clinica. 2a. Mexico. Manual Moderno. 2000 Panamericana.

EL JURADO DESIGNADO POR LA UNIDAD QUERÉTARO DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, APROBÓ LA TESIS DE MAESTRÍA DEL C. ELEAZAR LEÓN SARABIA TITULADA: MICROSCOPIA DE BARRIDO DE PUNTA DE PRUEBA APLICADO AL ESTUDIO DE CÉLULAS, FIRMAN ALCALCE DE COM N ACUERDO LOS INTEGRANTES DE DICHO JURADO, EN LA CIUDAD DE QUERÉTARO, QRO., A LOS VEINTE DIAS DEL MES DE ENERO DEL 2012.



Dr. Francisco Javier Espinoza Beltrán



Dra. LIA ISABEL PIETRASANTA
CENTRO DE INVESTIGACIONES AVANZADAS

Dra. Lía Isabel Pietrasanta



Dr. Gabriel Luna Bárcenas



Dr. Juan Muñoz Saldaña



CINVESTAV - IPN
Biblioteca Central



SSIT0010817