



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE FÍSICA Y MATEMÁTICAS

Un modelo fraccional para el estudio de las propiedades visco-elásticas de células cancerosas mediante microscopía de fuerza atómica

TESIS

que para obtener el grado de:
Doctora en Ciencias en el área de Física

Presenta:

Maricela RODRÍGUEZ NIETO

Asesores:

Dr. Gabriel Espinosa Pérez

Dr. Jorge Luis Menchaca Arredondo

febrero de 2020
Morelia, Mich.



Dedicatoria

*A mis padres
por confiar confiar cada día en mí*

Agradecimientos

A mis hijas Avril y Julia por los buenos y malos ratos y su cariño incondicional.

A Alan por aguantar mis malos ratos.

A mis padres y hermanos por su apoyo y confianza sin reservas.

A Erika y Gus por apoyarme en todo momento y ser como unos padres para mis hijas.

A Marcelina, Emilio, Sebastian y Jorge por ser una familia para mí.

A la familia Meza y la familia Chávez, por recibirme cálidamente en su familia.

A Anita y Liz por todos los momentos compartidos y por hacer llevaderos esos largos días de intenso calor.

A Marco, porque después de un difícil día de trabajo con unos tostitos todo mejoraba.

A Jeanine, Armando, Juan de Dios, Bedolla y en especial a Luis Méndez y Alberto Luviano, por hacer más ameno el trabajo.

A los doctores que contribuyeron a mi formación, en especial a la doctora Nabanita Dasgupta y los doctores Pablo Martínez, Ricardo Becerril, Jorge Luis Menchaca y Gabriel Espinosa por sus oportunas observaciones que permitieron enriquecer este trabajo.

A la Dra. María Porfiria Barrón jefa del Laboratorio de Biología Celular de la Facultad de ciencias Biológicas, la Dra. Magda Iracheta, la Dra. Diana Zarate Triviño y a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla del departamento de Inmunología y virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Al CONACyT por los proyectos de ciencia básica 169319 y 220331.

Al apoyo de la red de materia Condensada Blanda.

Al CONACyT por la beca otorgada para la elaboración de este proyecto de tesis.

Contenido

Resumen	VII
1. Introducción	1
1.1. La célula	1
1.2. La física y la célula	1
1.3. La mecánica celular en el estudio de enfermedades	2
1.4. La mecánica de la célula y el cáncer	3
1.5. Técnicas de estudio en la mecánica celular	3
1.6. El AFM en el estudio de la mecánica celular	4
1.7. Módulo de Young mediante AFM	4
1.8. Visco-elasticidad en células cancerosas	4
1.9. Organización de la tesis	5
2. Marco Teórico	6
2.1. Materiales sólidos, fluidos y visco-elásticos	6
2.2. Mecánica de contacto	11
2.2.1. Modelos Elásticos	12
2.2.2. Modelos visco-elásticos	14
3. Materiales y métodos experimentales	25
3.1. Microscopio de Fuerza Atómica (AFM)	25

3.1.1.	Principio de operación de un AFM	25
3.1.2.	Modos de operación de un AFM	27
3.2.	Análisis de imágenes: Rugosidad	29
3.3.	Lineas celulares	30
3.3.1.	Cultivo celular	31
4.	Metodologías para medir propiedades visco-elásticas de células cancerosas	32
4.1.	Resumen	32
4.2.	Introducción	32
4.2.1.	Metodología usando curvas de fuerza vs. distancia (Metodología de Ting)	33
4.2.2.	Metodología usando curvas de relajación (Metodología de Darling) . .	34
4.2.3.	Módulo de relajación	35
4.2.4.	Metodología experimental	35
4.2.5.	Análisis estadístico	36
4.3.	Fuerza máxima y módulo de Young	37
4.4.	Parámetros viscoelásticos obtenidos con diferentes metodologías experimentales	38
4.4.1.	Parámetro E_0	38
4.4.2.	Parámetro E_1	40
4.4.3.	Parámetro τ	40
4.4.4.	Parámetro α	41
4.4.5.	Ajustes	42
4.4.6.	Observaciones generales	42
4.5.	Conclusiones	45
5.	Efecto de la doxorubicina en las propiedades mecánicas de HT-29	47
5.1.	Resumen	47
5.2.	Introducción	47

5.3.	Efectos en la morfología de la membrana	48
5.4.	Módulo de Young	49
5.5.	Viscoelasticidad	52
5.5.1.	Modelos mecánicos: Relajación de esfuerzos	52
5.5.2.	Comportamiento visco-elástico	55
5.5.3.	Comparación entre modelos visco-elásticos	58
5.6.	Conclusión	59
6.	Propiedades mecánicas de células de osteosarcoma durante el proceso de re- generación de tejido óseo	64
6.1.	Resumen	64
6.2.	Introducción	64
6.3.	Parámetros visco-elásticos como función de la fuerza aplicada en células de osteosarcoma.	68
6.3.1.	Profundidad de indentación como función de la fuerza	69
6.3.2.	Parámetro E_0 como función de la fuerza	69
6.3.3.	Parámetro E_1 como función de la fuerza	70
6.3.4.	Parámetro τ como función de la fuerza	72
6.3.5.	Parámetro α como función de la fuerza	73
6.4.	Parámetros visco-elásticos como función de la fuerza aplicada en células de osteosarcoma + Ha + Ag.	75
6.4.1.	Parámetro E_0 como función de la fuerza	75
6.4.2.	Parámetro E_1 como función de la fuerza	77
6.4.3.	Parámetro τ como función de la fuerza	77
6.4.4.	Parámetro α como función de la fuerza	80
6.5.	Efecto de hidroxiapatita y partículas de plata en células osteosarcoma	80
6.5.1.	Parámetro E_0	81
6.5.2.	Parámetro E_1	82

6.5.3.	Parámetro τ	82
6.5.4.	Parámetro α	82
6.5.5.	Módulo de Young	85
6.6.	Efecto del tiempo de incubación en osteosarcoma	86
6.6.1.	Observaciones	86
6.7.	Conclusiones	87
7.	Conclusiones y perspectivas	89
7.1.	Conclusiones	89
7.2.	Perspectivas	90
	Apéndice	92
	A. Función de Mittag-Leffler en Python	92
	Bibliografía	95

Resumen

Cuando un órgano de nuestro cuerpo no funciona de manera correcta es debido a que parte del tejido está dañado o bien, existe algún tumor. Estos daños se ven reflejados en las propiedades mecánicas de las células que conforman estos tejidos. Por ello, cuantificar y entender los cambios que sufren las células en sus propiedades mecánicas nos puede ayudar a comprender como afecta determinada enfermedad a los tejidos u órganos de un sistema biológico.

Hace mas de una década que la técnica de microscopia de fuerza atómica se ha utilizado para observar materiales biológicos, como las bacterias y células, además de sus componentes como son microtúbulos, proteínas, etc. La ventaja de usar AFM sobre otras técnicas para observar microorganismos vivos es que la medición se hacen *In situ*, lo cual permite caracterizar el sistema biológico en un estado que se asemeje a su ambiente natural.

Los estudios en células mediante AFM se centraban en la morfología. Pero recientemente ha crecido el interés por estudiar sus propiedades mecánicas. Debido a que están estrechamente relacionadas con la salud de las mismas y con procesos como adhesión, la motilidad y proliferación celular, solo por mencionar algunos procesos. El estudio de una célula simple nos puede mostrar el origen de alguna enfermedad o un mal funcionamiento en general de un tejido, que a su vez se ve reflejado en una enfermedad en el complejo cuerpo humano.

Desde el punto de vista mecánico, un modelo elástico para la célula no describe correctamente el comportamiento de la misma. A pesar de esto, muchos estudios se basan en un modelo de aproximación tipo Hertz, donde su principal hipótesis parte de que el sistema a estudiar es puramente elástico. Lo anterior ha sido parte de la motivación de este trabajo.

Mas allá de los modelos elásticos existen modelos visco-elásticos para la descripción del comportamiento celular. Estos surgen de la combinación de dos elementos principales, un resorte y un amortiguador. De la combinación de estos elementos surge una gran variedad de modelos que permiten estudiar las propiedades visco-elásticas. La ecuación de cada modelo depende de la forma en que se organicen los resortes y amortiguadores.

En este trabajo estudiamos las propiedades visco-elásticas de células cancerosas usando la técnica de microscopía de fuerza atómica. Para esto, empleamos modelos mecánicos conformados por resortes y amortiguadores (modelo de sólido lineal estándar y generalizado de Maxwell) y además incluimos modelos formados por resortes y elementos fraccionales (modelo de ley de potencias y modelo fraccional de Zener).

Las líneas celulares que estudiamos fueron: MDA-MB-231 (cáncer de mama), DU-145 (cáncer de próstata), HT-29 (cáncer de colon) y osteosarcoma (cáncer de hueso). El modelo fraccional de Zener resultó ser buen candidato para describir las propiedades visco-elásticas de células cancerosas.

Palabras clave: visco-elasticidad, modelo fraccional de Zener, células cancerosas, curvas de relajación, AFM.

Abstract

When an organ of our body does not work properly it is because part of the tissue is damaged or there is a tumor. These damages are reflected in the mechanical properties of the cells that constitute these tissues. Therefore, quantifying and understanding the changes that cells undergo in their mechanical properties can help us comprehend how certain disease affects the tissues or organs of a biological system.

For more than a decade, the atomic force microscopy technique has been used to observe biological materials, such as bacteria and cells, in addition to their components such as microtubules, proteins, etc. The advantage of using AFM over other techniques to observe live microorganisms is that the measurement is done *in situ*, which allows to characterize the biological system in a state that resembles its natural environment.

AFM cell studies focused on morphology. But recently interest in studying its mechanical properties has grown. Because they are closely related to their health and to processes such as adhesion, motility and cell proliferation, just to mention a few processes. The study of a simple cell can show us the origin of some disease or a malfunction in general of a tissue, which in turn is reflected in a disease in the complex human body.

From the mechanical point of view, an elastic model for the cell does not correctly describe its behavior. Despite this, many studies are based on a Hertz type approximation model, where its main hypothesis is that the system to be studied is purely elastic. The above has been part of the motivation of this work.

Beyond the elastic models there are visco-elastic models for the description of cellular behavior. These arise from the combination of two main elements, a spring and a dashpot. From the combination of these elements a great variety of models arises that allow to study the visco-elastic properties. The equation of each model depends on the way the springs and dashpots are organized.

We study the visco-elastic properties of cancer cells using the atomic force microscopy technique. For this, we use mechanical models made up of springs and dashpot (Maxwell's standard and generalized linear solid model) and we also include models formed by springs and fractional elements (power law model and Zener fractional model).

The cell lines we studied were: MDA-MB-231 (breast cancer), DU-145 (prostate cancer), HT-29 (colon cancer) and osteosarcoma (bone cancer). Zener's fractional model proved to be a good candidate to describe the visco-elastic properties of cancer cells.

Keywords: viscoelasticity, fractional model, cancer cells, relaxation curves, AFM

Capítulo 1

Introducción

1.1. La célula

La célula es la unidad estructural y funcional de los seres vivos [1]. El cuerpo humano está constituido por millones de células. Las células están formadas principalmente por el núcleo, la membrana plasmática, el citoplasma y el citoesqueleto **1.1**. A su vez, el citoesqueleto está formado mayormente por filamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos. La forma que adoptan las células es muy diversa y depende de la organización del citoesqueleto [2].

Las células se agrupan para formar tejidos, los tejidos se unen para formar órganos y el conjunto de órganos constituye un aparato ó un sistema. Los sistemas están formados por órganos homogéneos, es decir, poseen un mismo tipo de tejido y realizan una función determinada, por ejemplo, el sistema óseo, el muscular y el nervioso. Los aparatos están formados por órganos heterogéneos que se coordinan para realizar una función general del organismo, por ejemplo, el aparato digestivo, el aparato reproductor y el aparato respiratorio.

Cada célula posee propiedades físicas y estructurales que le permiten llevar a cabo sus funciones, cualquier alteración en sus propiedades podría producir un cambio en los tejidos, y por tanto, en el órgano formado por esos tejidos, desencadenando enfermedades.

1.2. La física y la célula

El estudio de los fenómenos biológicos se concentra en aspectos como la expresión de los genes, la producción de metabolitos, las interacciones entre diferentes tipos de células y organismos [2]. Las principales disciplinas encargadas de estos estudios son biología molecular, citología y genética. Sin embargo, cada vez es más frecuente el estudio de los fenómenos

*

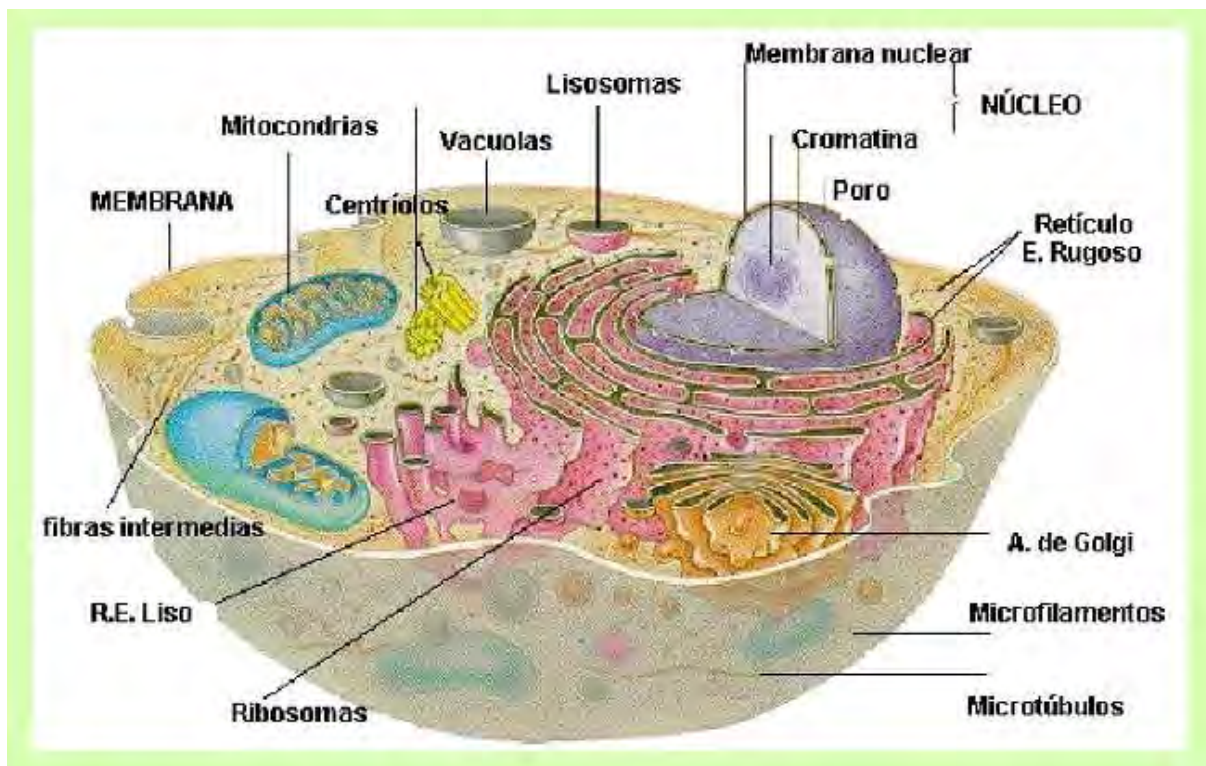


Figura 1.1: Representación esquemática de una célula eucariota con las distintas partes que la conforman.

biológicos desde el punto de vista de la física. Estudios en la mecánica celular reconocen, cada vez más, a las fuerzas como los principales reguladores de la estructura y función celular [3, 4, 5].

Aspectos como motilidad, reproducción, crecimiento, migración y diferenciación celular dependen de las propiedades mecánicas de las células [6, 7, 8, 9, 10]. Así mismo, las alteraciones en las células, producidas por enfermedades, se ven reflejadas en las propiedades mecánicas de las células [11, 12]. El estudio de la mecánica celular puede proporcionar una mejor comprensión de las enfermedades, así como su evolución y los efectos de los tratamientos [13, 14, 15].

1.3. La mecánica celular en el estudio de enfermedades

El estudio de las propiedades mecánicas de las células o tejidos se han realizado en enfermedades como el asma, la malaria, la anemia, el cáncer, epilepsia e incluso el alzheimer [16, 17, 18]. Por ejemplo, los glóbulos rojos, caracterizados por ser altamente deformables, experimentan cambios notables en su rigidez y citoadherencia cuando son infectados por el parásito de la malaria [19]. Esta rigidez aumenta con el progreso de la enfermedad [20]. Los glóbulos rojos con anemia falciforme también muestran aumento en la rigidez [21]. Así mismo, las neuronas del hipocampo de ratones con epilepsia son más rígidas que las de los ratones sanos.

En células inmunológicas, se ha identificado que la activación celular viene acompañada de cambios en la respuesta mecánica de las células [22].

1.4. La mecánica de la célula y el cáncer

Estudios en sobre las propiedades mecánicas de las células han mostrado que las células cancerosas son más suaves que su contraparte normal [8]. Por esta característica se ha propuesto usar la rigidez de las células como marcador para diagnóstico de cáncer [18, 23, 24].

Por otro lado, la disminución en la rigidez favorece los procesos como la metástasis. Durante este proceso, las células cancerosas se diseminan a otros tejidos por el torrente sanguíneo y los nódulos linfáticos. Por tanto, también se ha propuesto las propiedades mecánicas como un marcador de los diferentes grados del cáncer [25, 26, 27, 28, 29].

Más aún, algunas drogas usadas en los tratamientos contra el cáncer son despolimerizadores de filamentos de actina o microtúbulos, componentes del citoesqueleto, que es el encargado de proporcionar soporte y forma a la célula además de contribuir en gran parte a la rigidez de la célula [30, 31]. Estas afectaciones se reflejan en cambios en las propiedades mecánicas de las células [32, 33]. Es decir, las propiedades mecánicas de las células pueden ser una herramienta para evaluar los tratamientos contra el cáncer.

1.5. Técnicas de estudio en la mecánica celular

Existen diferentes técnicas que permiten investigar las propiedades mecánicas de estructuras biológicas como el ADN, los virus, las células, tejidos . Entre estas técnicas se encuentran aspiración por micropipeta [34], pinzas ópticas [35], microscopía de fuerza atómica [36], entre otras.

La técnica de pinzas ópticas permite atrapar y manipular objetos dieléctricos microscópicos con un láser enfocado sobre una partícula dieléctrica.

La técnica de aspiración por micropipeta consiste en succionar una célula a través de una micropipeta de radio que va desde $1 \mu\text{m}$ hasta $10 \mu\text{m}$. Con una cámara se graba el cambio de la forma que sufrió la célula para evaluar las propiedades mecánicas.

El microscopio de fuerza atómica (AFM), utiliza una punta colocada al final de un cantilever para realizar las mediciones. La punta se acerca y se aleja de la muestra con un movimiento vertical dirigido por un piezoeléctrico conectado a un controlador. Puede operar en distintos modos, entre ellos están el modo de imagen y el modo de fuerza. En el modo de imagen la punta hace un barrido sobre la superficie de la muestra, obteniendo así imágenes en el plano xyz . En el modo de fuerza la punta se pone en contacto con la muestra y se realizan indentaciones.

En este proceso, el AFM graba una curva de fuerza *vs* distancia, que se usa para obtener las propiedades mecánicas. Tanto las propiedades mecánicas como las imágenes pueden hacerse *in situ*.

1.6. El AFM en el estudio de la mecánica celular

Las condiciones ambientales afectan las propiedades mecánicas de los materiales biológicos [37, 38], de aquí la importancia de poder realizar las mediciones en las muestras biológicas en sus condiciones fisiológicas. El AFM ha mostrado ser una herramienta poderosa en el estudio de material biológico porque permite realizar las mediciones en condiciones que se asemejan a las fisiológicas [15]. Con esta técnica, además de medir fuerzas o determinar la resistencia de un material a deformaciones, se puede investigar la morfología de una muestra biológica a través de la herramienta de imágenes. Con esto, podemos determinar cambios en la mecánica y en la morfología de muestras biológicas. Esta información podría ayudar a discriminar las muestras sanas de las enfermas e incluso a llevar un seguimiento del efecto de los tratamiento, ayudando así en la detección, diagnóstico y tratamiento de enfermedades.

1.7. Módulo de Young mediante AFM

Con las curvas de fuerza *vs* distancia que se obtienen en el AFM, podemos obtener el módulo de Young, medir la adhesión de la muestras, o incluso estudiar la interacción entre diferentes materiales, por ejemplo, entre una proteína y una célula.

Para calcular el módulo de Young se utiliza comúnmente el modelo de Hertz [39]. Este modelo calcula la presión que se origina en el área de contacto entre una superficie esférica (indentador esférico) y un semi-plano infinito. Conociendo la presión que se origina en determinada área podemos determinar la fuerza. Existen otros modelos que consideran otro tipo de geometrías. Por ejemplo, el modelo de Sneddon toma en cuenta el contacto entre un semi-plano infinito y un indentador cónicos[40].

1.8. Visco-elasticidad en células cancerosas

El módulo de Young describe el comportamiento de materiales puramente elásticos, sin embargo, los materiales biológicos son visco-elásticos. Por tanto, el módulo de Young es una buena aproximación para investigar los procesos biológicos pero no es suficiente.

Tener un modelo que describa de manera más completa la mecánica de la célula permitirá entender mejor los procesos que continuamente ocurren al interior y exterior de la célula.

1.9. Organización de la tesis

En esta tesis realizamos un estudio de las propiedades visco-elásticas de células cancerosas usando la técnica de microscopía de fuerza atómica. La tesis está organizada de la siguiente manera.

En el capítulo 2 hacemos una revisión sobre el concepto de visco-elasticidad. Así como los modelos mecánicos que se usan para describir los materiales visco-elásticos.

En el capítulo 3 describimos el funcionamiento del microscopio de fuerza atómica y los diferentes modos de operación. También describimos el tratamiento que se les da a los datos para realizar los análisis correspondientes.

En el capítulo 4 realizamos un análisis de algunas metodologías que se han usado para obtener las propiedades visco-elásticas de material biológico mediante la técnica de microscopía de fuerza atómica. Las líneas celulares que usamos en este análisis fueron las células de cáncer de mama, MDA-MB-231, y células de cáncer de próstata, DU-145.

En el capítulo 5 presentamos el análisis de las propiedades visco-elásticas de la línea celular de cáncer de colon HT-29. Además evaluamos los cambios en las propiedades mecánicas cuando son expuestas a doxorubicina. La doxorubicina es un fármaco usado comúnmente en el tratamiento de distintos tipos de cáncer. El análisis lo hicimos usando dos geometrías de puntas, una cónica y una esférica. Para determinar las propiedades visco-elásticas empleamos diferentes modelos mecánicos, empleados comúnmente para caracterizar la visco-elasticidad de los sistemas. Entre ellos, el modelo de sólido lineal estándar, el modelo generalizado de Maxwell y el modelo de ley de potencias. Además incluimos el análisis con el modelo del sólido lineal estándar en su forma fraccional (modelo fraccional de Zener). Este modelo fue usado por primera vez en células de cáncer de mama en [41].

En el capítulo 6 mostramos un análisis sobre las propiedades visco-elásticas de células de osteosarcoma, un tipo de cáncer de hueso, usando el modelo fraccional de Zener. Discutimos la relación que hay entre la fuerza aplicada y los parámetros visco-elásticos. Además, estudiamos los cambios que sufren los parámetros cuando hay hidroxapatita y nano-partículas de plata en el medio de cultivo.

En el capítulo 7 presentamos las conclusiones generales de este trabajo y se discuten algunas perspectivas que van mas allá de este trabajo pero es una camino que se debe seguir construyendo para tratar de comprender mas la naturaleza de los procesos biológicos a nivel de célula simple.

Capítulo 2

Marco Teórico

Existen materiales que se pueden caracterizar con una sola variable como los sólidos elásticos que presentan un comportamiento puramente elástico, o los fluidos Newtonianos que se caracterizan por ser puramente viscosos y materiales más complejos, los cuales requieren más de una variable para ser caracterizados, como los materiales visco-elásticos que poseen propiedades elásticas y viscosas. Un ejemplo de estos materiales son las células. En particular, estamos interesados en el estudio del comportamiento visco-elástico de las células, ya que los procesos celulares como la motilidad y apoptosis dependen del comportamiento mecánico [42].

En este capítulo presentamos las definiciones sobre los materiales elásticos, viscosos y visco-elásticos. Así como los modelos matemáticos que se emplean para caracterizar estos materiales.

2.1. Materiales sólidos, fluidos y visco-elásticos

Sólidos elásticos

Los materiales que regresan a su estado original después de ser deformados se denominan **sólidos elásticos**. Estos materiales no fluyen, es decir, el esfuerzo permanece constante hasta que la deformación se remueve y regresan a su forma original (Fig. 2.1a). Dicho de otra manera, un sólido elástico almacena toda la energía que se empleó para deformarlo.

Para caracterizar un sólido elástico se le aplica una deformación y se mide el esfuerzo generado. La curva resultante del esfuerzo (σ) contra la deformación (ϵ), es una línea recta a través del origen (Fig. 2.2a). La ecuación que obedecen estos materiales es la **ley de Hooke**:

$$\sigma(t) = E\epsilon(t) \quad (2.1)$$

la constante de proporcionalidad, E , representa la elasticidad del material y se denomina módulo elástico.

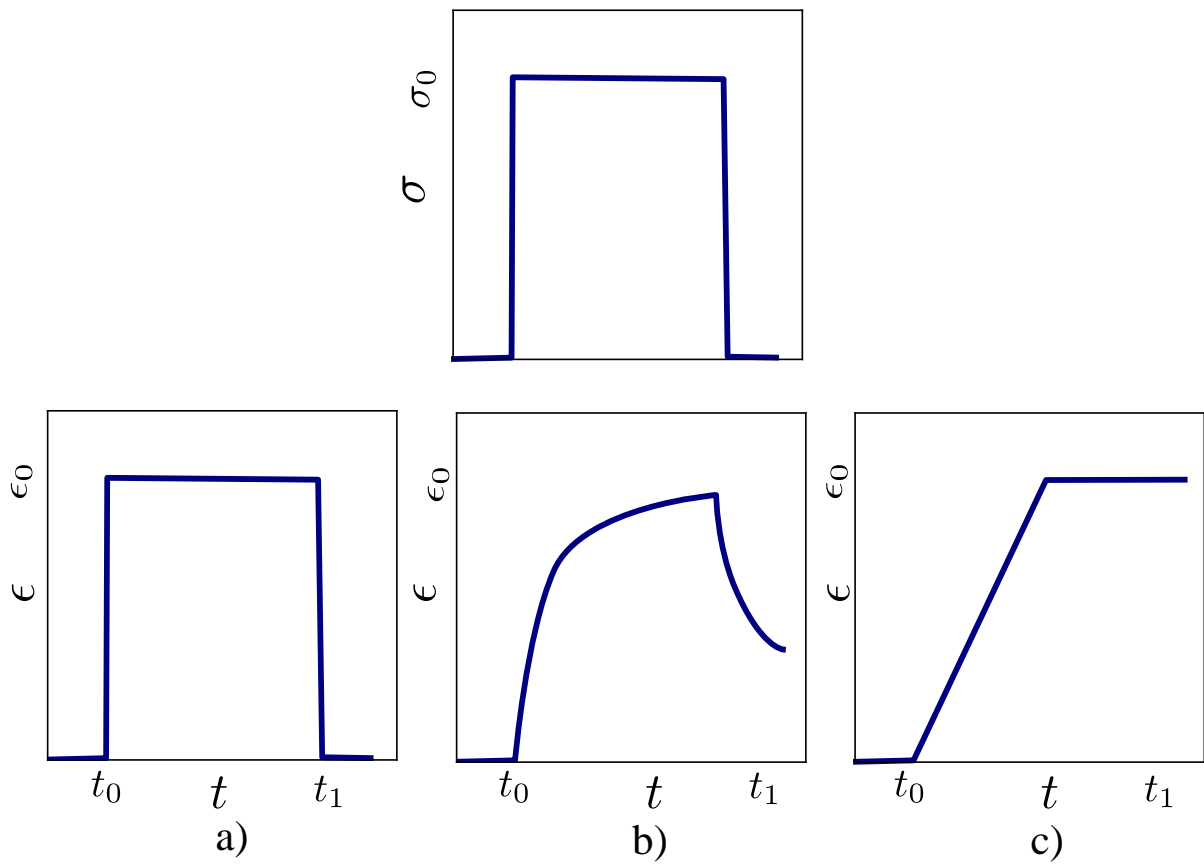


Figura 2.1: Panel inferior: Gráfica de la deformación (ϵ) que experimenta un material a lo largo del tiempo bajo un esfuerzo (σ) constante (como se muestra en el panel superior) para un: a) Sólido elástico, b) Líquido Newtoniano, c) Visco-elástico.

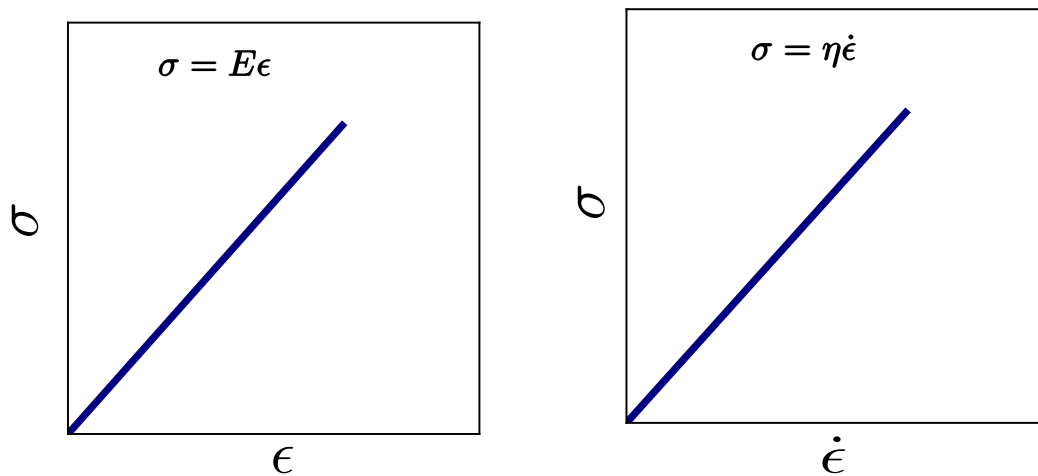


Figura 2.2: a) Gráfica del esfuerzo contra la deformación en un sólido elástico. b) Gráfica del esfuerzo contra la razón de deformación en un fluido newtoniano.

Fluidos Newtonianos

Los **fluidos Newtonianos** son materiales que no recuperan su estado original después de ser deformados (2.1b). Estos materiales disipan toda la energía que se les aplicó.

Para caracterizar estos fluidos se mide el esfuerzo generado al deformar el material con diferentes velocidades de deformación. Si la curva resultante es una línea recta entre el esfuerzo aplicado, σ , y la razón de deformación, $\dot{\epsilon}$, (Fig. 2.2) se dice que el fluido es Newtoniano. Es decir, esta gobernado por la **ley de Newton**:

$$\sigma(t) = \eta \dot{\epsilon}(t) \quad (2.2)$$

la constante de proporcionalidad, η , representa la **viscosidad** del fluido y se define como la resistencia que presentan los materiales a fluir.

Tanto los sólidos elásticos como los fluidos Newtonianos son idealizados. Sin embargo, el comportamiento de muchos sólidos se asemeja a la ley de Hooke (a deformaciones pequeñas) y el de muchos fluidos a la ley de Newton (a velocidades de deformación bajas).

Materiales visco-elásticos

Existen materiales que presentan un comportamiento intermedio entre los sólidos elásticos y los fluidos Newtonianos. Es decir, recuperan parte de su forma inicial después de ser deformados (Fig. 2.1c). Estos materiales se denominan **visco-elásticos**.

Los sólidos elásticos se caracterizan estableciendo una relación entre el esfuerzo y la deformación. Por otro lado, los fluidos Newtonianos se caracterizan estableciendo una relación entre el esfuerzo y la razón de deformación. Así mismo, para caracterizar los materiales visco-elásticos es necesario establecer una relación entre el esfuerzo, la deformación y la razón de deformación denominada **ecuación constitutiva**. En el espacio de Laplace la ecuación constitutiva es la forma:

$$\tilde{\sigma} \propto \tilde{\epsilon}, \quad (2.3)$$

donde $\tilde{\sigma}$ y $\tilde{\epsilon}$ representan el esfuerzo y la deformación respectivamente, en el espacio de Laplace.

A través de la ecuación constitutiva se pueden obtener diferentes funciones que permiten caracterizar el material. La función resultante dependerá, entre otras cosas, del tipo de prueba realizado en el material. Entre las funciones más comunes se encuentran la **función de relajación** (E_{rel}) y la **función de fluencia** (C_{crp}). También es posible caracterizar los materiales visco-elásticos con un **módulo visco-elástico** ($E^* = E' + iE''$) formado por un módulo de almacenamiento, relacionado con la elasticidad del material (E') y un módulo de pérdidas, relacionado con la viscosidad del material (E'').

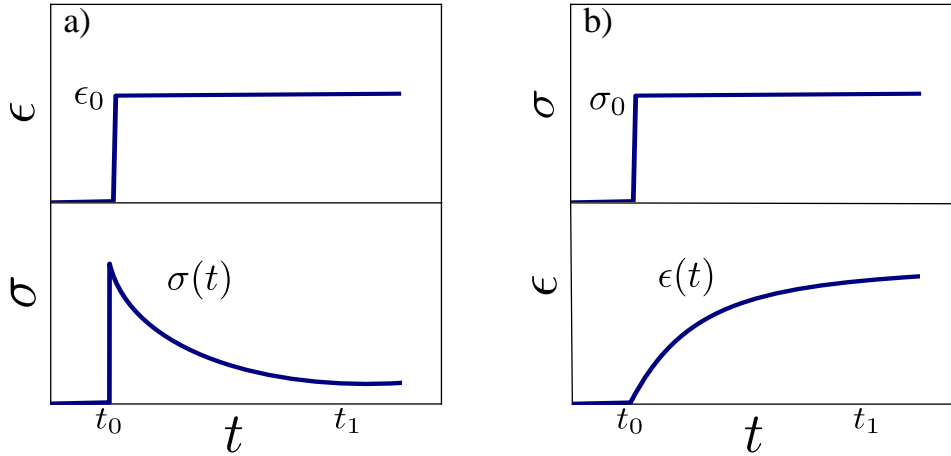


Figura 2.3: a) Panel inferior: Relajación típica a lo largo del tiempo que experimenta un material visco-elástico cuando es sometido a una deformación constante como la que se muestra en el panel superior. b) Panel inferior: Deformación típica a lo largo del tiempo que experimenta un material visco-elástico cuando se le aplica un esfuerzo constante como el que se muestra en el panel superior.

Función de Relajación

Para obtener la función de relajación se aplica una deformación constante, $\epsilon = \epsilon_0$, al material y se mide el esfuerzo resultante a lo largo del tiempo (Fig. 2.3a). La razón entre esfuerzo y deformación se denomina **función de relajación** (E_{rel}):

$$E_{rel}(t) = \frac{\sigma(t)}{\epsilon_0} \quad (2.4)$$

Para determinar la forma de la función de relajación es necesario establecer una relación entre esta función y la ecuación constitutiva. Para esto se derivará una expresión de E_{rel} en el espacio de Laplace.

Transformando la ec. (2.4) al espacio de Laplace:

$$\tilde{E}_{rel} = \mathcal{L}\left(\frac{\sigma(t)}{\epsilon_0}\right) = \frac{\tilde{\sigma}}{\epsilon_0}. \quad (2.5)$$

El símbolo \mathcal{L} es la transformación de Laplace, ($\mathcal{L}(\sigma(t)) = \tilde{\sigma}(s)$).

Por otro lado, si la deformación es constante ($\epsilon(t) = \epsilon_0$) entonces:

$$\tilde{\epsilon} = \mathcal{L}(\epsilon(t)) = \mathcal{L}(\epsilon_0) = \frac{\epsilon_0}{s}, \quad (2.6)$$

por lo tanto, en un experimento de relajación, la razón entre el esfuerzo y la deformación en el espacio de Laplace está dada por:

$$\frac{\tilde{\sigma}}{\tilde{\epsilon}} = s \frac{\tilde{\sigma}}{\epsilon_0}. \quad (2.7)$$

Comparando las ecuaciones (2.5) y (2.7) se tiene que la función de relajación, en el espacio de Laplace, se relaciona con el esfuerzo y la deformación, en el mismo espacio a través de:

$$\tilde{E}_{rel} = \frac{\tilde{\sigma}}{\tilde{\epsilon}} s^{-1}. \quad (2.8)$$

Función de fluencia

Para obtener la función de fluencia se aplica un esfuerzo uniaxial constante, $\sigma = \sigma_0$, al material y se mide la deformación resultante a lo largo del tiempo, $\epsilon(t)$ (Fig. 2.3b). A la razón entre deformación y el esfuerzo se denomina **función de fluencia**, C_{crp} :

$$C_{crp}(t) = \frac{\epsilon}{\sigma_0}. \quad (2.9)$$

Para determinar la forma de la función de fluencia es necesario establecer una relación entre esta función y la ecuación constitutiva. Para esto se derivará una expresión de C_{crp} en el espacio de Laplace.

Transformando la ec. (2.9) al espacio de Laplace:

$$\tilde{C}_{crp}(s) = \mathcal{L}\left(\frac{\epsilon(t)}{\sigma_0}\right) = \frac{\tilde{\epsilon}}{\sigma_0} \quad (2.10)$$

Por otra parte, en un experimento de fluencia, el esfuerzo es constante, por tanto,

$$\tilde{\sigma} = \mathcal{L}(\sigma) = \mathcal{L}(\sigma_0) = \frac{\sigma_0}{s}. \quad (2.11)$$

Entonces, la razón entre la deformación y el esfuerzo en el espacio de Laplace esta dada por

$$\frac{\tilde{\epsilon}}{\tilde{\sigma}} = s \frac{\tilde{\epsilon}}{\sigma_0}. \quad (2.12)$$

Comparando las ecuaciones (2.10) y (2.12) obtenemos que la función de fluencia, en el espacio de Laplace, se relaciona con el esfuerzo y la deformación, en el mismo espacio, mediante:

$$\tilde{C}_{crp} = \frac{\tilde{\epsilon}}{\tilde{\sigma}} s^{-1}. \quad (2.13)$$

Módulo visco-elástico

Para obtener el módulo visco-elástico se miden los esfuerzos (o deformaciones) que resultan de aplicar una deformación (o esfuerzo) sinusoidal (Fig. 2.4). Cuando se le aplica una deformación sinusoidal a un material visco-elástico, su respuesta de esfuerzo también será sinusoidal con la misma frecuencia angular (ω) pero con un retardo de fase (ϕ):

$$\epsilon = \epsilon_0 \sin(\omega t) \quad (2.14)$$

$$\sigma = \sigma_0 \sin(\omega t + \phi) \quad (2.15)$$

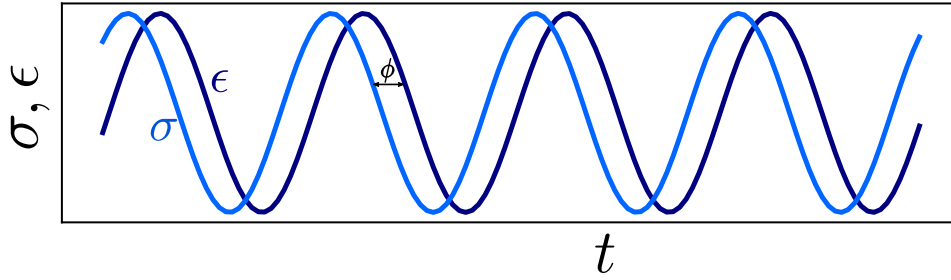


Figura 2.4: Gráfica de la deformación sinusoidal (línea azul oscuro) y la respuesta del esfuerzo (línea azul claro) cuando se deforma un material visco-elástico.

escribiendo las ecuaciones anteriores con la fórmula de Euler

$$\epsilon = \epsilon_0 e^{i\omega t} \quad (2.16)$$

$$\sigma = \sigma_0 e^{i\omega t} e^{i\phi} \quad (2.17)$$

En el régimen lineal, el esfuerzo es proporcional a la deformación

$$\sigma = E^* \epsilon \quad (2.18)$$

por tanto

$$\sigma_0 e^{i\omega t} e^{i\phi} = E^* \epsilon_0 e^{i\omega t} \quad (2.19)$$

la razón entre el esfuerzo y la deformación se define como el **módulo visco-elástico**, $E^* = E' + iE''$:

$$E^* = \frac{\sigma}{\epsilon} = \frac{\sigma_0}{\epsilon_0} e^{i\phi} = \frac{\sigma_0}{\epsilon_0} (\cos \phi + i \sin \phi) \quad (2.20)$$

La parte real, llamada módulo de almacenamiento, E' , coincide con la energía almacenada en el material. La parte imaginaria, E'' , llamada módulo de pérdidas, esta relacionada con la energía disipada por el material. Es decir:

$$E' = \left(\frac{\sigma_0}{\epsilon_0} \right) \cos(\phi), \quad (2.21)$$

$$E'' = \left(\frac{\sigma_0}{\epsilon_0} \right) \sin(\phi). \quad (2.22)$$

La razón entre el módulo de pérdidas y el módulo de almacenamiento ($\tan E''/E' = \phi$), denominada tangente de pérdidas, representa el desfase existente entre el esfuerzo y la deformación. Esta razón es un parámetro indicativo de la relación entre la energía disipada y la almacenada por el material y por ende de la viscoelasticidad del mismo.

2.2. Mecánica de contacto

La mecánica de contacto analiza los esfuerzos y deformaciones que experimentan dos cuerpos cuando entran en contacto. Con el estudio de la respuesta mecánica es posible conocer el comportamiento que tendrá dicho material cuando se modifica su estructura.

Predecir el comportamiento de un material significa determinar un **modelo matemático** que describa la relación entre dos o mas variables en un fenómeno físico. El número de variables del modelo matemático dependerá de la complejidad del sistema.

Los primeros estudios sobre los esfuerzos de contacto entre dos cuerpos elásticos sólidos se deben a Heinrich Hertz en 1882 con su trabajo titulado *On the contact of elastic solids* [39]. Hertz relacionó la deformación que sufren dos cuerpos elásticos, al entrar en contacto mutuo, con los esfuerzos que se originan en la superficie de contacto. En su teoría consideró el contacto circular de una esfera con un plano (o más general entre dos esferas), pero se ha implementado en geometrías cilíndricas, piramidales, cónicas, entre otras.

2.2.1. Modelos Elásticos

A continuación presentaremos algunos de los modelos más comunes que se usan para describir el contacto entre dos superficies elásticas con diferentes geometrías.

Modelo de Hertz

El modelo de Hertz describe el contacto entre dos superficies elásticas. Cuando una superficie esférica de radio R_1 y módulo elástico E_1 entra en contacto con otra superficie esférica de radio R_2 y módulo elástico E_2 , entonces la fuerza, F , que se produce en el área de contacto, a , esta dada por [39]

$$F(a) = \frac{4}{3} \frac{E^* a^3}{R^*}, \quad (2.23)$$

donde

$$E^* = \left(\frac{1 - \nu_1^2}{E_1} + \frac{1 - \nu_2^2}{E_2} \right)^{-1}, \quad (2.24)$$

y

$$R^* = \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)^{-1}. \quad (2.25)$$

El parámetro ν es el coeficiente de Poisson y representa la razón entre las deformaciones longitudinales y las transversales.

El área de contacto se relaciona con la profundidad de indentación, δ , a través de:

$$\delta(a) = \frac{a^2}{R^*}. \quad (2.26)$$

En el caso de un indentador esférico rígido de radio R_1 y módulo elástico E_1 que entra en contacto con una superficie de radio $R_2 \gg R_1$ y módulo elástico E_2 , con $E_1 \gg E_2$ el modelo de Hertz se expresa como

$$F(\delta) = \frac{4E_2}{3(1-\nu_2^2)} \sqrt{R_1} \delta^{3/2}. \quad (2.27)$$

Modelo de Sneddon

El modelo de Sneddon describe los esfuerzos y las deformaciones que experimenta un semi-espacio elástico cuando entra en contacto con un indentador rígido cónico y esta dado por [40]:

$$F(\delta) = \frac{2E \tan \theta}{\pi(1-\nu^2)} \delta^2. \quad (2.28)$$

En la ecuación anterior θ representa la abertura del semi-ángulo del indentador.

Los modelos de Hertz y Sneddon fueron desarrollados sin tomar en cuenta las interacciones entre las superficies tales como las fuerzas adhesivas o las interacciones de Van der Waals.

Modelo Johnson-Kendall-Roberts (JKR)

Las fuerzas adhesivas fueron consideradas por Johnson et al. en su modelo llamado JKR (Johnson-Kendall-Roberts). Considerando la energía de adhesión, γ , entre dos cuerpos se tiene que la fuerza en el área de contacto esta dada por [43]:

$$F(a) = \frac{4Ea^3}{3R(1-\nu^2)} - 2\sqrt{2\pi \frac{E\gamma a^3}{1-\nu^2}}. \quad (2.29)$$

En este caso el área de contacto se relaciona con la profundidad de indentación a través de:

$$\delta(a) = \frac{a^2}{R} - \sqrt{\frac{2\pi a\gamma}{\frac{E}{1-\nu^2}}}. \quad (2.30)$$

Modelo Derjaguin-Muller-Toporov (DMT)

Las interacciones de Van der Waals fueron incluidas por Derjaguin et al. en su modelo DMT (Derjaguin-Muller-Toporov) [44].

$$F(\delta) = \frac{4E\sqrt{R}}{3(1-\nu^2)} \delta^{3/2} - 2\pi\gamma R \quad (2.31)$$

Los modelos anteriores (Hertz, Sneddon, JKR y DMT) consideran los cuerpos como sólidos elásticos, sin embargo, estas teorías se pueden agrupar con modelos visco-elásticos para modelar materiales visco-elásticos [45].

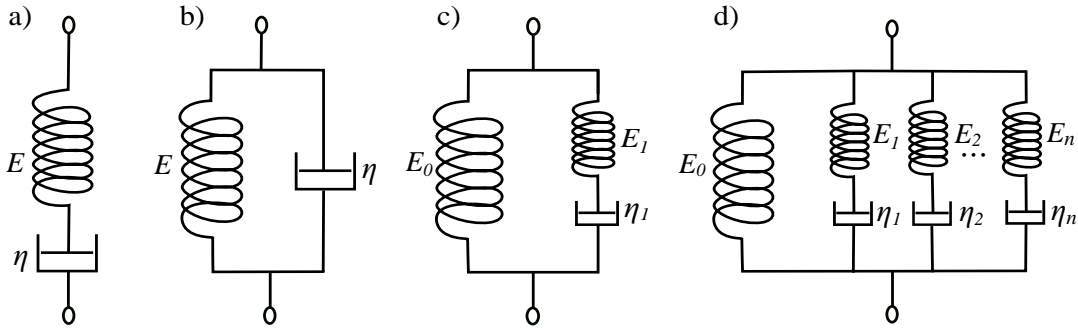


Figura 2.5: Representación esquemática de los modelos mecánicos más comunes. a) Modelo de Maxwell, b) Modelo de Kelvin-Voigt, c) Modelo SLS, d) Modelo generalizado de Maxwell

2.2.2. Modelos visco-elásticos

Los sólidos elásticos se representan mecánicamente como resortes. Por otro lado, los fluidos Newtonianos se describen mecánicamente como amortiguadores, por tanto, los materiales visco-elásticos pueden modelarse mediante circuitos formados por resortes y amortiguadores conectados en serie o paralelo, de manera análoga a los circuitos eléctricos.

Los modelos visco-elásticos más sencillos son: el modelo de Maxwell [46], y el modelo de Kelvin-Voigt [46]. Ambos están formados por un resorte y un amortiguador. En el modelo de Maxwell el resorte está conectado en serie con el amortiguador, mientras que en el modelo de Kelvin están conectados en paralelo (Figs. 2.5a,b). Estos sistemas raramente modelan bien el comportamiento de los materiales visco-elásticos a lo largo del tiempo. Una mejor descripción del comportamiento visco-elástico se puede lograr aumentando el número de elementos en el circuito.

La ecuación constitutiva y por tanto la función de relajación o la función de fluencia que describa el comportamiento del material quedará sujeta al tipo de experimento realizado, al número de elementos colocados en el circuito y a la forma en que están colocados.

A continuación derivaremos la ecuación constitutiva y las funciones de relajación y fluencia para algunos modelos mecánicos.

Modelo de Maxwell

El modelo de Maxwell simple está formado por un resorte colocado en serie con un amortiguador (Fig. 2.5a). A este arreglo lo llamaremos brazo de Maxwell. Este sistema se usa comúnmente para modelar fluidos visco-elásticos [46]. En una conexión en serie, el esfuerzo en cada elemento es el mismo y es equivalente al esfuerzo total aplicado. Mientras que la deformación total es la suma de la deformación experimentada en cada elemento, es decir:

$$\sigma = \sigma_s = \sigma_d \quad (2.32)$$

$$\epsilon = \epsilon_s + \epsilon_d \quad (2.33)$$

Los subíndices s y d denotan los elementos correspondientes al resorte y al amortiguador respectivamente. El esfuerzo en el resorte, σ_s , esta gobernado por la ley de Hooke ec. (2.1) mientras que el esfuerzo en el amortiguador, σ_d , esta gobernado por la ley de Newton ec. (2.2).

Para encontrar la ecuación constitutiva es conveniente derivar con respecto al tiempo las ecuaciones (2.32) y (2.33):

$$\dot{\sigma} = \dot{\sigma}_s = \dot{\sigma}_d \quad (2.34)$$

$$\dot{\epsilon} = \dot{\epsilon}_s + \dot{\epsilon}_d \quad (2.35)$$

Usando $\dot{\epsilon}_s = \dot{\sigma}_s/E$ de la ley de Hooke (ec. (2.1)) y $\dot{\epsilon}_d = \dot{\sigma}_d/\eta$ de la ley de Newton (ec. (2.2)) en la ec. (2.35):

$$\dot{\epsilon} = \frac{\dot{\sigma}_s}{E} + \frac{\sigma_d}{\eta}. \quad (2.36)$$

Combinando las ecuaciones (2.34) y (2.36) se tiene que:

$$\dot{\epsilon} = \frac{\dot{\sigma}}{E} + \frac{\sigma}{\eta}. \quad (2.37)$$

Por último, multiplicando la ec. (2.37) por E y usando $\tau = \eta/E$ obtenemos la **ecuación constitutiva del modelo de Maxwell**:

$$E\dot{\epsilon} = \dot{\sigma} + \frac{1}{\tau}\sigma, \quad (2.38)$$

donde τ se denomina **tiempo de relajación**. Transformando la ec. (2.38) al espacio de Laplace podemos escribir la ecuación como:

$$\tilde{\sigma} = \left(\frac{sE}{s + \frac{1}{\tau}} \right) \tilde{\epsilon} \quad (2.39)$$

en la ecuación anterior $\tilde{\sigma}$ y $\tilde{\epsilon}$ representan el esfuerzo y la deformación en el espacio de Laplace respectivamente.

Combinando las ecuaciones (2.39) y (2.8) :

$$\tilde{E}_{rel} = \frac{E}{\left(s + \frac{1}{\tau}\right)} \quad (2.40)$$

Transformando la ecuación anterior al espacio del tiempo obtenemos la **función de relajación para el modelo de Maxwell**:

$$E_{rel} = Ee^{-\frac{t}{\tau}}. \quad (2.41)$$

Ahora, usando la ec. (2.39) en la ec. (2.13):

$$\tilde{C}_{crp} = \frac{1}{E} \left(\frac{1}{s} + \frac{1}{s^2} \right), \quad (2.42)$$

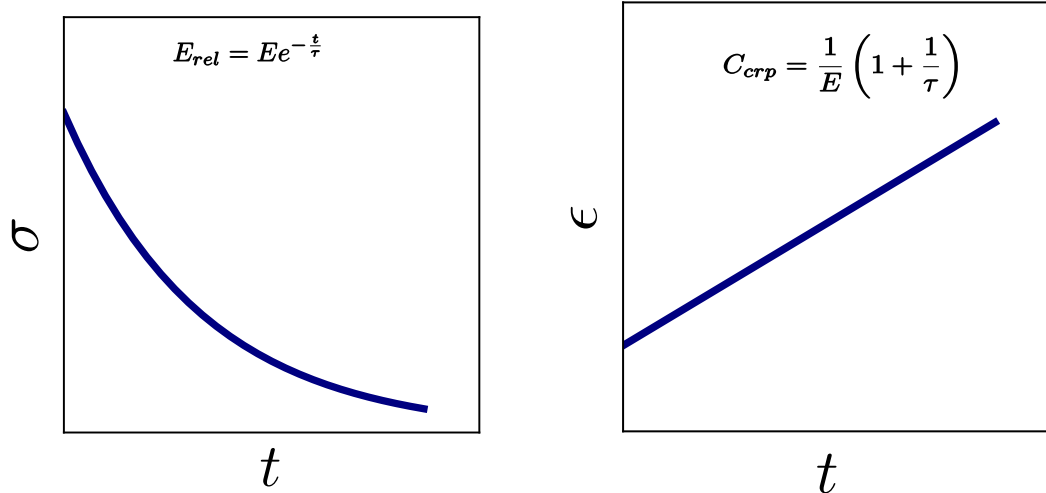


Figura 2.6: Lado izquierdo: Gráfica de la función de relajación obtenida con el modelo de Maxwell. Lado derecho: Gráfica de la función de fluencia obtenida con el modelo de Maxwell

y transformando al espacio del tiempo obtenemos la **función de fluencia para el modelo de Maxwell**:

$$C_{crp} = \frac{1}{E} \left(1 + \frac{t}{\tau} \right) \quad (2.43)$$

El modelo de Maxwell representa la relajación como un comportamiento exponencial (Fig. 2.6a), el cual se aproxima bastante bien a la realidad. Sin embargo, en un experimento de fluencia predice que la deformación crece de manera lineal con el tiempo (Fig. 2.6b), comportamiento que no se ajusta a la realidad.

Modelo de Kelvin-Voigt

El modelo de Kelvin-Voigt está compuesto por un resorte conectado en paralelo con un amortiguador (Fig. 2.5b). Se usa para modelar el comportamiento de sólidos visco-elásticos [46].

En una conexión en paralelo, la deformación producida en cada elemento es la misma e igual a la deformación total. Mientras que el esfuerzo total es la suma de los esfuerzos aplicados en cada elemento, es decir:

$$\sigma = \sigma_s + \sigma_d, \quad (2.44)$$

$$\epsilon = \epsilon_s = \epsilon_d. \quad (2.45)$$

Usando la ley de Hooke (2.1) y la ley de Newton (2.2) en la ec. (2.44) vemos que el esfuerzo se puede escribir como:

$$\sigma = E\epsilon_s + \eta\dot{\epsilon}_d. \quad (2.46)$$

Combinando la ecuación anterior con la ec. (2.45) obtenemos la **ecuación constitutiva del modelo de Kelvin**

$$\sigma = E\epsilon + \eta\dot{\epsilon} \quad (2.47)$$

En el espacio de Laplace se representa como:

$$\tilde{\sigma} = E \left(1 + \frac{\eta}{E} s \right) \tilde{\epsilon} \quad (2.48)$$

Para obtener el módulo de relajación del modelo de Kelvin, usamos la ec. (2.48) en la ec. (2.8):

$$\tilde{E}_{rel} = \frac{E}{s} + \eta, \quad (2.49)$$

y finalmente, transformando la ecuación anterior al espacio del tiempo obtenemos la **función de relajación para el modelo de Kelvin**:

$$E_{rel} = E + \eta. \quad (2.50)$$

Por otro lado, si usamos la ec. (2.48) en la ec. (2.13):

$$\tilde{C}_{crp} = \frac{1}{E} \frac{\frac{E}{\eta}}{s \left(s + \frac{E}{\eta} \right)} \quad (2.51)$$

y transformamos la ecuación anterior al espacio del tiempo obtenemos la **función de fluencia para el modelo de Kelvin**:

$$C_{crp} = \frac{1}{E} \left(1 - e^{-\left(\frac{t}{\tau}\right)} \right). \quad (2.52)$$

El modelo de Kelvin representa la relajación como un comportamiento constante (2.7a), es decir, no existe relajación y esto no se ajusta realidad. Por otro lado, en un experimento de fluencia modela la fluencia con una función exponencial (2.7b), comportamiento que se aproxima a la realidad.

Modelo sólido linear estándar (SLS)

El modelo de solido linear estándar o también llamado modelo de Zener está formado por un resorte conectado en paralelo a un brazo de Maxwell (Fig. 2.5c).

En este arreglo, el resorte y el brazo de Maxwell experimentan la misma deformación mientras que el esfuerzo total es la suma de los esfuerzos. Es decir,

$$\epsilon = \epsilon_s = \epsilon_m \quad (2.53)$$

$$\sigma = \sigma_s + \sigma_m \quad (2.54)$$

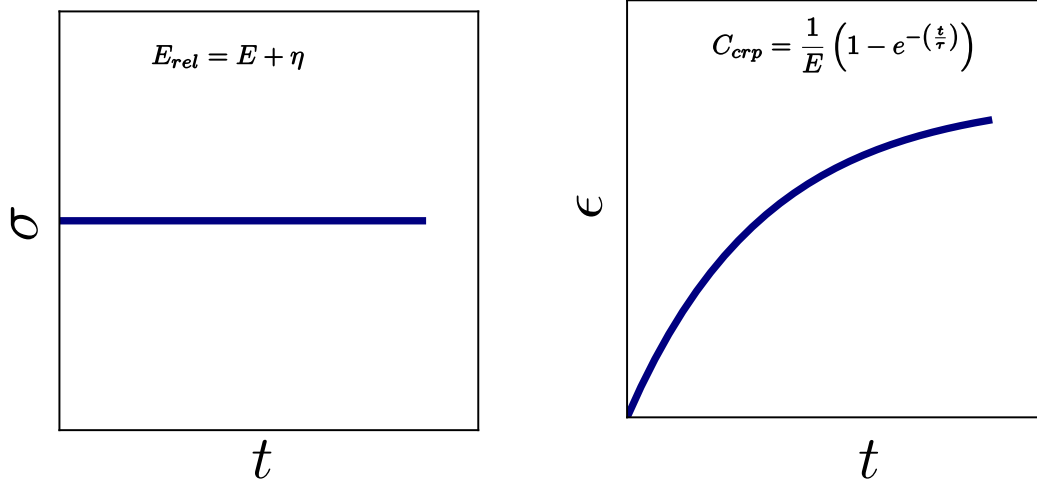


Figura 2.7: Lado izquierdo: Gráfica de la función de relajación obtenida con el modelo de Kelvin-Voigt. Lado derecho: Gráfica de la función de fluencia obtenida con el modelo de Kelvin-Voigt

El subíndice s representa al resorte y el subíndice m denota al brazo de Maxwell. Si la constante del resorte es E_0 entonces el esfuerzo en este elemento es:

$$\tilde{\sigma}_s = E_0 \tilde{\epsilon}_s, \quad (2.55)$$

de acuerdo con la ley de Hooke (ec. (2.1)), y el esfuerzo en el brazo de Maxwell esta dado por:

$$\sigma_m = \left(\frac{sE_1}{s + \frac{1}{\tau}} \right) \tilde{\epsilon}_m, \quad (2.56)$$

de acuerdo con la ec. (2.39), por tanto el esfuerzo total es:

$$\tilde{\sigma} = E_0 \tilde{\epsilon}_s + \left(\frac{sE_1}{s + \frac{1}{\tau}} \right) \tilde{\epsilon}_m. \quad (2.57)$$

Combinando las ecuación anterior con la ec. (2.53) obtenemos la **ecuación constitutiva del modelo SLS**:

$$\tilde{\sigma} = \left(E_0 + \frac{sE_1}{s + \frac{1}{\tau}} \right) \tilde{\epsilon}. \quad (2.58)$$

Usando la ec. (2.58) en la ec. (2.8) se tiene que:

$$\tilde{E}_{rel} = \frac{E_0}{s} + \frac{E_1}{s + \frac{1}{\tau}}, \quad (2.59)$$

y transformando al espacio del tiempo obtenemos la **función de relajación para el modelo SLS**:

$$E_{rel} = E_0 + E_1 e^{-\frac{t}{\tau}}. \quad (2.60)$$

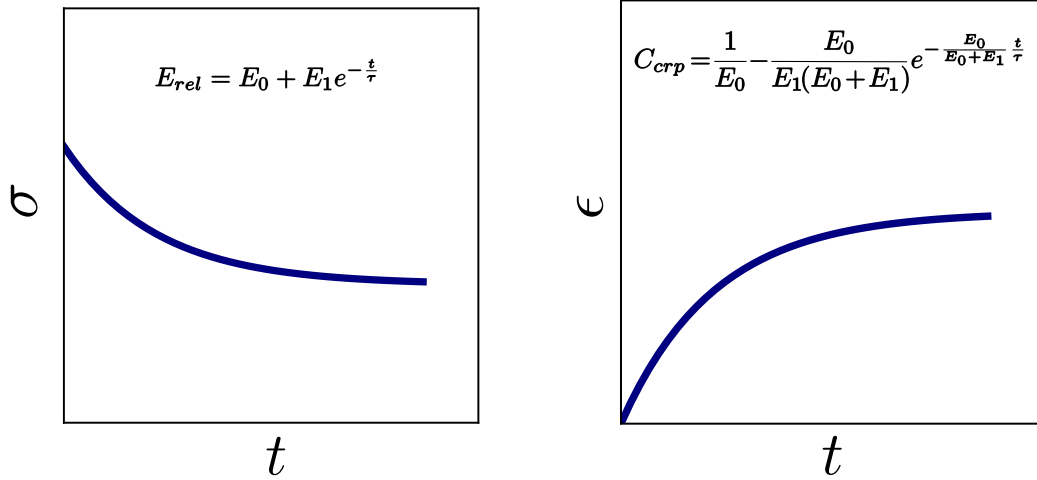


Figura 2.8: Lado izquierdo: Gráfica de la función de relajación obtenida con el modelo SLS. Lado derecho: Gráfica de la función de fluencia obtenida con el modelo SLS

Para obtener la función de fluencia del modelo SLS usamos la ec. (2.58) en la ec. (2.10):

$$\tilde{C}_{crp} = \frac{1}{(E_0 + E_1)s - \frac{E_0}{\tau}} + \frac{\frac{1}{\tau}}{s \left((E_0 + E_1)s + \frac{E_0}{\tau} \right)}. \quad (2.61)$$

Reordenando algunos términos, podemos llevar la ecuación anterior a la forma:

$$\tilde{C}_{(crp)} = \frac{1}{E_0 + E_1} \left(\frac{1}{s + \frac{E_0}{\tau(E_0 + E_1)}} \right) - \frac{1}{E_1} \left(\frac{\frac{E_0}{\tau(E_0 + E_1)}}{s \left(s + \frac{E_0}{\tau(E_0 + E_1)} \right)} \right). \quad (2.62)$$

Transformando la ecuación anterior al espacio del tiempo:

$$C_{crp} = \frac{1}{E_0 + E_1} e^{-\frac{E_0}{E_0 + E_1} \frac{t}{\tau}} - \frac{1}{E_1} \left(1 - e^{-\frac{E_0}{E_0 + E_1} \frac{t}{\tau}} \right). \quad (2.63)$$

Finalmente, reorganizando algunos términos, obtenemos que la **función de fluencia para el modelo SLS** esta dado por:

$$C_{crp} = \frac{1}{E_0} - \frac{E_0}{E_1(E_0 + E_1)} e^{-\frac{E_0}{E_0 + E_1} \frac{t}{\tau}} \quad (2.64)$$

La Fig. 2.8 muestra el módulo de relajación y la función de fluencia para el modelo SLS. Este modelo se ajusta bien tanto en un experimento de relajación como en un experimento de fluencia.

Modelo de Maxwell Generalizado (GM)

El modelo de Maxwell generalizado está formado por un resorte conectado en paralelo a n brazos de Maxwell (Fig. 2.5d). En este caso la deformación total es igual a la deformación en

cada elemento y el esfuerzo total es la suma del esfuerzo en cada elemento, es decir:

$$\epsilon = \epsilon_s = \epsilon_{mj} \quad (2.65)$$

$$\sigma = \sigma_s + \sum_j \sigma_{mj}, \quad (2.66)$$

el subíndice s representa al resorte con constante elástica E_0 en la Fig. 2.5d y el subíndice mj denota el brazo j -ésimo. El esfuerzo en estos elementos está dado por:

$$\tilde{\sigma}_s = E_0 \tilde{\epsilon}_s \quad (2.67)$$

$$\tilde{\sigma}_{mj} = \left(\frac{sE_j}{s + \frac{1}{\tau_j}} \right) \tilde{\epsilon}_{mj} \quad (2.68)$$

de acuerdo con las ecuaciones (2.1) y (2.39). Por tanto, la **ecuación constitutiva del modelo Generalizado de Maxwell** es:

$$\tilde{\sigma} = \left(E_0 + \sum_j \frac{sE_j}{s + \frac{1}{\tau_j}} \right) \tilde{\epsilon}. \quad (2.69)$$

Usando la ecuación anterior en la ec. (2.8):

$$\tilde{E}_{rel} = \frac{E_0}{s} + \sum_{j=1}^n \frac{sE_j}{s \left(s + \frac{1}{\tau_j} \right)}, \quad (2.70)$$

y transformando al espacio del tiempo obtenemos la **función de relajación del modelo generalizado de Maxwell**

$$E_{rel} = E_0 + \sum_{j=1}^n E_j e^{-\frac{t}{\tau_j}}. \quad (2.71)$$

La función de relajación del modelo GM también tiene la forma exponencial. Esta función tiene más parámetros lo que significa mayor libertad de la función y por tanto mejor ajuste. Sin embargo, se deben hacer mayores suposiciones para interpretar el significado físico de los parámetros obtenidos.

Modelos de resortes y amortiguadores como elementos fraccionales

Los modelos representados por resortes y amortiguadores están restringidos a ciertas clases de soluciones, las cuales difícilmente permiten modelar el comportamiento de los sistemas complejos que existen en la naturaleza, tales como las células. El cálculo fraccional permite modelar el comportamiento de un elemento intermedio entre los resortes y los amortiguadores. Para describir los modelos mecánicos en su forma fraccional se hace uso del modelo de Scott-Blair,

$$\sigma(t) = E\tau^\alpha \frac{d^\alpha \epsilon(t)}{dt^\alpha}, \quad (2.72)$$

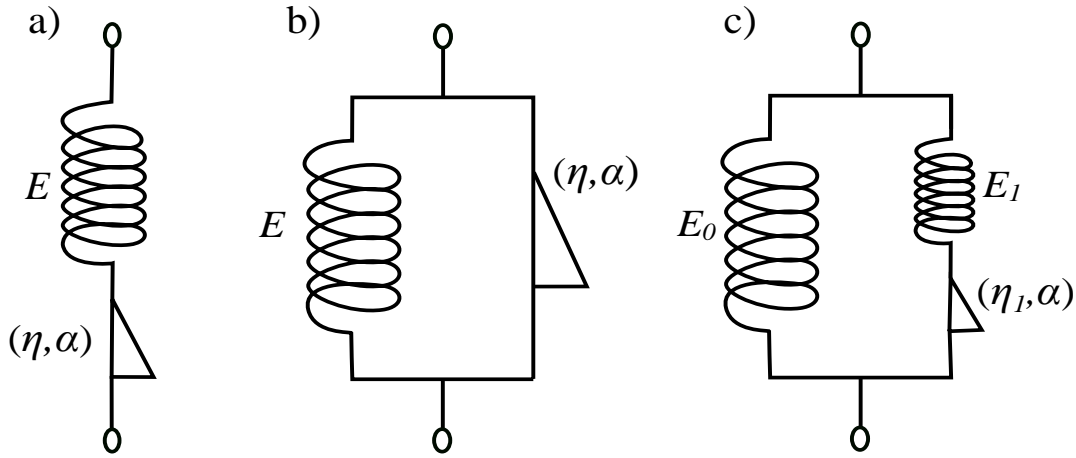


Figura 2.9: Representación esquemática de los modelos mecánicos fraccionales. a) Modelo fraccional de Maxwell, b) Modelo fraccional de Kelvin-Voigt, c) Modelo fraccional SLS

el cual está representado por una derivada de orden no entero. Cuando $\alpha = 0$ el modelo de Scott-Blair recupera la ecuación de Hooke ($\sigma = E\epsilon(t)$), la cual describe el comportamiento de un material puramente elástico. Cuando $\alpha = 1$ se obtiene la ecuación de Newton ($\sigma(t) = \eta\dot{\epsilon}(t)$), indicando el comportamiento de un material puramente viscoso. El modelo de Scott-Blair también lo podemos ver como:

$$\epsilon(t) = E^{-1}\tau^{-\alpha}\frac{t^{-\alpha}\epsilon(t)}{dt^{-\alpha}}. \quad (2.73)$$

Relacionar el esfuerzo y la deformación a través de ecuaciones fraccionales permite encontrar ecuaciones que modelen comportamientos que tengan un decaimiento no exponencial.

Los modelos mecánicos fraccionales se construyen sustituyendo los resortes y amortiguadores por elementos fraccionales. Las ecuaciones diferenciales de los modelos mecánicos en su forma fraccional se construyen de manera análoga a los modelos visco-elásticos formados por resortes y amortiguadores.

Modelo de Maxwell fraccional

Para representar el modelo de Maxwell en su forma fraccional el resorte representado por E y el amortiguador descrito por η se sustituyen por los elementos fraccionales α_i , E_i y τ_i , $i = 1, 2$. Sin pérdida de generalidad, conservaremos el resorte y reemplazaremos el amortiguador por un elemento fraccional, como se observa en la Fig. 2.9a. Los elementos que constituyen el modelo de Maxwell están asociados en serie, por tanto, el esfuerzo $\sigma(t)$ es el mismo para ambos elementos mientras que la deformación total del sistema es la suma de las deformaciones parciales de ambos elementos. Sus respectivas relaciones esfuerzo-deformación son:

$$\epsilon = \epsilon_s + \epsilon_f, \quad (2.74)$$

$$\sigma = \sigma_s = \sigma_f. \quad (2.75)$$

Los subíndices s y f representan el resorte y el elemento fraccional respectivamente. Sustituyendo las ecuaciones (2.1) y (2.73) en (2.74) obtenemos:

$$\epsilon = \frac{\sigma}{E} + \frac{1}{\eta} \frac{\partial^{-\alpha} \sigma}{\partial t^{-\alpha}}. \quad (2.76)$$

Obteniendo la derivada de orden α con respecto del tiempo $\left(\frac{\partial^\alpha}{\partial t^\alpha}\right)$ de la ecuación (2.76) se tiene la ecuación:

$$\frac{\partial^\alpha \epsilon}{\partial t^\alpha} = \frac{1}{E} \frac{\partial^\alpha \sigma}{\partial t^\alpha} + \frac{1}{\eta} \sigma, \quad (2.77)$$

transformando al espacio de Laplace:

$$s^\alpha \tilde{\epsilon} = \frac{1}{E} s^\alpha \tilde{\sigma} + \frac{1}{\eta} \tilde{\sigma}, \quad (2.78)$$

por lo tanto, la **ecuación constitutiva del modelo de Maxwell fraccional en el espacio de Laplace** esta dada por:

$$\tilde{\sigma} = \frac{E}{1 + \frac{E}{\eta} s^{-\alpha}} \tilde{\epsilon}. \quad (2.79)$$

Si sustituimos la ec. (2.79) en la ec. (2.8):

$$\tilde{E}_{rel} = E \frac{s^{\alpha-1}}{s^\alpha + \frac{E}{\eta}}. \quad (2.80)$$

Transformando al espacio del tiempo

$$E_{rel} = \mathcal{E}_{\alpha,1} \left(-\frac{E_1}{\eta} t^\alpha \right). \quad (2.81)$$

La función \mathcal{E} es la función de Mittag-Leffler y está dada por

$$\mathcal{E}_{\alpha,1}(z) = \sum_{k=0}^{\infty} \frac{z^k}{\Gamma(1 + \alpha k)} \quad (2.82)$$

La función de Mittag-Leffler se reduce a la función exponencial cuando $\alpha = 1$ (Fig. 2.10a, por lo tanto, la función de relajación del modelo fraccional de Maxwell se reduce a la del modelo de Maxwell. Esta función también permite modelar decaimientos no exponenciales, como se muestra en la Fig 2.10a.

Modelo de Kelvin-Voigt fraccional

Para representar el modelo de Kelvin en su forma fraccional el resorte representado por E y el amortiguador descrito por η se sustituyen por los elementos fraccionales α_i , E_i y τ_i , $i = 1, 2$. Sin pérdida de generalidad, conservaremos el resorte y reemplazaremos el amortiguador por un elemento fraccional, como se observa en la Fig. 2.9b. Los elementos que constituyen el

modelo de Kelvin están asociados en paralelo, por lo tanto, la deformación $\epsilon(t)$ es la misma para ambos elementos mientras que el esfuerzo total del sistema es la suma de los esfuerzos parciales de ambos elementos. Sus respectivas relaciones esfuerzo-deformación son:

$$\sigma = \sigma_s + \sigma_f, \quad (2.83)$$

$$\epsilon = \epsilon_s = \epsilon_f. \quad (2.84)$$

Los subíndices s y f representan el resorte y el elemento fraccional respectivamente. De manera similar al modelo de Maxwell, si sustituimos el amortiguador por un elemento fraccional (Fig. 2.9b) se tiene que:

$$\sigma = E\epsilon + \eta \frac{d^\alpha \epsilon}{dt^\alpha}. \quad (2.85)$$

Transformando la ecuación anterior al espacio de Laplace

$$\tilde{\sigma} = E\tilde{\epsilon} + \eta s^\alpha \tilde{\epsilon}, \quad (2.86)$$

por lo tanto, la **ecuación constitutiva del modelo de Kelvin-Voigt en el espacio de Laplace** está dada por:

$$\frac{\tilde{\sigma}}{\tilde{\epsilon}} = E + \eta s^\alpha. \quad (2.87)$$

Usando la ecuación anterior en la ec. (2.8):

$$\tilde{E}_{rel} = \frac{E}{s} + \eta s^{\alpha-1}. \quad (2.88)$$

Transformando al espacio del tiempo

$$E_{rel} = E + \eta \frac{t^{-\alpha}}{\Gamma(1-\alpha)}. \quad (2.89)$$

La Fig. 2.10b muestra el comportamiento del módulo de relajación para el modelo fraccional de Kelvin para diferentes valores de α .

Modelo de Frener fraccional

El modelo de Frener fraccional o modelo SLS fraccional, que llamaremos modelo de Frener fraccional, se tiene un resorte conectado en paralelo a un brazo de Maxwell fraccional (Fig. 2.9c). En este caso, el esfuerzo que experimenta el sistema es igual a la suma del esfuerzo en el lado derecho y del esfuerzo en el lado izquierdo. Y la deformación es la misma en ambos lados, es decir:

$$\tilde{\sigma} = \tilde{\sigma}_s + \tilde{\sigma}_m, \quad (2.90)$$

$$\tilde{\epsilon} = \tilde{\epsilon}_s = \tilde{\epsilon}_m, \quad (2.91)$$

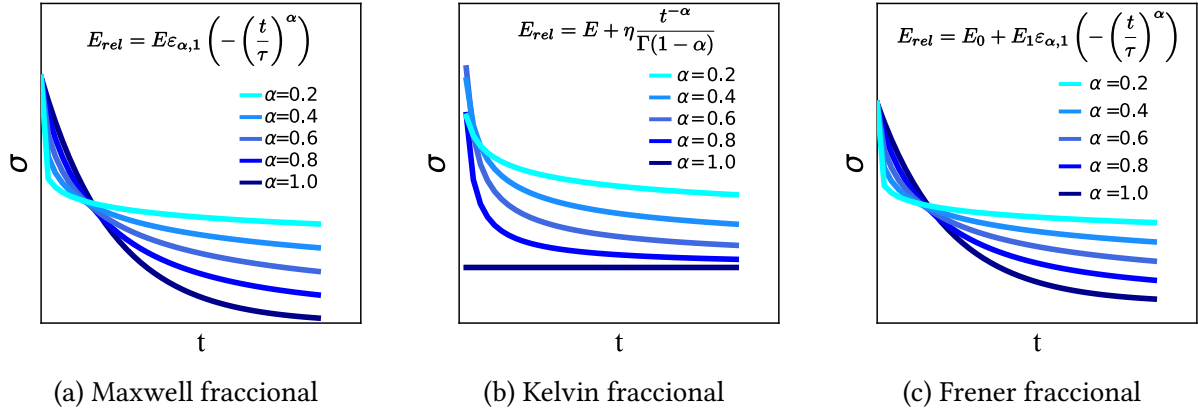


Figura 2.10: Gráfica de la función de relajación obtenida con el modelo de: a)Maxwell, b) Kelvin fraccional (ley de potencias) y c) Frener fraccional para diferentes valores de α . Cuando $\alpha \rightarrow 0$ el material es un sólido elástico. Cuando $\alpha \rightarrow 1$: para el modelo fraccional de Maxwell el material es un fluido visco-elástico; para los modelos de Kelvin y Zener fraccional el material es un sólido visco-elástico.

usando la ec. (2.79) en la ec. (2.91) obtenemos la **ecuación constitutiva del modelo de Frener Fraccional**:

$$\tilde{\sigma} = \left(E_0 + \frac{E_1}{1 + \frac{E_1}{\eta} s^{-\alpha}} \right) \tilde{\epsilon}. \quad (2.92)$$

Sustituyendo la ecuación anterior en la ec. (2.8):

$$\tilde{E}_{rel} = \frac{E_0}{s} + \frac{E_1 s^{\alpha-1}}{s^{\alpha} + \frac{E_1}{\eta}}. \quad (2.93)$$

Transformando al espacio del tiempo la ecuación anterior:

$$E_{rel} = E_0 + E_1 \mathcal{E}_{\alpha,1} \left(-\frac{E_1}{\eta} t^{\alpha} \right). \quad (2.94)$$

La Fig. 2.10c muestra el comportamiento del módulo de relajación para el modelo fraccional de Zener para diferentes valores de α .

Capítulo 3

Materiales y métodos experimentales

3.1. Microscopio de Fuerza Atómica (AFM)

El microscopio de fuerza atómica es un instrumento mecano-óptico capaz de formar imágenes topográficas de relieves a escalas nanométricas, permitiendo caracterizar la morfología de los materiales. Además tiene la sensibilidad de medir fuerzas en el orden de los pico Newtons, convirtiéndolo en un aparato ideal para determinar las propiedades mecánicas de los materiales. Una ventaja que posee el AFM sobre otras técnicas es que puede operar tanto en un ambiente seco como en un medio líquido.

3.1.1. Principio de operación de un AFM

El microscopio de fuerza atómica, figura 3.1, está conformado por una base (donde se coloca la muestra); un *cantilever* o voladizo y en su extremo se encuentra una punta, donde las más

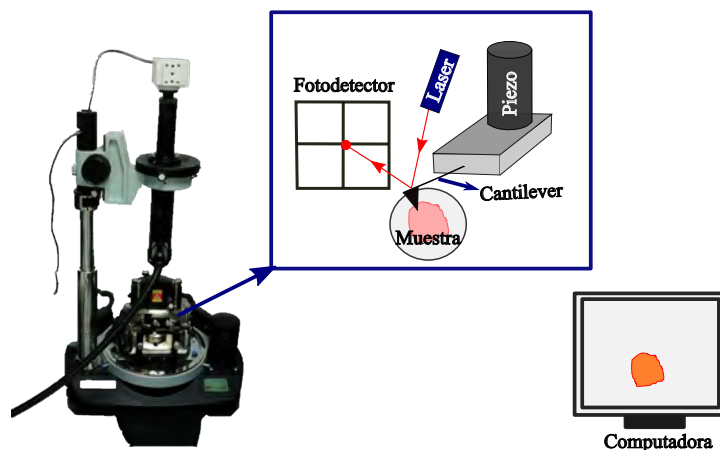


Figura 3.1: Elementos principales que componen un microscopio de fuerza atómica.

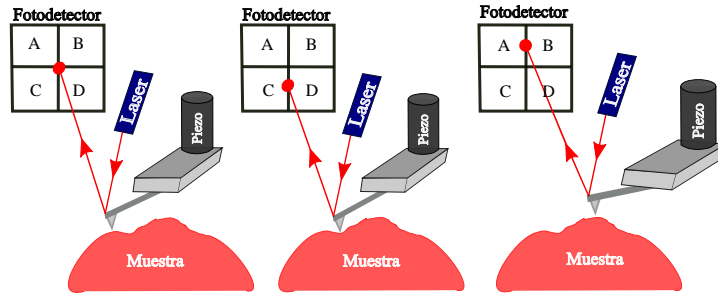


Figura 3.2: Representación esquemática de la señal registrada por el fotodetector con los cambios de deflexión del cantilever.

comunes son de longitudes del orden de los micrómetros (dependiendo de su geometría). Dicha punta se pone en contacto con la muestra, y por medio de un láser reflejado en el cantilever por encima de la punta se hace incidir a un fotodetector de cuatro cuadrantes. Además, la punta se encuentra montada en un escáner de material piezoeléctrico que se deforma acercando o alejando la punta de la muestra según la retroalimentación recibida de la señal del fotodetector.

Sensibilidad del fotodetector

La punta realiza un barrido sobre la superficie de una muestra produciendo deflexiones en el cantilever que dependen de la topografía de la muestra. Estas deflexiones inducen un cambio en la posición de incidencia del láser en el fotodetector como se muestra en la Fig. 3.2. Por lo tanto, la deflexión del cantilever se registra como la diferencia entre las corrientes detectadas por los cuadrantes y se expresa en Amperios. Luego, es necesario convertir la deflexión a unidades de distancia, para ello se realiza una prueba de fuerza sobre una superficie rígida y no deformable, esta curva es llamada **curva de calibración**. En la curva de calibración la deflexión del cantilever equivale a la distancia que se extendió el piezoeléctrico. La pendiente de esta curva se denomina **factor de sensibilidad**, que nos permitirá convertir las unidades de corriente a unidades de distancia.

Constante de resorte

La deflexión del cantilever se puede transformar en una fuerza usando la ley de Hooke ($F = k_c d$), donde d representa la deflexión del cantilever y k_c la constante de resorte del cantilever. Existen diferentes métodos para caracterizar k_c del cantilever: los más comunes son el método de Sader, el método de Cleveland y el de sintonizado térmico; los explicaremos brevemente a continuación. El método de Sader [47] determina la constante de resorte a partir de la frecuencia de resonancia del cantilever rodeado de un fluido considerando la densidad del medio. El método de Cleveland [48] requiere agregar una pequeña masa conocida y determinar la masa efectiva y la constante del resorte a través de distintas masas y la oscilación de resonancia del cantilever cargado con estas masas. El método de sintonizado térmico utiliza el teorema de

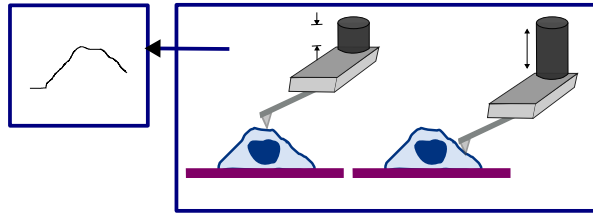


Figura 3.3: Imagen descriptiva del modo de escaneo en contacto del AFM

equipartición de la energía. La metodología es realizar una sintonización haciendo oscilar al cantilever en el aire, en todo el espectro de frecuencias. Finalmente se sintoniza al cantilever en la frecuencia con mayor amplitud observada en su espectro.

3.1.2. Modos de operación de un AFM

El AFM fue desarrollado principalmente para la obtención de imágenes. Sin embargo, debido a las características mencionadas en la sección anterior, se tiene la capacidad de determinar fuerzas de interacción entre la punta y la muestra a escalas del orden de pN. Las curvas de fuerza en función de la distancia entre la punta y la muestra, permiten obtener las propiedades mecánicas de los materiales y, si existe, es posible determinar la adhesión o repulsión entre la punta y la muestra.

Desde su invención se han desarrollado diferentes modos de operación, entre ellos se encuentran el modo de imagen en contacto y semi-contacto y el modo de espectroscopia de fuerza.

Modo de imagen en contacto

En el modo de contacto la punta permanece en contacto constante con la superficie de la muestra. La punta realiza un barrido sobre la superficie manteniendo la fuerza de contacto constante. El sistema de retroalimentación extiende o contrae el cristal piezoeléctrico con el fin de acercar o alejar la punta para mantener esta fuerza constante. Este modo es particularmente útil para muestras rígidas y bien adheridas al sustrato.

Modo de imagen en semi-contacto

En el modo semi-contacto la punta toca intermitentemente la superficie de la muestra. Para ello, el piezoeléctrico hace oscilar al cantilever sinusoidalmente en dirección vertical cerca de su frecuencia de resonancia. La punta realiza un barrido sobre la superficie de la muestra manteniendo constante la amplitud de oscilación del cantilever. El sistema de retroalimentación ajusta constantemente la distancia entre la punta y la muestra con el fin de mantener la amplitud de oscilación constante. Esta técnica es apropiada para muestra suaves, tales como las

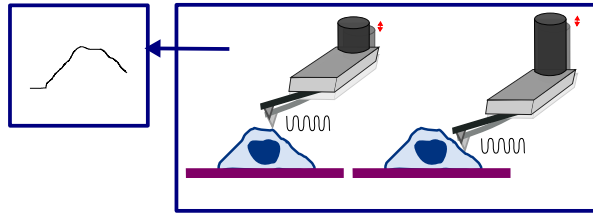


Figura 3.4: Imagen descriptiva del modo de escaneo en semicontacto del AFM

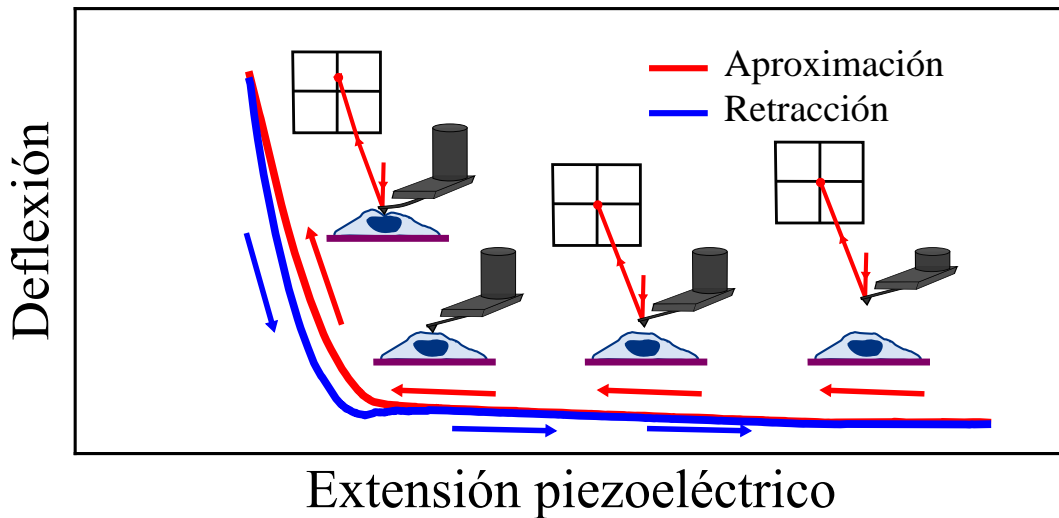


Figura 3.5: Representación esquemática en un ciclo de aproximación-retracción durante un experimento de indentación.

células ya que pueden resultar fácilmente dañadas por la punta cuando se trabaja en modo de contacto.

Modo de Espectroscopía de fuerza

En este modo de operación del AFM se miden las fuerzas de interacción en función de la distancia entre la punta y la muestra, a esta medición se le denomina curva fuerza-distancia. En este método, la punta del AFM se extiende en dirección perpendicular a la superficie de la muestra y se retrae. A lo largo de este recorrido se registra la fuerza del cantilever como función del desplazamiento del piezoeléctrico, Fig. 3.5. La espectroscopía de fuerza puede realizarse en modo de contacto o semicontacto. En el modo semi-contacto además de registrar la deflexión del cantilever, se monitorea la vibración del cantilever.

Las curvas arrojadas por el AFM se obtienen acercando el cantilever en dirección perpendicular a la superficie de la muestra, desde un punto inicial ($z = 0$) hasta un punto final ($z = z_{max}$).

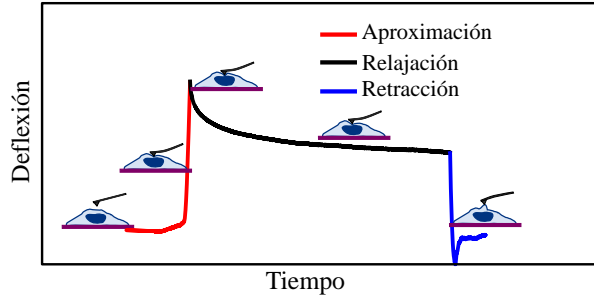


Figura 3.6: Representación esquemática durante un ciclo de aproximación relajación retracción en un experimento de relajación de esfuerzos con AFM.

Independientemente de la geometría, la fuerza de indentación se relaciona con la rigidez del cantilever mediante la ley de Hooke [49]:

$$F = k_c(d - d_0), \quad (3.1)$$

donde k_c es la constante del resorte del cantilever, d es la deflexión del cantilever y d_0 es la deflexión en el punto de contacto. La indentación se calcula mediante:

$$\delta = (z - z_0) - (d - d_0), \quad (3.2)$$

z representa la extensión del piezoeléctrico, z_0 es el punto de contacto.

Modo de Espectroscopía de fuerza vs tiempo

Además de las curvas de fuerza distancia, el AFM cuenta con un osciloscopio que permite registrar la fuerza a lo largo del tiempo. Para ello es posible medir la relajación de esfuerzos aplicando una deformación constante y observar la fuerza en función del tiempo. Con ciertos equipos es posible aplicar fuerzas oscilatorias en un punto de la muestra y medir la deformación oscilatoria producida sobre ella.

Un experimento de relajación de esfuerzos con AFM consiste en aproximar la punta a la superficie de la muestra, realizar una indentación, cuando haya alcanzado cierta profundidad se mantiene la punta en ese punto durante un periodo de tiempo determinado y después se retrae la punta. Durante todo el ciclo se registra la fuerza a través del osciloscopio integrado. Una curva típica de relajación de esfuerzos de este tipo se muestra en la Fig. 3.6.

3.2. Análisis de imágenes: Rugosidad

La rugosidad de la superficie del materia resulta útil, por ejemplo en biología celular, ya que se ha observado que los cambios que sufre la célula en la rugosidad de la membrana plasmática puede indicar cambios en la salud de la célula [50, 51].

Existen diferentes formas de reportar cuantitativamente la rugosidad, las más comunes son la rugosidad promedio (R_a) y la raíz cuadrática media de la rugosidad (R_{RMS}). Para el caso de dos dimensiones se expresan de la siguiente manera:

$$R_a = \frac{1}{N_x N_y} \sum_{j=1}^{N_y} \sum_{i=1}^{N_x} |Z_{ij} - \mu|, \quad (3.3)$$

$$R_{RMS} = \sqrt{\frac{1}{N_x N_y} \sum_{j=1}^{N_y} \sum_{i=1}^{N_x} (Z_{ij} - \mu)^2}. \quad (3.4)$$

$Z_{ij} = Z(X_i, Y_i)$ es una función discreta sobre el plano XY mientras que N_x y N_y son los puntos paralelos a los ejes X y Y respectivamente. El valor medio de las alturas, μ , está dado por:

$$\mu = \frac{1}{N_x N_y} \sum_{j=1}^{N_y} \sum_{i=1}^{N_x} Z_{ij}. \quad (3.5)$$

3.3. Líneas celulares

En este trabajo investigamos las propiedades mecánicas de diferentes líneas celulares que describimos a continuación.

Línea celular HT-29 Adenocarcinoma de colon caucásico humano.

Descripción: Aislado de un tumor primario en una mujer caucásica de 44 años. Forma un adenocarcinoma bien diferenciado compatible con la colonia primaria, grado I.

Especie: Humano

Tejido de origen: Colon

Tipo de célula: Epitelial

Osteosarcoma Osteosarcoma humano

Descripción: De un osteosarcoma de un varón de 14 años.

Especie: Humano

Tejido de origen: Hueso

Tipo de célula: Fibroblasto

Línea celular MDA-MB-231 Adenocarcinoma de mama caucásico humano.

Descripción: MDA-MB-231 se estableció a partir de un derrame pleural de una mujer de 51 años con cáncer de mama metastásico.

Especie: Humano

Tejido de origen: Pecho

Tipo de célula: Epitelial

Línea celular DU-145 Carcinoma de próstata caucásico humano

Descripción: Derivado de un sitio metastásico de un hombre de 69 años caucásico.

Especie: Humano

Tejido de origen: Próstata; derivado del sitio metastásico: cerebro

Tipo de célula: Epitelial

3.3.1. Cultivo celular

Las células se mantuvieron en medio de cultivo AIM-V (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) adicionado con 10 % de suero fetal bovino (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA). Se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO_2 .

Capítulo 4

Metodologías para medir propiedades visco-elásticas de células cancerosas

4.1. Resumen

En este capítulo analizamos las propiedades visco-elásticas de células de cáncer de mama MDA-MB-231 y células de cáncer de próstata DU-145 con la técnica de microscopía de fuerza atómica. Se obtuvieron los parámetros visco-elásticos usando dos metodologías, La primera es a través del análisis de curvas de fuerza vs. distancia y la segunda es mediante el análisis de curvas de relajación de fuerza. Diferentes modelos para el comportamiento visco-elástico se aplicaron para cada una de las metodologías utilizadas. Se discuten las ventajas y desventajas de cada metodología observando que cuantitativamente el modelo fraccional es una muy buena opción para describir el comportamiento visco-elástico de células.

4.2. Introducción

Existen diferentes metodologías experimentales que permiten medir las propiedades visco-elásticas con AFM. Estas metodologías se pueden clasificar en experimentos en el dominio del tiempo, como las pruebas de relajación y de fluencia, y experimentos en el dominio de la frecuencia, como las deformaciones oscilatorias [52]. La disponibilidad de las técnicas en el AFM depende de las características electrónicas del mismo, muchas veces se requiere hacer adaptaciones para poder realizar determinados experimentos (un ejemplo de ello es que algunos equipos no tienen la manera de medir curvas de fuerza vs tiempo, esto requiere de adaptar electrónica adicional).

La obtención de curvas de fuerza vs. distancia está disponible en todos los equipos de AFM. De estas curvas extraemos el módulo de Young de muestras biológicas, geles, etc. [53, 54, 55]. Para esto, se aplica el modelo de Hertz el cual supone que el material es un sólido elástico. Sin

embargo, las células en su medio acuoso presentan un comportamiento viscoelástico. Un indicativo de viscoelasticidad es la histéresis que observamos en las curvas de fuerza vs. distancia [56]. Efremov *et al.* desarrollaron una metodología para extraer los parámetros viscoelásticos de los materiales haciendo uso de estas curvas de fuerza vs. distancia [56], empleando el modelo de Ting [57].

Actualmente existen microscopios capaces de crear una imagen topográfica de la célula y al mismo tiempo obtener un mapa de fuerzas de toda la superficie barrida [58]. Por lo tanto, con el método desarrollado por [56], además de tener un mapa completo de la elasticidad de las células, sería posible obtener un mapa completo sobre la viscoelasticidad de las células. En el equipo NT-MDT Spectrum Instruments, modelo Ntegra, además de poder realizar experimentos de fuerza vs. distancia también nos permite realizar experimentos de relajación.

En este capítulo, realizamos un análisis de las propiedades mecánicas de las líneas celulares MDA-MB-231 y DU-145. Con el siguiente protocolo:

1. Primero calculamos el módulo de Young de las dos líneas celulares usando el modelo de Sneddon.
2. Segundo, determinamos los parámetros viscoelásticos con las siguientes metodologías,
 - Metodología de Ting: usando curvas de fuerza vs. distancia [56].
 - Metodología de Darling: usando curvas de relajación [45].

Las dos metodologías fueron adaptadas usando diferentes modelos mecánicos para representar el módulo de relajación. Los modelos que usamos están descritos más adelante.

3. Tercero, realizamos un análisis de los parámetros viscoelásticos de las líneas celulares MDA-MB-231 y DU-145 obtenidos usando ambas metodologías.

4.2.1. Metodología usando curvas de fuerza vs. distancia (Metodología de Ting)

El modelo que permite estudiar las propiedades viscoelásticas a partir de curvas de fuerza vs. distancia fue desarrollado por Ting en 1966 [57] y empleado por Efremov *et al.* [56] en células y geles. Las ecuaciones de este modelo para un indentador cónico están dadas por:

$$F(t, \delta) = \frac{2}{1 - \nu^2} \frac{\tan \theta}{\pi} \int_0^t E_{rel}(t - \xi) \frac{\partial \delta^2}{\partial \xi} d\xi, \quad 0 \leq t \leq t_m \quad (4.1)$$

$$F(t, \delta) = \frac{2}{1 - \nu^2} \frac{\tan \theta}{\pi} \int_0^{t_1(t)} E_{rel}(t - \xi) \frac{\partial \delta^2}{\partial \xi} d\xi, \quad t_m < t \leq t_{ind}$$

En la ecuación anterior, θ representa el semi-ángulo de apertura del cono. El parámetro ν es el coeficiente de Poisson, para células se considera $\nu = 0.5$; δ es la profundidad de indentación y E_{rel} es el módulo de relajación. La función $t_1(t)$ se construye de tal forma que satisfaga la siguiente igualdad:

$$\int_{t_1(t)}^t E_{rel}(t - \xi) \frac{\partial \delta}{\partial \xi} d\xi = 0 \quad (4.2)$$

4.2.2. Metodología usando curvas de relajación (Metodología de Darling)

El modelo que permite estudiar la viscoelasticidad de las células a través de experimentos de relajación fue desarrollado por Darling *et al.* [45].

Para obtener una expresión que describa el comportamiento de relajación de esfuerzos en un experimento realizado con AFM, escribimos la ec. (2.27) que relaciona la fuerza y la indentación, como [45]:

$$F(t) = \frac{4}{3} \frac{R\delta_0^3}{1 - \nu^2} E(t) H(t), \quad (4.3)$$

donde $H(t)$ es la función de escalón unitario y δ_0 es la profundidad de indentación máxima. Transformando la ecuación anterior al espacio de Laplace:

$$\tilde{F}(s) = \frac{C}{1 - \nu^2} \frac{\tilde{E}(s)}{s}, \quad (4.4)$$

donde $C = \frac{4}{3} (R\delta_0^3)^{1/2}$.

Por otro lado $\tilde{E}(s)$ se relaciona con el módulo de relajación a través de [49]:

$$\tilde{E}(s) = 2(1 + \nu)\tilde{G}(s), \quad (4.5)$$

con $2G(s) = \frac{\tilde{\sigma}}{\tilde{\epsilon}}$, por lo tanto:

$$\tilde{E}(s) = (1 + \nu) \frac{\tilde{\sigma}}{\tilde{\epsilon}}. \quad (4.6)$$

Sustituyendo la ecuación anterior en la ec. (4.4):

$$\tilde{F}(s) = \frac{C}{1 - \nu} \frac{1}{s} \frac{\tilde{\sigma}}{\tilde{\epsilon}}. \quad (4.7)$$

En la sección 2.2.2 vimos que la función de relajación, esta dada por: $E_{rel} = \frac{1}{s} \frac{\tilde{\sigma}}{\tilde{\epsilon}}$, por lo tanto, la ecuación anterior se puede expresar como:

$$\tilde{F}(s) = \frac{C}{1 - \nu} \tilde{E}_{rel}(s). \quad (4.8)$$

Finalmente en el espacio del tiempo se expresa como:

$$F(t) = \frac{C}{1 - \nu} E_{rel}(t). \quad (4.9)$$

Como mencionamos en la sección 2.2.2 la forma de E_{rel} y por ende, la cantidad de parámetros viscoelásticos obtenidos dependen del modelo mecánico elegido.

La ec. (4.9) fue derivada partiendo de la ecuación del modelo de Hertz, donde supone un contacto entre una superficie esférica y un plano semi-infinito de donde $C = \frac{4}{3} (R\delta_0^3)^{1/2}$. Pero, dado que C depende de las geometrías del sistema, la ecuación es igualmente válida para el contacto entre dos superficies con cualquier geometría. Para el contacto entre un cono y un semi plano infinito, que es el modelo de Sneddon se tiene que $C = \frac{2}{\pi} \tan \theta \delta_0^2$. Sustituyendo C en la ec. (4.9):

$$F(t) = \frac{1}{1 - \nu} \frac{2 \tan \theta}{\pi} \delta_0^2 E_{rel}(t).$$

4.2.3. Módulo de relajación

Tanto el modelo de Ting como el modelo de Darling permiten describir el módulo de relajación, $E_{rel}(t)$, como un conjunto de resortes y amortiguadores como los descritos en el capítulo 2.

Los modelos mecánicos que usaremos para describir el módulo de relajación serán:

El modelo de sólido lineal estándar: $E_{rel}(t) = E_0 + E_1 e^{-\frac{t}{\tau}}$,

El modelo generalizado de Maxwell: $E_{rel}(t) = E_0 + \sum_{j=1}^n E_j e^{-\frac{t}{\tau_j}}$

El modelo de Ley de Potencias $E_{rel}(t) = E_0 + E_1 \frac{t^{-\alpha}}{\Gamma(1-\alpha)}$ y

El modelo fraccional de Zener: $E_{rel}(t) = E_0 + E_1 \mathcal{E}_{\alpha,1} \left(-\frac{E_1}{\eta} t^\alpha \right)$.

4.2.4. Metodología experimental

Las líneas celulares que estudiamos en este capítulo son MDA-MB-231 y DU-245. Células de cáncer de mama y cáncer de próstata respectivamente. Las líneas celulares fueron sembradas en diferentes cajas de Petri y medidas por separado. Con ambas líneas celulares usamos una punta SNL-10 de Bruker (punta triangular) con una $k_c = 0.12 \pm 0.06$ nN/m.

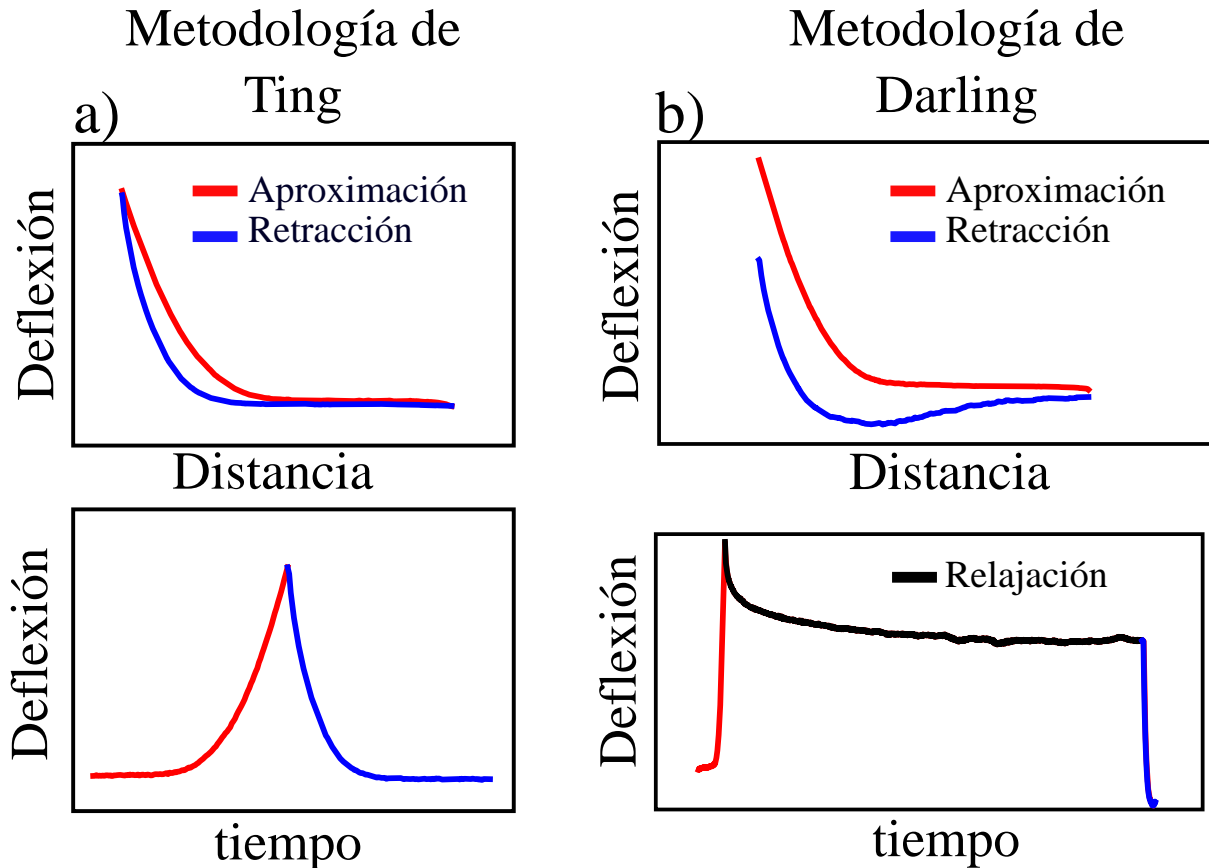


Figura 4.1: Curvas típicas obtenidas durante los experimentos realizados con las líneas celulares MDA-MB-231 y DU-145. a) Ciclo aproximación-relajación. b) Ciclo aproximación-relajación-retracción. Panel superior: Curvas de deflexión vs. distancia. Panel inferior: Curvas de deflexión vs. tiempo. Las gráficas en el tiempo fueron grabadas con un osciloscopio incluido en el AFM.

Para realizar las mediciones, localizamos la célula con el microscopio óptico, colocamos la punta sobre la célula y realizamos un ciclo de aproximación-retracción, que llamaremos ciclo1, obteniendo una curva de fuerza vs. distancia como la que se muestra en la Fig. 4.1a. Sobre la misma célula realizamos un ciclo de aproximación-relajación-retracción, que denominaremos ciclo2, obteniendo una curva de relajación, como la que se muestra en la Fig. 4.1b. Para obtener las curvas de relajación, realizamos una indentación, dejamos presionada la célula durante 60 s para medir la relajación y retiramos la punta.

Los experimentos los realizamos con una velocidad de indentación de $0.8 \mu\text{s}$. Y dejamos extender el piezoeléctrico desde 4000 nm hasta -200 nm.

4.2.5. Análisis estadístico

Para cuantificar las diferencias entre los diferentes parámetros obtenidos realizamos un análisis estadístico usando el método de Kruskal-Wallis [59]. Consideramos diferencias estadísti-

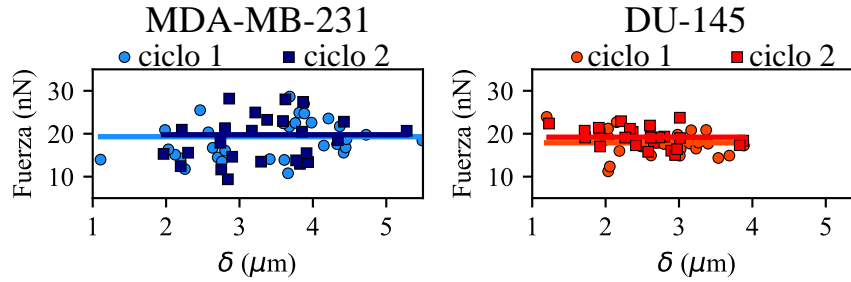


Figura 4.2: Gráfica de la fuerza vs. indentación para los experimentos realizados con las líneas celulares MDA-MB-231 y DU-145. Los \circ 's representan el ciclo 1 correspondiente al experimento de aproximación-retracción; los \square 's representan el ciclo 2, correspondiente al experimento de aproximación-relajación-retracción

camente significativas cuando se tienen valores de $p < 0.05$.

4.3. Fuerza máxima y módulo de Young

En estos experimentos, aunque controlamos el rango de extensión del piezo-eléctrico, la fuerza aplicada a las células MDA-MB-231 es similar a la fuerza aplicada a las células DU-145. No hay diferencias estadísticamente significativas entre estas fuerzas. Sin embargo, las profundidades de indentación en las células MDA-MB-231 fue mayor a la de las células DU-145. En las células MDA-MB-231 fue de $3.4 \pm 1.1 \mu\text{m}$ y de $2.7 \pm 0.6 \mu\text{m}$ en las células DU-145, tanto en el ciclo 1 como en el ciclo 2. Inspeccionando estos valores podríamos decir, que las células DU-145 son más rígidas que las células MDA-MB-231. Esto lo podemos cuantificar a través del módulo de Young.

Cuantificar el módulo de Young nos puede dar una idea del comportamiento que tendrán los parámetros viscoelásticos. Ajustamos la curva de aproximación de cada ciclo al modelo de Sneddon (Fig. 4.3). En la figura podemos ver que el módulo de Young de las células MDA-MB-231 fue el mismo en ambos ciclos, mientras que para las células DU-145 aumentó en el ciclo 2. La diferencia que hay en el módulo de Young obtenido en el ciclo 1 y el ciclo 2 para las células DU-145 es estadísticamente significativa, $p \approx 0.01$. También vemos diferencias significativas entre las dos líneas celulares, en el ciclo 1 el valor de p es menor a 0.05 y en el ciclo dos es menor a 0.005

El módulo de Young nos está indicando que las células DU-145 son ligeramente más rígidas que las células MDA-MB-231. Además, el aumento en el módulo de Young en el segundo ciclo de indentación en las células DU-145 podría estar indicando una respuesta de la célula debido al esfuerzo generado por la indentación.

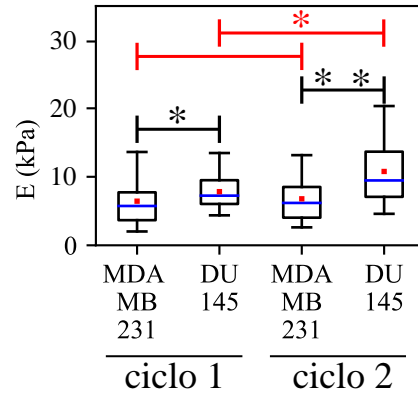


Figura 4.3: Gráfica del módulo de Young obtenido del ajuste de las curvas de aproximación con el modelo de Sneddon ec. (2.28). ciclo 1: experimento aproximación-retracción; ciclo 2: experimento aproximación-relajación-retracción. Las barras negras y rojas indican las diferencias estadísticamente significativas que hay entre los grupos señalados, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

4.4. Parámetros viscoelásticos obtenidos con diferentes metodologías experimentales

A continuación discutimos los parámetros viscoelásticos obtenidos para las células MDA-MB-231 y DU-145 usando la metodología de Ting (empleando las curvas de fuerza vs. distancia) y la metodología de Darling (usando las curvas de relajación). Los valores se encuentran tabulados en la tabla 4.1

4.4.1. Parámetro E_0

Con la metodología de Ting, el parámetro E_0 de la línea celular MDA-MB-231 es ligeramente menor al de la línea celular DU-145. Esto ocurre para todos los modelos excepto en el SLS. La diferencia que hay entre el valor de MDA-MB-231 y DU-145 es significativa únicamente con el modelo GM, con $p < 0.05$.

Con la metodología de Darling observamos un comportamiento contrario al observado en la metodología de Ting. En este caso, el valor obtenido para las células DU-145 es mayor al obtenido en las células MDA-MB-231. Este comportamiento se presenta con los modelos SLS, GM y FZ. La diferencia es estadísticamente significativa, $p < 0.005$ con los tres modelos. Con el modelo de ley de potencias este parámetro tiende a cero. Las diferencias observadas entre las líneas celulares MDA-MB-231 y DU-145 con la metodología de Darling es similar a las observadas en el módulo de Young en el ciclo 2.

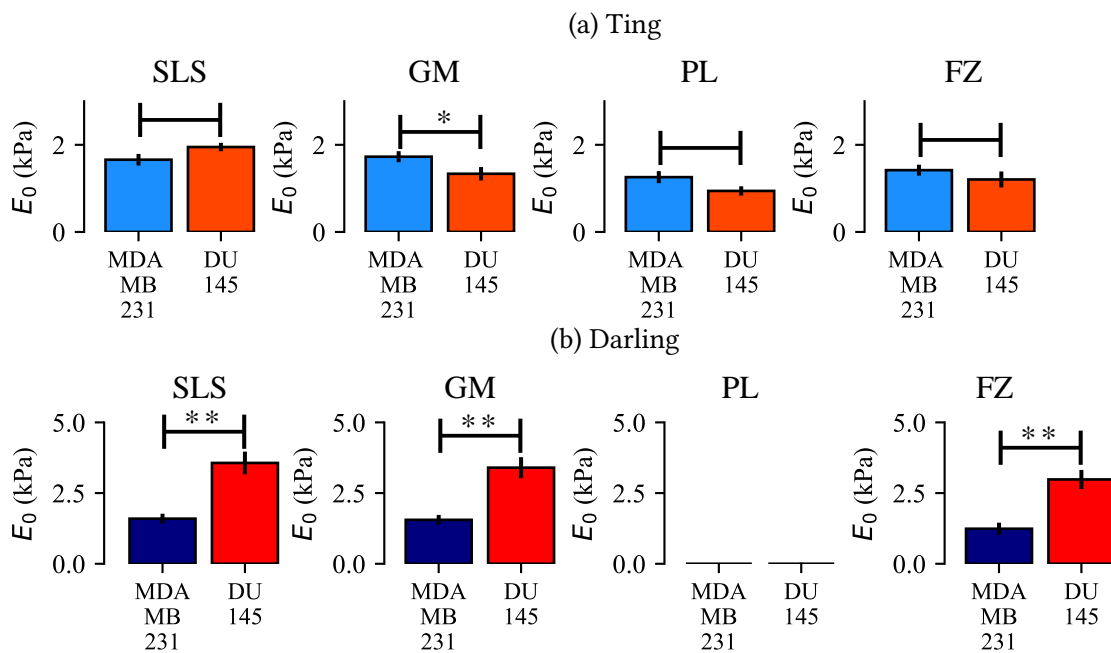


Figura 4.4: Valores obtenidos para el parámetro E_0 empleando a) el método de Ting y b) el método de Darling, representando la función de relajación (E_{rel}) con los modelos SLS, GM, PL y FZ. Los valores se muestran como la mediana \pm el error estándar.

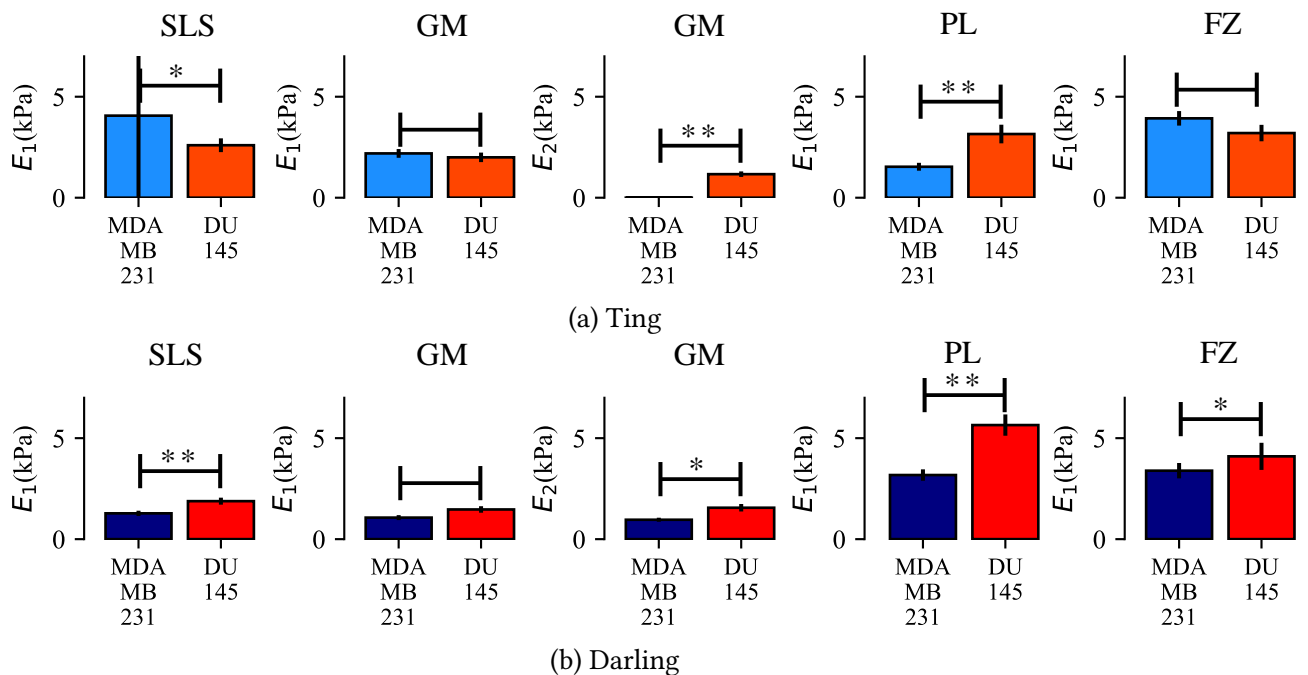


Figura 4.5: Valores obtenidos para el parámetro E_1 empleando a) el método de Ting y b) el método de Darling, representando la función de relajación (E_{rel}) con los modelos SLS, GM, PL y FZ. Los valores se muestran como la mediana \pm error estándar.

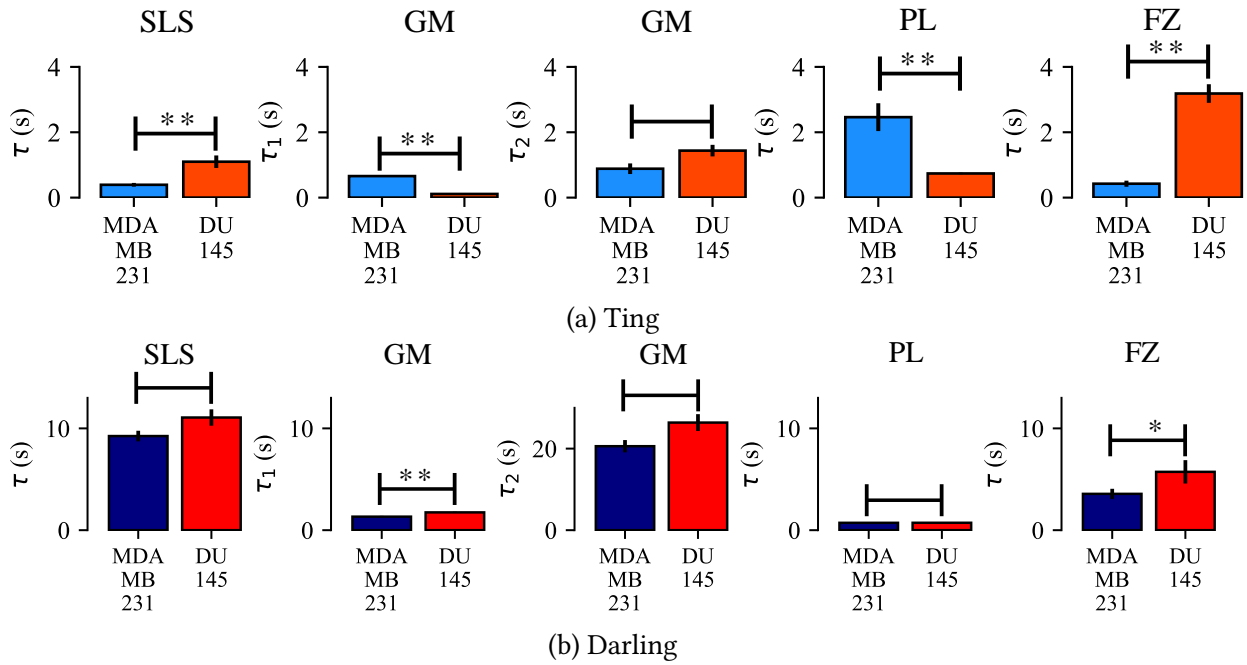


Figura 4.6: Valores obtenidos para el tiempo de relajación empleando a) el método de Ting y b) el método de Darling, representando la función de relajación (E_{rel}) con los modelos SLS, GM, PL y FZ. Los valores se muestran como la mediana \pm el error estándar.

4.4.2. Parámetro E_1

Para el parámetro E_1 obtuvimos diferentes comportamientos entre los distintos modelos, usando la metodología de Ting. Con los modelos SLS y FZ el valor de MDA-MB-231 fue menor al de DU-145, aunque la diferencia fue significativa únicamente con el modelo SLS. Con los modelos GM y PL el valor de DU-145 es mayor al de MDA-MB-231, siendo significativa esta diferencia, $p < 0.05$.

Con la metodología de Darling, el valor de E_1 para las células MDA-MB-231 es menor que el de las células DU-145. Con todos los modelos observamos esta tendencia, Fig. 4.5b. En todos los casos la diferencia significativa. Con los modelos SLS y PL el valor de p es menor a 0.005. En el caso del modelo generalizado de Maxwell las diferencias las observamos en el parámetro E_2 , con $p < 0.05$. Con el modelo fraccional el valor de p es menor a 0.05.

4.4.3. Parámetro τ

Con la metodología de Ting, la línea celular MDA-MB-231 muestra menor tiempo de relajación que DU-145 con los modelos SLS y FZ. Con el modelo GM, el tiempo de relajación corto (τ_1), de la línea celular MDA-MB-231 es más grande que el de DU-145, mientras que el tiempo de relajación largo (τ_2) es más grande para DU-145, aunque esta diferencia no es significativa. Con el modelo PL vemos que el tiempo de relajación de las células MDA-MB-231 es mayor que en las células DU-145.

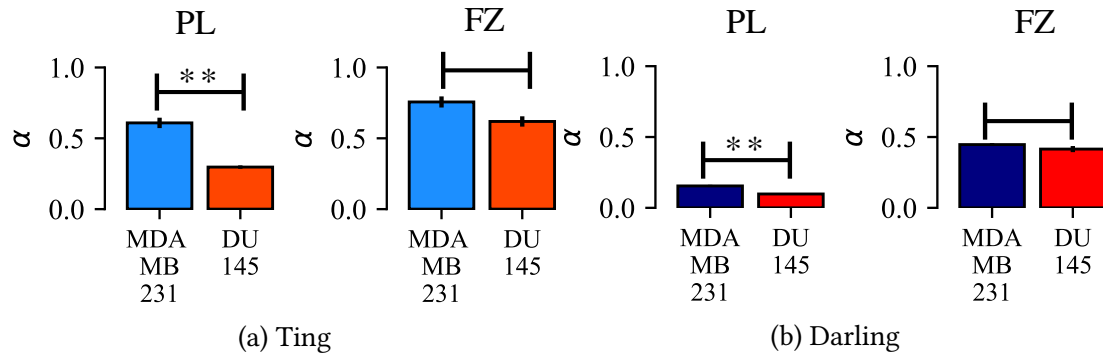


Figura 4.7: Valores obtenidos para el parámetro α empleando a) el método de Ting y b) el método de Darling, representando la función de relajación (E_{rel}) con los modelos PL y FZ. Los valores se muestran como la mediana \pm el error estándar.

Con la metodología de Darling, es más consistente la diferencia entre el tiempo de relajación de las células MDA-MB-231 y el de las células DU-145 4.6b. Con el modelo SLS el tiempo de relajación de las células MDA-MB-231 es menor al de las células DU-145, pero la diferencia no es significativa. Con el modelo GM, los tiempos de relajación, τ_1 y τ_2 , de las células MDA-MB-231 son menores a los de las células DU-145. Con el modelo PL no hay diferencias en este parámetro. Con el modelo FZ, el tiempo de relajación de la línea celular MDA-MB-231 es menor al de la línea DU-145, siendo significativa esta diferencia, $p < 0.05$.

4.4.4. Parámetro α

Con la metodología de Ting el parámetro el valor de α de las células MDA-MB-231 es mayor al de las células DU-145, tanto con el modelo PL como con el modelo FZ, Fig. 4.7a. Con la metodología de Darling el valor de α de las células MDA-MB-231 es mayor al de las células DU-145, con una diferencia estadísticamente significativa, $p < 0.05$. Con el modelo FZ el valor de α para la línea celular MDA-MB-231 es ligeramente mayor al de la línea celular DU-145 pero la diferencia no es significativa.

El parámetro α se encuentra entre cero y uno. En el modelo de ley de potencias, cuando el valor de α es cero, el elemento fraccional de la Fig. 2.9b se convierte en un resorte. Teniendo así un resorte conectado en paralelo a otro resorte. Por lo tanto, cuando α está cercano a cero, el comportamiento del material es más cercano al de un sólido elástico. Cuando $\alpha = 1$, el elemento fraccional de la Fig. 2.9b se convierte en un amortiguador y por lo tanto representa el modelo de Kelvin-Voight, el cual representa el comportamiento de un sólido viscoelástico.

En el modelo fraccional de Zener cuando $\alpha = 0$, el elemento fraccional de la Fig. 2.9c se convierte en un resorte, es decir, se tiene un resorte conectado en paralelo a dos resortes que están conectados en serie. Cuando $\alpha = 1$ se recupera el modelo SLS. Con el modelo PL el valor de α fue diferente entre las líneas celulares, con las dos metodología vemos que la línea celular DU-145. Con el modelo FZ no observamos diferencias estadísticamente significativas en este valor.

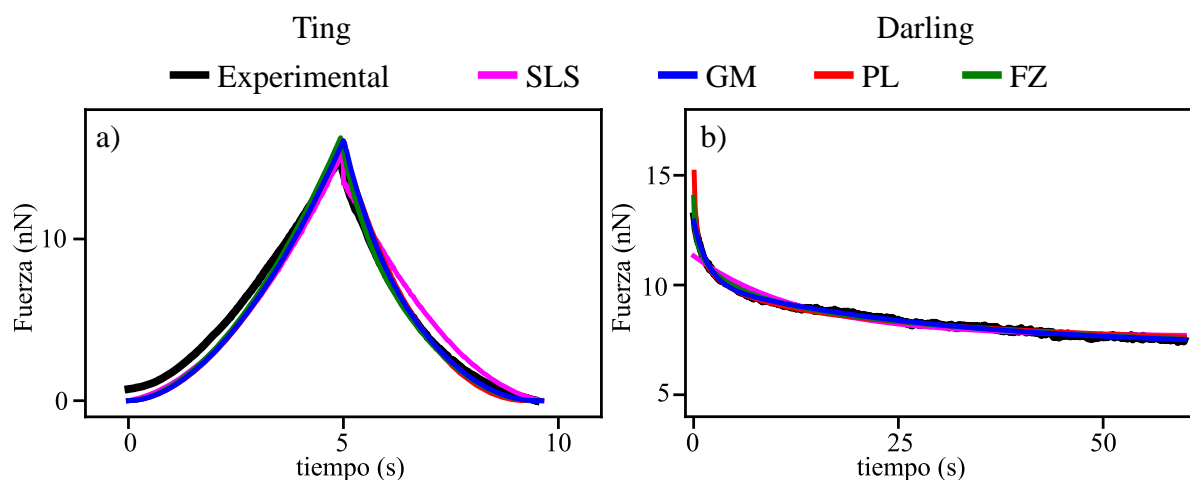


Figura 4.8: Gráfica del ajuste de una curva típica de a) fuerza vs. distancia, b) relajación. Representando la función de relajación con los modelos SLS, GM, PL y FZ.

4.4.5. Ajustes

Utilizamos la metodología de Ting y la metodología de Darling empleando diferentes modelos para representar el módulo de relajación. Los modelos que usamos fueron el SLS, GM, PL y FZ. Los ajustes, con los diferentes modelos, para una curva típica con la metodología de Ting se muestran en la Fig. 4.8a. La región donde se observa un cambio en los ajustes con los diferentes modelos es en $t > 5$ s, como se observa en la Fig. 4.9. Para esa curva en particular, el mejor ajuste se tiene con el modelo FZ, le sigue el GM, después el PL y al final el SLS. Sin embargo, esto no se presenta con todas las células, existen algunos casos donde el mejor ajuste se tiene con el modelo SLS, como podemos ver en la Fig. 4.10a.

Los ajustes con los diferentes modelos en una curva típica de relajación se muestran en la Fig. 4.8b. En estas curvas las deficiencias en los ajustes se observan principalmente en los primeros 10 segundos 4.9b. Con esta metodología los mejores ajustes los obtuvimos con los modelos GM y FZ, le siguen el modelo PL y por último el SLS. Esto se cumple para todas las células, como observamos en la Fig. 4.10b.

4.4.6. Observaciones generales

En las células DU-145 el módulo de Young fue más grande con la segunda indentación, es indicativo de una respuesta de la célula ante el esfuerzo producido por la punta. Sin embargo, en las células MDA-MB-231 no vemos este comportamiento. Por lo tanto, es posible que algunas líneas celulares sean más sensibles ante un esfuerzo generado.

Con la metodología de Ting la información que obtenemos con los diferentes modelos, para los parámetros E_1 y τ no es consistente (véase los datos en la tabla 4.1). Por ejemplo, el modelo SLS nos dicen que el parámetro E_1 de las células MDA-MB-231 es mayor al de las células DU-145, mientras que el modelo GM y el PL nos dice lo contrario. Para el tiempo de relajación, los

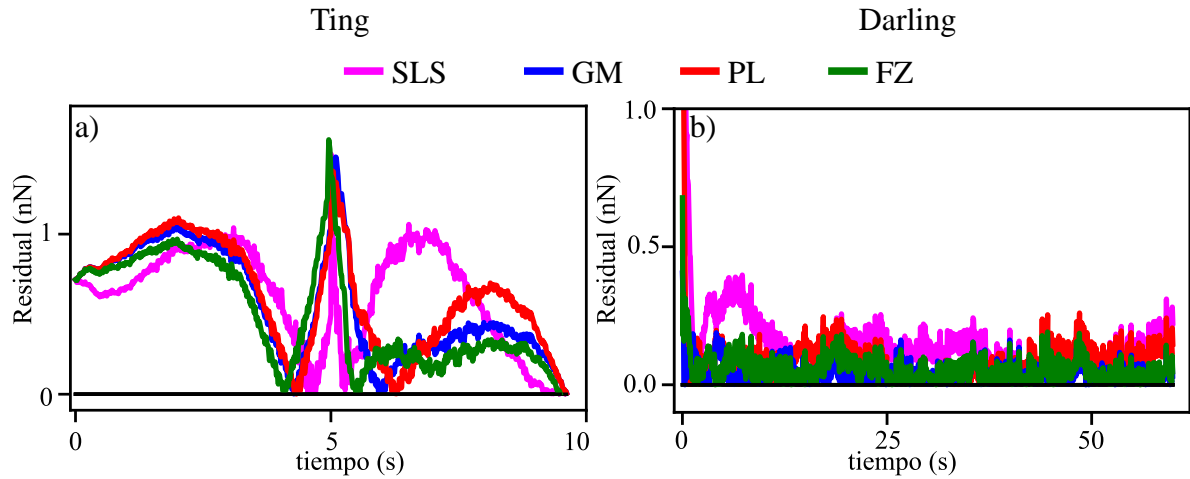


Figura 4.9: Gráfica del residual a lo largo del tiempo del ajuste en una curva típica de a) fuerzas vs. distancia, b) relajación. El residual fue calculado mediante $|y_{0i} - y_i|$, donde y_{0i} representa el valor medido y y_i el valor calculado.

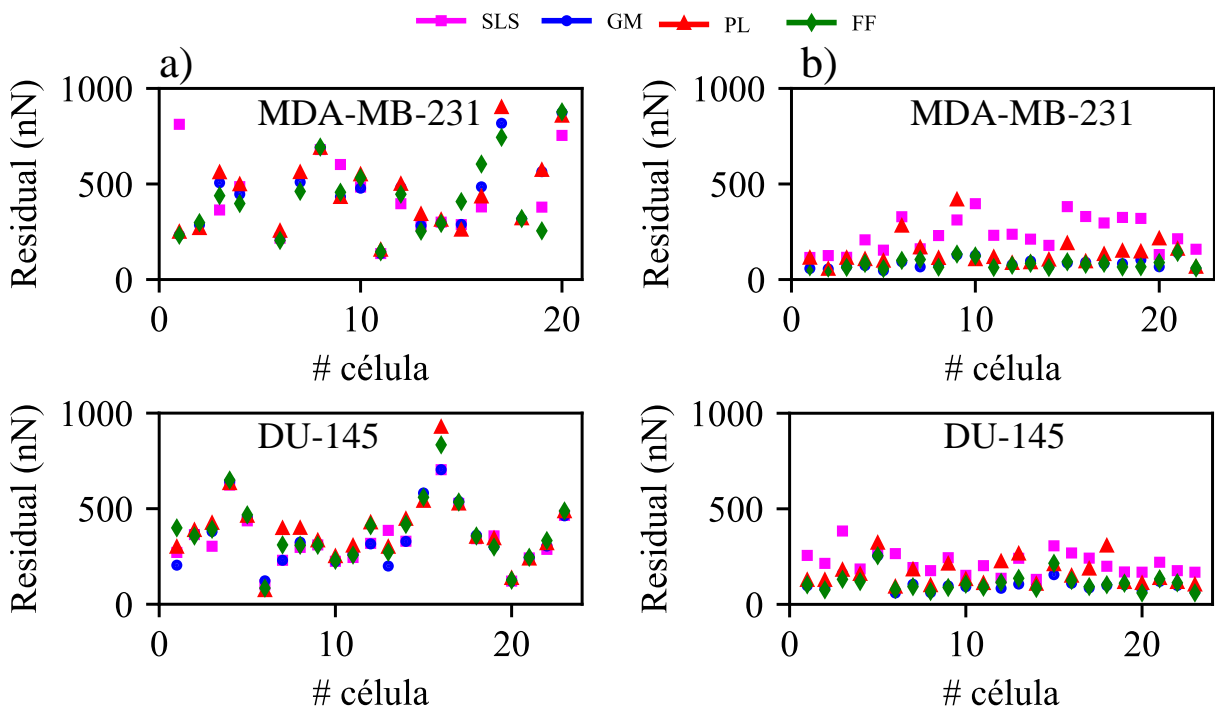


Figura 4.10: Gráfica de los residuales de los ajustes para cada célula medida. El residual fue calculado mediante $\sum_i |y_{0i} - y_i|$, donde y_{0i} representa el valor medido y y_i el valor calculado.

modelos SLS y FZ nos dicen que el tiempo de relajación de las células MDA-MB-231 es menor al de las células DU-145, contrario a lo que obtenemos con el modelo GM, en τ_1 , y el modelo PL donde vemos que el tiempo de relajación de las células MDA-MB-231 es mayor al de las células DU-145.

Con la metodología de Darling la información obtenida con los diferentes modelos es más consistente (véase los datos en la tabla 4.1). En todos los casos observamos que los parámetros elásticos y el tiempo de relajación de MDA-MB-231 son menores a los de DU-145.

Existen diversos factores que pueden estar causando las inconsistencias que hay en los parámetros obtenidos con el método de Ting.

- El número de cálculos involucrados a la hora de determinar los parámetros. Recordemos que la función del método de Ting no tiene una forma analítica, sino que debemos construirla partir de datos experimentales. En esta construcción realizamos derivadas numéricas y resolvemos la integral de la ec. (4.2) mediante métodos numéricos. Con más procesos involucrados podríamos estar originando errores más grandes.
- Considerar la velocidad de indentación constante cuando transformamos las curvas de fuerza vs. distancia en curvas de fuerza vs. tiempo [56].
- La imprecisión de los ajustes. Como es el caso del modelo SLS.
- La cantidad de parámetros libres a ajustar. como es el caso del modelo GM donde hay hasta 5 parámetros que se pueden ajustar.

El modelo de ley de potencias y el modelo fraccional tienen pocos parámetros libres y logran generalmente buen ajuste.

En la metodología de Ting analizamos el comportamiento del material desde $t = 0$ s hasta $t = 10$ s.

En la metodología de Darling la curva de relajación comienza después de alcanzar la indentación máxima que es en $t = 5$ s y observamos hasta $t = 60$ s. Por lo tanto, probablemente estamos observando escalas de tiempos distintos.

Desde el punto de vista experimental, es más fácil obtener curvas de fuerza vs. distancia que las curvas de relajación. Respecto al análisis de datos, el tiempo computacional para aplicar el método de Ting es mayor que el requerido con el método de Darling. Si representamos la función de relajación con los modelos SLS, PL y GM, el tiempo de análisis para una curva típica con la metodología de Ting, en una computadora con procesador CORE i5, es de unos minutos, mientras que con la metodología de Darling es de unos segundos. Además, con el método de Ting hay un incremento considerable en el tiempo de cómputo al aumentar el número de parámetros libres. Con la metodología de Darling no es evidente este cambio. Cuando usamos el modelo FZ para representar el módulo de relajación, el tiempo de cómputo crece debido a

Sólido lineal estándar												
Método	E_0 (kPa)		E_1 (kPa)		E_2 (kPa)		τ_1 (s)		τ_2 (s)		α	
	MDA-MB-231	DU-145	MDA-MB-231	DU-145	MDA-MB-231	DU-145	MDA-MB-231	DU-145	MDA-MB-231	DU-145	MDA-MB-231	DU-145
Ting	1.6±0.6	1.9 ± 0.45	4.06 ± 70	2.6 ± 1.6	-	-	0.39 ± 0.30	1.09 ± 0.9	-	-	-	-
Darling	1.6 ± 0.8	3.6 ± 1.8	1.2 ± 0.6	1.8 ± 0.7	-	-	9.2 ± 2.5	11.0 ± 3.8	-	-	-	-
Generalizado de Maxwell												
Ting	1.7 ± 0.6	1.3 ± 0.8	2.1 ± 1.1	2.0 ± 1.2	0	1.1 ± 0.7	0.7 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.9 ± 0.8	1.4 ± 0.9	-	-
Darling	1.5 ± 0.8	3.4 ± 1.7	1.0 ± 0.5	1.5 ± 0.7	0.9 ± 0.5	1.6 ± 0.9	1.3 ± 0.4	1.7 ± 0.3	20.6 ± 7.4	26.4 ± 9.0	-	-
Ley de Potencias												
Ting	1.2 ± 0.7	0.9 ± 0.6	1.5 ± 1.0	3.1 ± 2.4	-	-	2.4 ± 2.3	0.7 ± 0.1	-	-	0.6 ± 0.2	0.3 ± 0.06
Darling	0	0	3.1 ± 1.3	5.6 ± 2.2	-	-	0.7 ± 0.08	0.7 ± 0.05	-	-	0.15 ± 0.04	0.1 ± 0.01
Fraccional de Zenner												
Ting	1.4 ± 0.5	1.2 ± 0.8	3.9 ± 1.6	3.2 ± 1.8	-	-	0.4 ± 0.3	3.2 ± 1.4	-	-	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.1
Darling	1.0 ± 0.9	2.9 ± 1.3	3.0 ± 1.6	4.5 ± 2.9	-	-	3.6 ± 2.7	6.7 ± 6.2	-	-	0.45 ± 0.04	0.41 ± 0.08

Tabla 4.1: Parámetros viscoelásticos para MDA-MB-231 y DU-145 obtenidos combinando el modelo generalizado de Maxwell (GM) con la metodología de Ting y la metodología de Darling. Los valores son presentados como la mediana \pm desviación estándar. Los valores atípicos fueron excluidos.

la complejidad de la función. En una computadora con procesador CORE i5 el ajuste de una curva típica con la metodología de Darling es de aproximadamente 2 minutos, mientras que con la metodología de Ting el análisis tarda alrededor de 15 horas.

A mayor cantidad de parámetros a ajustar en un modelo se espera que coincida mejor con los datos experimentales. Siguiendo esto, el modelo que debería ajustar mejor es el GM sin embargo, con la metodología de Ting no sucede de esta manera, Fig. 4.10a. Con la metodología de Darling si observamos buen ajuste con el modelo generalizado de Maxwell pero también tenemos buen ajuste con el modelo fraccional de Zener, Fig. 4.10b. En todas las curvas se logra buen ajuste con estos modelos.

En resumen

	Ting				Darling			
	SLS	GM	PL	FZ	SLS	GM	PL	FZ
Ejecución del experimento	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✗	✗
Tiempo de análisis	✓	✗	✓	✗	✓	✓	✓	✗
Calidad de ajuste	✗	✓	✓	✓	✗	✓	✓	✓
Diferencias entre las células	✗	✗	✓	✓	✗	✓	✓	✓

4.5. Conclusiones

Obtuvimos las propiedades visco-elásticas de las líneas celulares MDA-MB-231 y DU-145, utilizando dos metodologías: Darling y Ting. Para cada metodología utilizamos los modelos SLS, GM, PL y FZ y realizamos una comparación de cada uno de los parámetros para cada línea celular.

El módulo de Young obtenido para las células MDA-MB-231 en el primer ciclo es igual al obtenido en el segundo ciclo. En las células DU-145 observamos que su módulo aumentó en el segundo ciclo, lo que indica que la célula está respondiendo al esfuerzo aplicado por la indentación. Dicho de otra forma, la línea celular DU-145 es sensible a los esfuerzos ejercidos por la punta del AFM, lo cual nos indica que esta línea celular es mecano-sensible en esta escala de fuerza (≈ 20 nN).

El modelo fraccional de Zener ajusta muy bien en todas las curvas de relajación, sin embargo, en las curvas de fuerza *vs.* distancia no ocurre lo mismo, aunque es el logra un mejor ajuste para la mayoría de las células estudiadas. Con la metodología de Ting hay algunas inconsistencias entre los parámetros obtenidos con los diferentes modelos. Mientras que con la metodología de Darling la información es consistente.

El modelo fraccional de Kelvin (modelo de ley de potencias) y el modelo fraccional de Zener son los más adecuados para modelar el comportamiento de las células MDA-MB-231 y DU-145. Con el modelo fraccional de Kelvin, el parámetro que nos dio mayor información es el exponente α mientras que en el modelo fraccional de Zener es el tiempo de relajación. Además, la información que arrojan estos parámetros con la metodología de Ting son consistentes con la información que nos dan estos parámetros cuando empleamos la metodología de Darling, a pesar de que, estamos observando escalas de tiempo diferentes. Con la metodología de Ting analizamos el comportamiento del material desde $t = 0$ s hasta $t = 10$ s, y con la metodología de Darling, desde $t = 5$ s, que corresponde al tiempo que tarda en alcanzar la indentación máxima, hasta $t = 60$ s, correspondiente al tiempo en el que medimos la relajación.

Capítulo 5

Efecto de la doxorubicina en las propiedades mecánicas de HT-29

5.1. Resumen

En este capítulo estudiamos las propiedades morfológicas, elásticas y viscosas de células de cáncer colorrectal HT-29, utilizando la técnica de microscopía de fuerza atómica. Además, examinamos los cambios en sus propiedades visco-elásticas cuando son expuestas a la droga doxorubicina. Las propiedades elásticas fueron medidas con los modelos de Hertz y Sneddon. Para obtener los parámetros visco-elásticos de las células usamos cuatro modelos distintos: el modelo de sólido lineal estándar, el generalizado de Maxwell, el de ley de potencias y el Frener fraccional.

5.2. Introducción

Los procesos celulares como el crecimiento, motilidad, apoptosis, etc, son altamente dependientes del comportamiento mecánico [42]. Estos factores son determinantes en la proliferación de células cancerosas. Por ejemplo, las células malignas se caracterizan por ser más suaves que su contraparte normal [60, 8], esta reducción en la rigidez ha sido correlacionada con un aumento en la capacidad invasiva y migratoria de las células [27, 8].

El cáncer de colon representa la tercera causa de muerte a nivel mundial. La doxorubicina, fármaco usado en quimioterapias contra el cáncer, ha demostrado ser eficiente en la inhibición de varias líneas celulares cancerosas, incluyendo HT-29 [61, 62].

En este trabajo investigamos las propiedades mecánicas de la línea celular HT-29, un adenocarcinoma de colon humano. También observamos como afecta la doxorubicina a sus pro-

propiedades visco-elásticas. Estudiamos tres grupos de células HT-29: células sin tratar y células expuestas a doxorrubicina durante 24 h y 48 h.

Para estudiar las propiedades mecánicas de las células obtuvimos curvas de fuerza vs distancia y curvas de fuerza vs tiempo usando AFM. Para esto, usamos diferentes tamaños de puntas: una de 8 nm de radio, con geometría cónica y una de 30 μm de radio, con geometría esférica. La fuerza máxima aplicada fue de ≈ 15 nN con la punta coloidal y ≈ 30 nN con la punta cónica. La velocidad de indentación fue $\approx 0.6 \mu\text{m/s}$.

El módulo de Young fue calculado ajustando las curvas de fuerza-distancia con el modelo de Hertz en el caso de la punta coloidal y el modelo de Sneddon en el caso de la punta cónica. Los parámetros visco-elásticos fueron calculados a partir del ajuste de las curvas de fuerza-tiempo usando cuatro modelos diferentes: el modelo de sólido lineal estándar, el generalizado de Maxwell, el de ley de potencias y el fraccional de Zenner.

Realizamos una comparación para evaluar la confiabilidad de cada modelo a los datos experimentales. Usando el AFM en modo de imagen pudimos relacionar los datos mecánicos con sus propiedades morfológicas.

5.3. Efectos en la morfología de la membrana

Los efectos de las drogas comienzan a notarse al cabo de varios días en un microscopio óptico. Sin embargo, no es posible identificar si los daños son superficiales (únicamente en la membrana) o internos (afectando el citoesqueleto), causando una reestructuración al interior de la célula, la misma que llevaría a cambios en las propiedades mecánicas. Tener una medida cuantitativa de los cambios morfológicos que sufren las células cuando son expuestas a algún tratamiento nos podría ayudar a entender mejor el mecanismo de acción de la droga.

Para estudiar el efecto de la doxorrubicina en la superficie de la membrana plasmática, medimos la rugosidad (R_{RMS}) en imágenes de $5 \times 5 \mu\text{m}$ obtenidas sobre la superficie de la célula, Fig. 5.1 a-c. No fue posible obtener imágenes de células en su medio de cultivo, ya que las células se despegaban por la interacción entre la punta y la muestra durante el escaneo. Por tanto, optamos por fijar las células con glutaraldehído, dejarlas secar y escanearlas en aire. Se ha reportado que las células fijas modifican sus propiedades morfológicas, sin embargo, estos cambios no son aleatorios si se mantienen las mismas condiciones ([63]).

Las imágenes fueron analizadas usando la ec. (3.4):

$$R_a = \frac{1}{N_x N_y} \sum_{j=1}^{N_y} \sum_{i=1}^{N_x} |Z_{ij} - \mu|,$$

$$R_{RMS} = \sqrt{\frac{1}{N_x N_y} \sum_{j=1}^{N_y} \sum_{i=1}^{N_x} (Z_{ij} - \mu)^2},$$

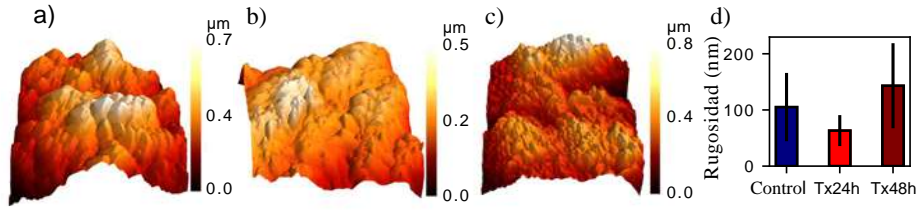


Figura 5.1: Imágenes de AFM de células HT-29. Vista topográfica tridimensional de $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ para a) control, b) Tx24h y c) Tx48h. d) Rugosidad promedio de la membrana celular, las barras de error representan la desviación estándar.

$Z_{ij} = Z(X_i, Y_i)$ es una función discreta sobre el plano XY mientras que N_x y N_y son los puntos a lo largo del eje X y el eje Y respectivamente. μ es el valor medio de las alturas dado por

$$\mu = \frac{1}{N_x N_y} \sum_{j=1}^{N_y} \sum_{i=1}^{N_x} Z_{ij}.$$

Los resultados de la rugosidad se muestran en la Fig. 5.1d. Observamos que la rugosidad en Tx24h disminuyó con respecto a las muestras control. De manera inversa, la rugosidad en Tx48h fue mayor que en la muestra control. Esto sugiere que la doxorubicina tiene un efecto dependiente del tiempo en las células HT-29.

5.4. Módulo de Young

El módulo de Young lo obtuvimos realizando un ajuste a las curvas de fuerza-distancia mostradas en la Fig. 5.2. En las curvas obtenidas con la sonda coloidal ajustamos con el modelo de Hertz ec. (2.27):

$$F(\delta) = \frac{4E_2}{3(1-\nu_2^2)} \sqrt{R_1} \delta^{3/2}.$$

En las mediciones con la punta cónica ajustamos las curvas con el modelo de Sneddon ec. (2.28):

$$F(\delta) = \frac{2E \tan \theta}{\pi(1-\nu^2)} \delta^2.$$

Los resultados se muestran en la Fig. 5.3. Observamos una disminución en la rigidez (*i.e.* módulo de Young más pequeño) en las células tratadas, tanto en las mediciones con la punta coloidal (Fig. 5.3 a) como en las mediciones con cónica (Fig. 5.3 b). La disminución observada fue estadísticamente significativa para ambos tratamientos ($p < 0.005$). Pero no hubo diferencias

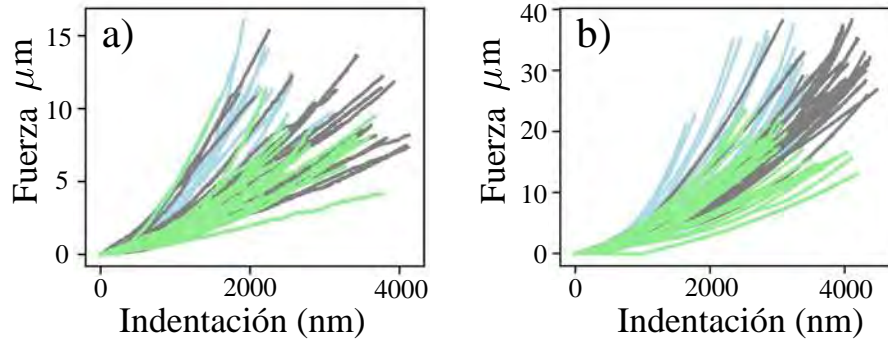


Figura 5.2: Curvas de fuerza vs. distancia obtenidas durante un experimento de indentación en células HT-29. a) Curvas obtenidas con la punta coloidal. b) Curvas obtenidas con la punta cónica. Las líneas azules pertenecen al grupo control, las líneas grises al grupo Tx24h y las líneas verdes a Tx48h.

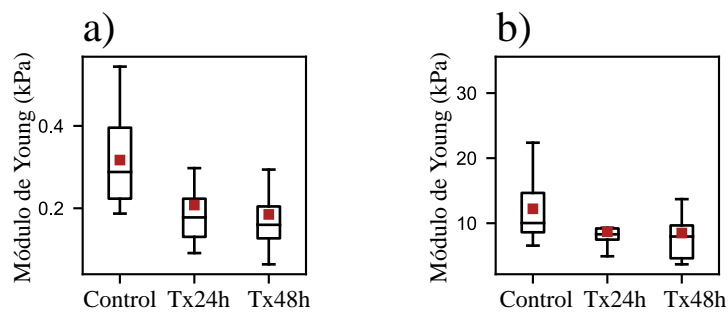


Figura 5.3: Diagrama de caja del módulo de Young de la línea celular HT-29 obtenido de las mediciones con a) una sonda coloidal y b) una punta cónica. ** $p < 0.005$

significativas en el efecto del tiempo de tratamiento ($p = 0.6$ para la punta coloidal y 0.3 para la punta cónica).

Calculamos el módulo de Young en la indentación máxima para cada célula sin tomar en cuenta la rigidez de esfuerzo debido al efecto del substrato. En la Fig. 5.8 mostramos el efecto del substrato en el módulo de Young de acuerdo al método descrito por [64]. Aunado a esto, hay otras incertidumbres en el cálculo del módulo de Young tales como la determinación del punto de contacto. Por tanto, es posible que no tengamos un valor preciso para el módulo de Young pero aún podemos discutir el efecto cuantitativo de la droga en la elasticidad.

Observamos que el módulo de Young de células HT-29 disminuyó con los tratamientos de doxorubicina. Se ha reportado que la doxorubicina actúa en la reorganización de la actina [65, 66]. Dado que la estabilidad del citoesqueleto depende de la organización de la actina, por lo tanto, observamos esta disminución del módulo de Young. Sin embargo, el mecanismo de acción de las diferentes drogas usadas en quimioterapia para diferentes líneas celulares no muestra una tendencia. Por ejemplo, [67] reportó que la doxorubicina aumenta el módulo de Young de células de cáncer de pulmón A549. Tratamientos de Nocodazol (despolimerizador de microtúbulos) en células y fibrosarcoma también aumentan el módulo de Young [68]. Por otro lado, para células de cáncer de colon HCT116 tratadas con $\text{TNF}\alpha$ (Factor- α de necrosis tumoral) [69] y células cancerosas de Hela e Ishikawa tratadas con Paclitaxel (agente estabilizador de microtúbulos) [70] reportaron una disminución en el módulo de Young. Por tanto, el estudio del módulo de Young no proporciona un panorama completo sobre la efectividad de un tratamiento, ya que depende del tipo de droga y del tipo de célula cancerosa.

Para dar un significado físico del módulo de Young debemos tomar en cuenta la geometría y el tamaño de la punta. Si la punta tiene unos cuantos nanómetros de diámetro, la mayor parte de las contribuciones a la fuerza surgen de los componentes locales de la membrana. Cuando el radio de la punta es del orden de micras, las contribuciones vienen de la membrana y del citoesqueleto ([71]). El módulo de Young muestra la misma tendencia decreciente con la duración de los tratamientos en ambos tipos de puntas, pero difieren en un orden de magnitud (Fig. 5.3). Esto sugiere que las contribuciones al módulo de Young son de los mismos componentes de la célula. La diferencia en la magnitud es causada probablemente por las mediciones de los componentes locales, usando la punta cónica y de toda la célula, con la punta coloidal. Medimos un promedio del módulo de Young de 317 ± 100 Pa, y una mediana de 290 Pa con la punta coloidal para el grupo de células control. [72] reportó un módulo de Young de 331.67 Pa para células HT-29 no tratadas usando la técnica de aspiración por micropipeta. Estos resultados confirman que nuestras mediciones con la punta coloidal corresponden a las contribuciones de la membrana y del citoesqueleto.

5.5. Viscoelasticidad

Para una descripción más completa del efecto causado por la droga en células cancerosas, estudiamos propiedades mecánicas suplementarias tales como la viscosidad y el tiempo de relajación. Realizamos curvas de fuerza vs. tiempo y las analizamos usando los modelos mecánicos que describen los materiales como cuerpos elásticos (SLS, GM, FZ, y PL) la tarea que nos toca ahora es la de elegir un modelo adecuado que ajuste a las mediciones realizadas y que su interpretación física sea adecuada.

5.5.1. Modelos mecánicos: Relajación de esfuerzos

La expresión que usamos para obtener los parámetros visco-elásticos en un experimento de relajación de esfuerzos está dada por la ec. 4.9

$$F(t) = \frac{C}{1 - \nu} E_{rel}(t).$$

donde E_{rel} es el módulo de relajación y su forma depende del modelo mecánico elegido. La constante C depende de la geometría de la punta. Para el contacto entre una superficie esférica y un plano semi-infinito (modelo de Hertz), $C = \frac{4}{3} (R\delta_0^3)^{1/2}$. Para el contacto entre un cono y un semi plano infinito (modelo de Sneddon), $C = \frac{2}{\pi} \tan \theta \delta_0^2$.

Modelo de Solido Lineal Estándar

La función de relajación del modelo SLS esta dada por la ec. (2.60):

$$E_{rel} = E_0 + E_1 e^{-\frac{t}{\tau}},$$

Por tanto, sustituyendo en la ec. (4.9) tenemos que la ecuación de ajuste del modelo SLS esta dada por:

$$F(t) = \frac{C}{1 - \nu} \left(E_0 + E_1 e^{-\frac{t}{\tau}} \right), \quad (5.1)$$

donde E_0 y E_1 son las constante elásticas de los resortes. El símbolo τ es el tiempo de relajación definido como

$$\tau = \frac{\eta}{E_1}. \quad (5.2)$$

Con el modelo SLS (ec. (5.1)), los parámetros a ajustar fueron E_0 , E_1 y τ . La viscosidad (η) la obtuvimos de E_1 y τ con la ec. (5.2). Todos los parámetros de los tratamientos fueron comparados con los obtenidos en control. En las mediciones usando la punta coloidal, los parámetros

elásticos y viscosos disminuyeron y el tiempo de relajación aumentó con ambos tratamientos; estos cambios fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$) en todos los parámetros excepto en η y τ con el tratamiento Tx48h. Para la punta cónica los parámetros elásticos y viscosos mostraron valores más pequeños que control, con diferencias estadísticamente significativas en E_1 ($p < 0.005$) para Tx24h y E_1 ($p < 0.005$), η ($p < 0.05$) y τ ($p < 0.05$) para Tx48h. Los resultados de estos parámetros de ajuste, normalizados con los valores obtenidos para las muestras de control se muestran en la Fig. 5.4a.

Modelo Generalizado de Maxwell

La función de relajación del modelo GM esta dada por la ec. (2.71):

$$E_{rel} = E_0 + \sum_{j=1}^n E_j e^{-\frac{t}{\tau_j}}.$$

En este caso, sustituyendo en la ec. (4.9) la ecuación de ajuste del modelo GM esta dada por:

$$F(t) = \frac{C}{1-\nu} \left[E_0 + \sum_{i=1}^2 E_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \right]. \quad (5.3)$$

Esta ecuación tiene dos tiempos de relajación dados por:

$$\tau_i = \frac{\eta_i}{E_i}; \quad i = 1, 2. \quad (5.4)$$

En la ec. (5.3) los parámetros de ajuste son: E_0 , E_1 , E_2 , η_1 , η_2 , τ_1 , y τ_2 . Los parámetros η_1 y η_2 fueron obtenidos a partir de E_1 , τ_1 y E_2 , τ_2 respectivamente, siguiendo la ec. (5.4). Con la punta coloidal, observamos una disminución en los parámetros elásticos y viscosos y un incremento en el tiempo de relajación, con los tratamientos. Los cambios fueron estadísticamente significativos en E_0 , E_1 y E_2 ($p < 0.05$) para ambos tratamientos; también para η_1 con el tratamiento Tx24h ($p < 0.05$). En las mediciones usando la punta cónica el parámetro E_0 no fue estadísticamente diferente al de control. El resto de los parámetros elásticos y viscosos disminuyeron y los tiempos de relajación aumentaron; con $p < 0.05$ para E_0 en el tratamiento de 48h y para E_1 , E_2 , η_1 y τ_1 de ambos tratamientos. Los resultados para este modelo se muestran en la Fig. 5.4b.

Modelo Fraccional de Zener

La función de relajación del modelo FZ esta dada por la ec. (2.94):

$$E_{rel} = E_0 + \mathcal{E}_{\alpha,1} \left(-\frac{E_1}{\eta} t^\alpha \right).$$

Por tanto, sustituyendo la ecuación anterior en la ec. (4.9), la ecuación de ajuste del modelo FZ tiene la forma:

$$F(t) = \frac{C}{1-\nu} \left[E_0 + E_1 \varepsilon_{\alpha,1} \left(-\frac{E_1}{\eta} t^\alpha \right) \right]. \quad (5.5)$$

Haciendo un análisis de unidades en la ecuación anterior, el tiempo de relajación queda definido como:

$$\tau = \left(\frac{\eta}{E_1} \right)^{1/\alpha}. \quad (5.6)$$

A partir del modelo FZ (ec. (5.5)), se obtiene los mismos parámetros que en el modelo SLS: E_0 , E_1 , η y τ , así como un parámetro adicional α , el cuál representa el orden fraccional. Los resultados de estos parámetros de ajuste se muestran en la Fig. 5.4c. Con la punta cónica, E_0 y E_1 disminuyeron con ambos tratamientos, ($p < 0.05$); el parámetro η disminuyó pero no fue estadísticamente significativo. El tiempo de relajación aumentó, siendo estadísticamente significativo sólo para Tx24h ($p < 0.05$) y α aumentó ligeramente sin una diferencia estadística significativa. En las mediciones que obtuvimos con la punta cónica, E_0 aumentó ligeramente para Tx24h y disminuyó para Tx48h, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas; el parámetro E_1 disminuyó y τ aumentó con ambos tratamientos ($p < 0.005$). El valor de α aumentó ligeramente con los tratamientos.

Modelo de ley de potencias

La función de relajación del modelo PL esta dada por la ec. (2.89):

$$E_{rel} = E_0 + E_1 \frac{t^{-\beta}}{\Gamma(1-\beta)}.$$

Sustituyendo la ecuación anterior en la ec. (4.9), tenemos que la ecuación de ajuste del modelo PL esta dada por:

$$F(t) = \frac{C}{1-\nu} \left[E_0 + \frac{E_1}{\Gamma(1-\beta)} \left(\frac{t}{\tau} \right)^{-\beta} \right]. \quad (5.7)$$

Con la ec. (5.7), los parámetros a ajustar fueron E_0 , E_1 , τ y β . En las mediciones obtenidas con la punta cónica, el parámetro E_1 disminuyó con los tratamientos ($p < 0.005$), β disminuyó en ambos tratamientos ($p < 0.05$). El parámetro E_0 tiende a cero y $\tau \simeq 1$ en todos los tratamientos con ambas puntas. La Fig. 5.4d muestra los parámetros obtenidos para Tx24h y Tx48h normalizados con los valores obtenidos para control. El parámetro E_0 fue omitido, ya que su valor tiende a cero.

5.5.2. Comportamiento visco-elástico

A continuación discutiremos el significado que tiene cada parámetros en los diferentes modelos.

El parámetro E_0 representa la resistencia residual (tiempos largos) medido cuando la célula, a la fuerza aplicada, deja de deformarse. Por lo tanto, pequeños valores de E_0 corresponden a células más deformables. También extrajimos información de el parámetro elástico instantáneo (E_1), *i.e.* la resistencia que opone la célula al comienzo de la deformación bajo el esfuerzo aplicado. Dado que los contribuciones a la elasticidad vienen del los componentes del citoesqueleto podemos relacionar E_1 a la organización de la estructura del cotoesqueleto para tiempos cortos. La viscosidad (η) se relaciona con la disipación de energía y del esfuerzo aplicado, también se puede ver como la resistencia a fluir. Observamos que los valores viscosos y elásticos obtenidos de los experimentos con la punta cónica difieren en un orden de magnitud con los obtenidos de las mediciones con la punta esférica, como pasa con el módulo de Young. Observamos una disminución de η con los tratamientos, por tanto, las células tratadas son más fluidas que el control. El valor más representativo de η viene del modelo SLS, para las células control $\eta = 1.4 \pm 0.5 \text{ kPa} \cdot \text{s}$ medida con la punta coloidal. Este valor es, sin embargo, 10^6 veces mas grande que la viscosidad del agua pura, pero del orden de magnitud de la viscosidad de cizalla de suspensiones coloidales de esfera dura en fracciones de alto volumen ([73]).

De las ecuaciones (5.2) y (5.6) para el modelo normal y el modelo fraccional, obtenemos un tiempo de relajación característico τ . Lo podemos interpretar como la habilidad de auto-cicatrizarse de la célula, o de auto-ensamblar su estructura interna, después de experimentar una deformación grande. Un τ grande sugiere que la célula requiere más tiempo para reorganizar su estructura y llevarla a una forma sin estrés. In vivo, las células sufren deformaciones constantemente en su ambiente natural en una escala de tiempo biológico (t_b). La naturaleza ha proporcionado a las células un tiempo de relajación corto para superar estas deformaciones naturales.

El número de Deborah (De) describe el comportamientos de materiales bajo deformaciones tomando en cuenta el tiempo de relajación y el tiempo de deformación, (t_b en el caso de procesos celulares), y se define como $De = \tau/t_b$. Cuando $De < 1$, se tiene un material tipo fluido; $De \sim 1$ un material visco-elástico y $De \gg 1$ un material tipo sólido. Las células son visco-elásticas, *i.e.* $De \sim 1$, se comportan como un gel suave. Por tanto, la célula tiene suficiente tiempo para reorganizar su estructura durante la deformación aplicada, si $De \ll 1$ implica que el comportamiento elástico es muy débil, por tanto la célula no soportará su presión interna. Si de alguna manera τ aumenta, implicando que $De \gg 1$, entonces la célula se comportará como un material tipo sólido y la reorganización de su estructura durante una deformación será muy lenta, produciendo la ruptura de la membrana celular y por lo tanto la fuga del material intracelular. Por lo tanto, un mecanismo de acción de los tratamientos contra el cáncer puede ser la alteración de τ , afectando la auto-cicatrización o el soporte estructural de la célula. Para

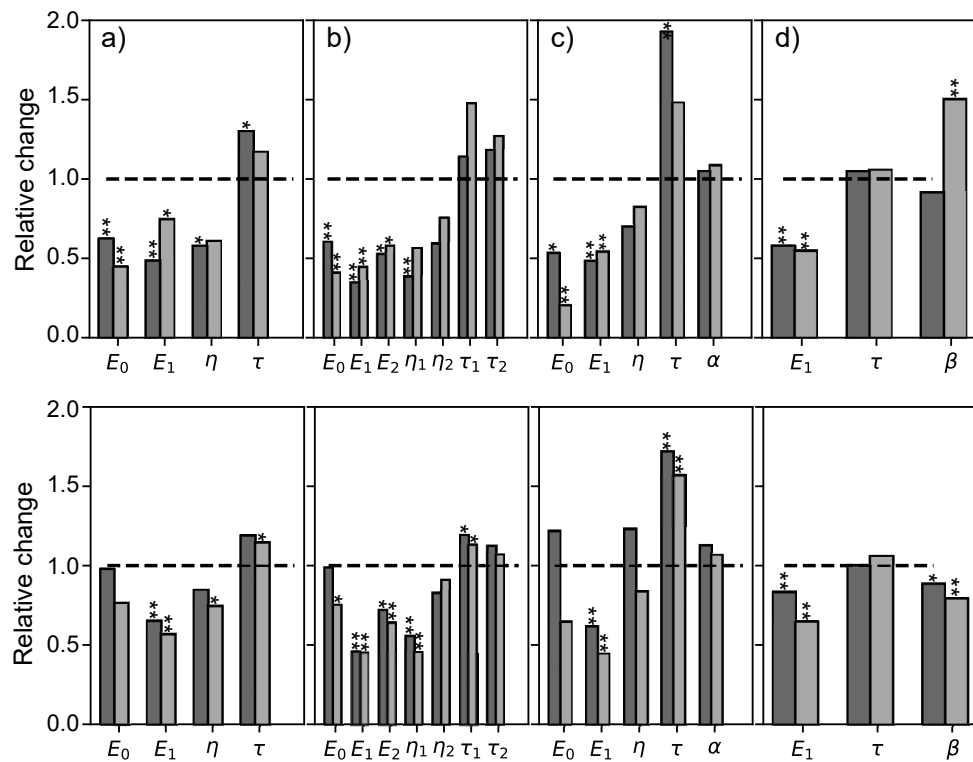


Figura 5.4: Parámetros obtenidos con la sonda coloidal en el panel superior para los modelos: a) SLS, b) GM, c) FZ model y d) PL. El color gris oscuro representa Tx24h y el color gris claro representa Tx48h. Los datos fueron normalizados con los valores de las medianas del grupo control indicado con la línea punteada. El valor de los parámetros se encuentran en las tablas 5.1 y 5.2. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$

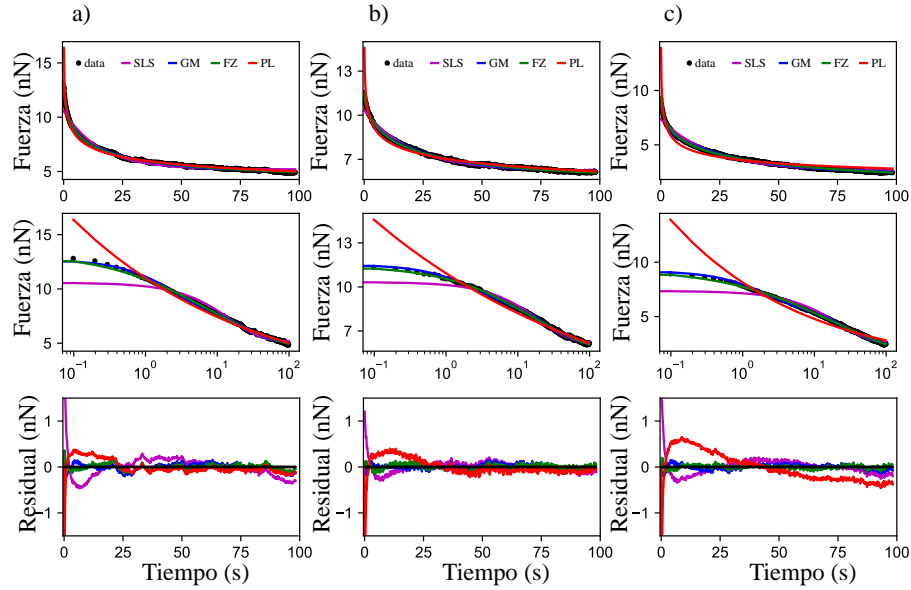


Figura 5.5: Parte superior: Ajustes obtenidos para las curvas de fuerza-tiempo usando el modelo SLS (línea punteada rosa), GM (línea punteada azul), FZ (línea punteada verde) y PL (línea punteada roja) para a) control, b) Tx24h y c)Tx48h. Centro: Curva de fuerza-tiempo semi-logarítmica mostrando las diferencias en el ajuste para cada modelo. Parte inferior: Residuales a lo largo del tiempo obtenidos con sus modelos correspondientes. Las curvas fueron medidas usando una sonda coloidal. Los puntos negros representan los datos experimentales.

lograr una medición correcta del tiempo de auto-cicatrización (τ), es necesario aplicar indentaciones grandes para alcanzar los componentes estructurales internos de la célula, los cuáles proporcionan rigidez y soporte. Suponemos que estos resultados muestran como reacciona la célula a la exposición a la droga. Con el modelo FZ y PL también obtenemos los parámetros α y β , respectivamente, que son considerados como un índice de memoria [74], y toman valores en el rango $[0, 1]$, mientras más cercano a uno mayor la pérdida de memoria.

Las células HT-29 presentaron una disminución en la elasticidad instantánea y la viscosidad con el tratamiento de la droga, mientras que el tiempo de relajación aumentó. Comportamientos similares en el módulo elástico, la viscosidad y τ se han encontrado en otras células [75]. Con la punta cónica, esta disminución fue gradual con el tiempo, mientras que con la sonda coloidal la disminución fue mayor a las 24 h de tratamiento que a las 48 h. Algunos de estos aumentos o disminuciones en el valor de los parámetros con el tiempo de exposición fue solamente cualitativo, pero podemos describir una tenencia dentro del error experimental. Sin embargo, τ presentó mayor incremento a las 24 h que a las 48 h, con ambas puntas, sugiriendo que τ puede ayudar a entender la respuesta de la célula bajo tratamiento, independientemente del tamaño de punta. Además, la diferencia en el orden de magnitud que existe entre el módulo de Young obtenido con la punta coloidal y el obtenido con la punta cónica también está presente en los módulos elásticos y viscosos medidos con los modelos de relajación. Sin embargo, en τ no hay tal diferencia, más aun, el τ obtenido con la punta cónica está dentro

del error del tiempo de relajación obtenido con la punta esférica, como mostramos en la tabla 5.1 y 5.2. Por tanto, esta similitud en los tiempos de relajación, sugieren que las respuestas medidas provienen de los mismos componentes de la célula en ambas geometrías, [76] debido a las grandes deformaciones aplicadas.

El aumento en τ sugiere que el tratamiento pueden considerarse como supresor de las proteínas que proveen soporte a la célula, por tanto afecta la auto-cicatrización de la célula durante las deformaciones. Este efecto también puede observarse en E_0 , ya que las células tratadas mostraron una disminución en este parámetro, indicando un reblandecimiento en los enlaces que conforman la estructura del citoesqueleto, o de la estructura interna de la célula. Para la punta cónica este efecto se observó después de 48 h de exposición a la droga.

En el mecanismo de acción propuesto de doxorubicina, se ha indicado que se forman especies reactivas de oxígeno (ROS) y se reducen los componentes que contrarrestan ROS son reducidos [77]. Las propiedades encontradas a las 24 h de tratamiento podrían significar que la célula se transforma por el efecto del ROS y el agotamiento de los mecanismos contrarrestantes. ROS afecta a todos los componentes celulares, como el ADN, los lípidos de membrana y las proteínas del citoesqueleto. Los cambios observados a las 48 h representan la célula en un estado donde todas las reacciones han seguido su curso, y la célula ya no tiene ningún mecanismo disponible para hacer frente a los cambios. En tiempos posteriores, las células ya no estaban unidas a la superficie.

Otro parámetro que puede jugar un papel importante en la caracterización de las células y su respuesta a algún tratamiento, es el orden del operador fraccional (para el caso de modelo fraccionales). Para las muestras control encontramos valores similares para este parámetro con ambos tamaños de punta. En el modelo FZ los valores fueron 0.53 ± 0.06 , y 0.51 ± 0.03 ; en el modelo PL los valores fueron 0.16 ± 0.02 , y 0.21 ± 0.03 para la sonda coloidal y la punta cónica respectivamente. El comportamiento de los parámetros α y β es diferente debido a la naturaleza de los modelos, no obstante, nuestros resultados sugieren que la cuantificación de este índice de memoria puede considerarse como una propiedad intrínseca de la célula, sin embargo, más información es necesaria de diferentes células y diferentes materiales.

5.5.3. Comparación entre modelos visco-elásticos

En el modelo FZ obtuvimos un valor de $\alpha \approx 0.5$, aunque el valor no es cercano a 1 el comportamiento de estos parámetros fue similar a los del modelo SLS. Por otro lado, los parámetros obtenidos del modelo GM fueron ligeramente diferentes a los obtenidos con los modelos FZ y SLS.

Es de esperar que, aunque el número de parámetros de los tres modelos es diferente, el comportamiento del tiempo de relajación sea similar ya que τ es la relación de viscosidad a elasticidad instantánea. Por lo tanto, la elección de un modelo sobre otro que pueda describir bien el cam-

bio que sufren las células, como consecuencia de la acción del medicamento, es crucial.

Para la elección del modelo, debemos tener en cuenta la precisión de los ajustes y el número de parámetros libres. En las figuras 5.5 y 5.6 mostramos una gráfica comparativa de la precisión de los modelos usados.

Observamos que el modelo FZ presentó mejor ajuste a los datos experimentales que el modelo SLS, de acuerdo con los resultados obtenidos por [41]. Los modelos que ajustaron mejor los datos fueron el FZ y el GM tal y como se observa en las Figs. 5.5 y 5.6.

El modelo GM tiene más parámetros libres para ajustar, debemos asignar valores a cinco de ellos: E_0 , E_1 , E_2 , τ_1 , y τ_2 . Dado que no tenemos suficiente información para determinar cual de todos los posibles conjuntos de parámetros describen el comportamiento del sistema, seríamos escépticos con la elección de este modelo, a menos que incluyamos parámetros obtenidos de datos independientes a los de relajación.

El modelo FZ tiene cuatro parámetros para ajustar, los cuáles pueden ser restringidos usando las condiciones del experimento y consideraciones matemáticas. El modelo PL también contiene cuatro parámetros para ajustar, sin embargo hay un modulo infinito cuando $t \rightarrow 0$. Esta singularidad produce un ajuste pobre, y por tanto pérdida de información al inicio e la relajación (ver residuales en la Fig. 5.5 y 5.6)

Debemos remarcar que el comportamiento asintótico de la función de Mittag-Leffler tiene la forma: $\varepsilon_\alpha(-t^\alpha) \approx 1 - t^\alpha/\Gamma(1 + \alpha)$, cuando $t \rightarrow 0$ y $\varepsilon_\alpha(-t^\alpha) \approx t^{-\alpha}/\Gamma(1 - \alpha)$ cuando $t \rightarrow \infty$. Por tanto, el modelo FZ se reduce al modelo PL cuando $t \rightarrow \infty$. Más aún en la Fig. 5.7 puede observarse un mejor ajuste con el modelo FZ. Por estas razones, sugerimos que el modelo FZ puede ser el mejor modelo para describir el comportamiento mecánico de la célula.

Observamos que el modelo SLS y PL fallan al ajustar los datos experimentales a tiempos cortos y precisamente en esta región E_1 y η son sensibles. Todos los modelos han realizado un buen ajuste en tiempos largos, por lo tanto, los valores obtenidos para E_0 con los diferentes modelos son consistentes. Estos resultados respaldan el hecho de que un buen ajuste en toda la curva experimental proporcionará un modelado correcto de toda la respuesta mecánica.

5.6. Conclusión

Estudiamos las propiedades mecánicas de la línea celular HT-29 de cáncer de colon y los cambios producidos por la doxorrubicina a dos tiempos diferentes de exposición usando imágenes de AFM y curvas de fuerza. La morfología fue estudiada en células fijas y secas mientras que las propiedades mecánicas fueron estudiadas en células en su medio de cultivo.

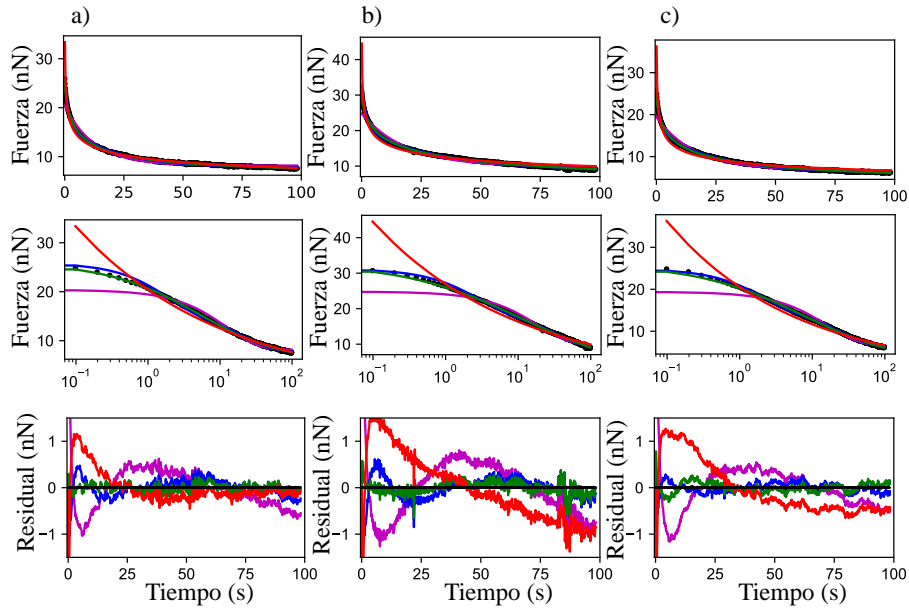


Figura 5.6: Parte superior: Ajustes obtenidos para las curvas de fuerza-tiempo usando el modelo SLS (línea punteada rosa), GM (línea punteada azul), FZ (línea punteada verde) y PL (línea punteada roja) para a) control, b) Tx24h y c) Tx48h. Centro: Curva de fuerza-tiempo semi-logarítmica mostrando las diferencias en el ajuste para cada modelo. Parte inferior: Residuales a lo largo del tiempo obtenidos con sus modelos correspondientes. Las curvas fueron medidas usando una punta cónica. Los puntos negros representan los datos experimentales.

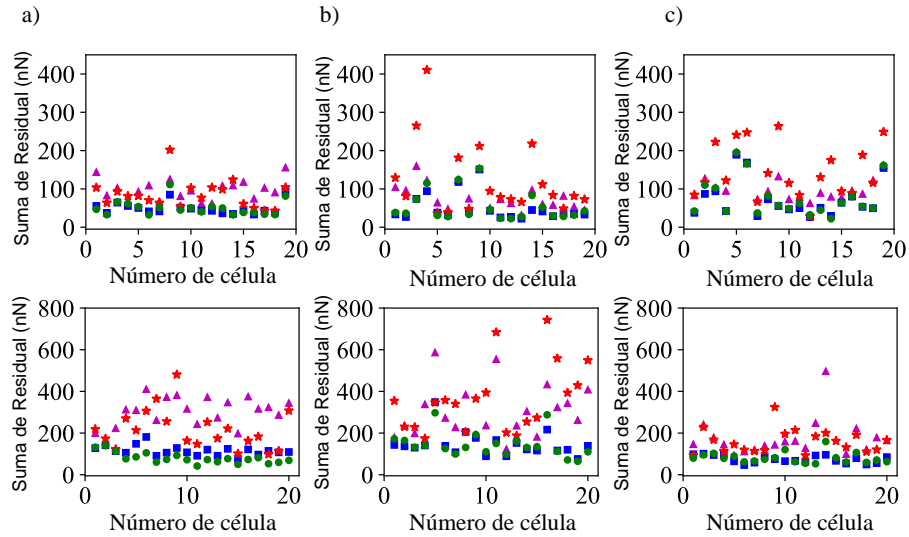


Figura 5.7: Suma de los residuales de los ajustes de las curvas de relajación para a) Control, b) Tx24h, c) Tx48h con la punta coloidal (parte superior) y la punta cónica (parte inferior). Modelo SLS (Δ), modelo GM (\square), FZ model (\circ), (\star). Suma de residual = $\sum |y_i - y_{0i}|$, siendo y_i el valor esperado y y_{0i} el valor experimental en el punto i .

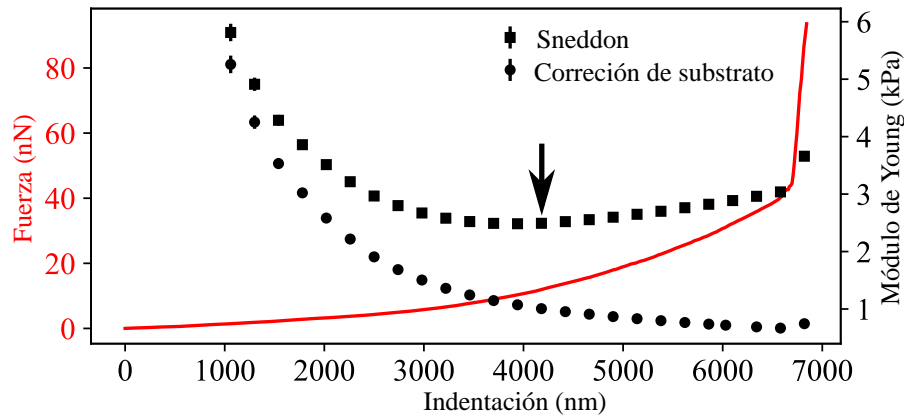


Figura 5.8: Panel superior: Curva de fuerza durante un ciclo de aproximación-retracción para una célula HT-29 del grupo control en una indentación completa usando una punta cónica. El punto de contacto se determinó en el cero. Panel inferior: Fuerza vs indentación (línea sólida) para la curva de aproximación en el panel superior, y módulo de Young (símbolos rellenos) obtenidos a partir del ajuste de la línea roja con la ec. (2.28). El efecto del sustrato se observa en indentaciones grandes. Los círculos rellenos muestran el módulo de Young calculado con el modelo corregido usando el método de Gavara 2012 [64] y los cuadrados rellenos muestran el módulo de Young calculado con el modelo no corregido. La flecha negra indica el inicio del endurecimiento en el módulo de Young. Cuando la punta alcanza el fondo, la fuerza medida crece abruptamente.

Obtuvimos las propiedades mecánicas a través de las curvas de fuerza-distancia, y fuerza-tiempo, usando una sondas coloidales y puntas cónicas. Analizamos los datos usando cuatro diferentes modelos que describen la célula como un sistema elástico o visco-elástico. Con el módulo de Young fuimos capaces de distinguir entre células tratadas y no tratadas, pero no fue posible distinguir entre células con 24 h y 48 h de tratamiento. Observamos que el tiempo de relajación es un buen candidato para estudiar el efecto de un tratamiento farmacológico, ya que su comportamiento es independiente del tamaño de la punta.

Los modelos visco-elásticos dieron una mejor descripción del efecto de la doxorubicina en la estructura celular. Con los datos morfológicos y visco-elásticos, encontramos que la doxorubicina produce cambios en las células HT-29 que dependen del tiempo de exposición a la droga, a pesar de que la morfología y los parámetros visco-elásticos se midieron en diferentes condiciones (fijados en el aire, sin fijar en el líquido, respectivamente). Por lo tanto, el efecto de las drogas en células cancerosas puede distinguirse mejor a partir de las propiedades visco-elásticas que únicamente del módulo de Young.

El modelo SLS comparado con su versión fraccional, permanece como una aproximación a la información visco-elástica, ya que no ajusta bien los datos experimentales. El modelo PL, en su forma matemática presentada aquí, representa la versión fraccional del modelo de Kel-

Modelo	Muestra	E_0 (kPa)	E_1 (kPa)	E_2 (kPa)	η_1 (kPa·s)	η_2 (kPa·s)	τ_1 (s)	τ_2 (s)	α o β
SLS	Control	0.09 ± 0.03	0.08 ± 0.03	–	1.36 ± 0.05	–	15.5 ± 2.5	–	–
	Tx24h	0.05 ± 0.02 ^{**}	0.04 ± 0.02 ^{**}	–	0.79 ± 0.30 [*]	–	20.23 ± 5.61	–	–
	Tx48h	0.04 ± 0.01 ^{**}	0.06 ± 0.02 [*]	–	0.83 ± 0.48	–	18.21 ± 7.69	–	–
FZ	Control	0.06 ± 0.03	0.16 ± 0.05	–	0.6 ± 0.18	–	10.39 ± 4.02	–	0.53 ± 0.06
	Tx24h	0.03 ± 0.02 [*]	0.08 ± 0.03 ^{**}	–	0.42 ± 0.11	–	21.08 ± 12.2 [*]	–	0.56 ± 0.11
	Tx48h	0.01 ± 0.05 ^{**}	0.09 ± 0.03 ^{**}	–	0.49 ± 0.30	–	16.19 ± 10.5	–	0.58 ± 0.08
GM	Control	0.08 ± 0.03	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.12 ± 0.05	1.63 ± 0.78	1.75 ± 0.37	26.15 ± 3.02	–
	Tx24h	0.05 ± 0.02 ^{**}	0.02 ± 0.01 ^{**}	0.03 ± 0.01 [*]	0.05 ± 0.03 ^{**}	0.97 ± 0.49	2.0 ± 0.74	30.91 ± 10.64	–
	Tx48h	0.03 ± 0.01 ^{**}	0.03 ± 0.02 ^{**}	0.04 ± 0.02 [*]	0.06 ± 0.05	1.23 ± 0.95	2.6 ± 0.97	33.21 ± 16.01	–
PL	Control	0	0.19 ± 0.05	–	–	–	1.03 ± 0.06	–	0.21 ± 0.03
	Tx24h	0	5.19 ± 1.31 [*]	–	–	–	1.09 ± 0.06	–	0.16 ± 0.04 ^{**}
	Tx48h	0	4.04 ± 1.69 ^{**}	–	–	–	1.09 ± 0.06	–	0.16 ± 0.04 ^{**}

Tabla 5.1: Parámetros visco-elásticos para HT-29, Tx24h y Tx48h obtenidos con el modelo de sólido lineal estándar (SLS), el modelo Fraccional de Zener (FZ), el modelo Generalizado de Maxwell (GM) y el modelo de Ley de Potencias (PL) para la punta coloidal. Los valores son presentados como la mediana ± desviación estándar. El * significa que los datos son estadísticamente diferentes comparados con control con $*p < 0.05$ y $**p < 0.005$.

vin Voigt. Este modelo presenta dificultades para ajustar al inicio de la relajación debido a su singularidad en $t = 0$. Cuando comparamos los modelos GM y FZ, los parámetros de este último son mas sencillos y puede ser más fácil comprender su significado físico al realizar experimentos similares en diferentes muestras.

Se necesita más investigación para determinar el tipo de muestras y qué condiciones se beneficiarían de usar un modelo u otro. La mecánica celular es un muy buen candidato para la aplicación de cálculo fraccional. Donde otros modelos necesariamente simplifican el sistema, el cálculo fraccional describe la complejidad del sistema en un solo parámetro.

Modelo	Muestra	E_0 (kPa)	E_1 (kPa)	E_2 (kPa)	η_1 (kPa·s)	η_2 (kPa·s)	τ_1 (s)	τ_2 (s)	α $\alpha\beta$
SLS	Control	2.24 ± 0.9	3.07 ± 0.82	–	42.25 ± 13.73	–	14.46 ± 1.12	–	–
	Tx24h	2.19 ± 0.66	2.0 ± 0.71**	–	35.76 ± 15.36	–	17.19 ± 6.20	–	–
	Tx48h	1.71 ± 0.67	1.74 ± 0.74**	–	31.43 ± 18.68*	–	16.58 ± 4.49*	–	–
FZ	Control	1.15 ± 0.69	5.95 ± 1.74	–	16.85 ± 5.22	–	7.75 ± 1.56	–	0.51 ± 0.03
	Tx24h	1.40 ± 1.14	3.66 ± 1.48**	–	20.73 ± 7.14	–	13.30 ± 9.76**	–	0.57 ± 0.08
	Tx48h	0.75 ± 0.66	2.64 ± 1.69**	–	14.1 ± 8.83	–	12.17 ± 7.9**	–	0.54 ± 0.09
GM	Control	2.06 ± 0.87	2.71 ± 0.73	2.12 ± 0.71	4.91 ± 1.32	58.12 ± 18.07	1.87 ± 0.20	27.06 ± 3.26	–
	Tx24h	2.04 ± 0.76	1.25 ± 0.43**	1.53 ± 0.58*	2.73 ± 1.71**	48.12 ± 25.43	2.23 ± 0.41*	30.47 ± 11.47	–
	Tx48h	1.55 ± 0.63*	1.22 ± 0.65**	1.36 ± 0.56**	2.23 ± 1.33**	52.89 ± 36.36	2.12 ± 0.56*	28.91 ± 13.22	–
PL	Control	0	6.23 ± 1.87	–	–	–	1.03 ± 0.06	–	0.21 ± 0.03
	Tx24h	0	5.19 ± 1.31	–	–	–	1.03 ± 0.16	–	0.18 ± 0.05*
	Tx48h	0	4.04 ± 1.69**	–	–	–	1.09 ± 0.06	–	0.16 ± 0.04**

Tabla 5.2: Parámetros visco-elásticos para HT-29, Tx24h y Tx48h obtenidos con el modelo de sólido lineal estándar (SLS), el modelo Fraccional de Zener (FZ), el modelo Generalizado de Maxwell (GM) y el modelo de Ley de Potencias (PL) para la punta cónica. Los valores son presentados como la mediana ± desviación estándar. El * significa que los datos son estadísticamente diferentes comparados con control con $*p < 0.05$ y $**p < 0.005$.

Capítulo 6

Propiedades mecánicas de células de osteosarcoma durante el proceso de regeneración de tejido óseo

6.1. Resumen

Una característica importante del tejido óseo es su capacidad de regenerarse. Aunque es un proceso normal de este tejido, existen condiciones que retrasan o inhiben su regeneración, tales como enfermedades congénitas, cáncer o lesiones que involucran pérdidas de hueso en grandes cantidades. Superar estos factores es un desafío en el área de la medicina. Para lograrlo se han empleado biomateriales que ayudan a la regeneración de este tejido. La hidroxiapatita es un material que favorece la formación de cristales de calcio haciendo efectiva la regeneración de tejido óseo. En este capítulo usamos las células de osteosarcoma para estudiar el efecto que produce la hidroxiapatita en las propiedades mecánicas de estas células.

En primer lugar analizamos el comportamiento que tienen los parámetros visco-elásticos de células de osteosarcoma con diferentes cargas aplicadas. Además, estudiamos el efecto que produce la hidroxiapatita y las nano-partículas de plata en las propiedades mecánicas de las células de osteosarcoma. En este proceso se analizan tres cultivos distintos, un grupo control y dos grupos experimentales: en donde se ha agregado hidroxiapatita; y otro grupo diferente para estudiar el efecto conjunto de la hidroxiapatita y las nano-partículas de plata.

6.2. Introducción

Uno de los desafíos que enfrentan en medicina al realizar reconstrucciones faciales para corregir malformaciones congénitas es el proceso de regeneración de tejido óseo. Estas reconstrucciones requieren de injertos del tejido y el éxito o el fracaso de este procedimiento depende del

grado de lesión que presente el tejido. Existen otros factores que intervienen en este proceso, por ejemplo, el rechazo inmunológico al injerto o la incapacidad del mismo para recuperarse, además de las complicaciones que puede traer consigo una cirugía, tales como infecciones por bacterias.

Para mejorar la capacidad de regeneración de tejido se sugiere el uso de biomateriales. Existen biomateriales capaces de incorporar proteínas y partículas específicas en la zona de la lesión haciendo más efectivo el proceso de regeneración, uno de estos materiales es la hidroxiapatita (Ha) [78]. La Ha es un mineral formado por fosfato de calcio, su composición química es similar a la matriz inorgánica del hueso y exhibe alta afinidad por los tejidos duros del huésped a través de una unión química. La Ha se caracteriza por ser biocompatible, bioactiva, osteoconductiva y se une directamente al hueso [78]. Para superar el problema de tipo infeccioso se sugiere el empleo de nano-partículas de plata. Estas nano-partículas poseen propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias [79], pero se desconoce interfiere con las funciones de la hidroxiapatita en el tejido óseo.

En este capítulo, investigamos las propiedades mecánicas de células de osteosarcoma. Realizamos compresiones de la célula con diferentes fuerzas con la finalidad de entender de manera más profunda el comportamiento visco-elástico de la célula con la técnica de microscopía de fuerza atómica.

Los experimentos fueron realizados en dos procesos: en el primer proceso limitamos la corriente máxima detectada en el fotodetector a un valor de 3 nA sobre el valor obtenido del (setpoint). En el segundo proceso, se dejó extender el piezoeléctrico de manera libre hasta llegar a una distancia de extensión de -300 nm. Con estos parámetros se obtienen dos intervalos del espectro de fuerzas: en el primer intervalo el espectro es desde 5 hasta 18 nN y en el segundo intervalo los valores de fuerza máxima van desde 18 hasta 30 nN.

Durante el experimento presionamos cuatro veces una misma célula. En la primer compresión realizamos un ciclo de aproximación-retracción obteniendo una curva de fuerza vs. distancia. En la segunda compresión realizamos un ciclo de aproximación-relajación-retracción, dejando relajar la célula durante 4 segundos. En la tercer compresión realizamos nuevamente un ciclo de aproximación-retracción. En la cuarta compresión el ciclo fue de aproximación-relajación-retracción, manteniendo presionada la célula durante 30 segundos. La fuerza aplicada en el primer y segundo ciclo fue menor a 18 nN mientras que en el tercer y cuarto ciclo fue mayor a 18 nN.

Además, estudiamos los cambios en las propiedades mecánicas de las células de osteosarcoma cuando se les agrega Ha y nano-partículas de plata. Lo anterior con la finalidad de entender el efecto de la Ha y las nano-partículas de plata en las células de osteosarcoma, desde el punto de vista mecánico.

Para llevar a cabo los experimentos, realizamos cultivos de células en 9 cajas de Petri y dividimos las muestras en 3 grupos. Cada grupo contenía un control, una muestra con Ha, que llamaremos TxHa y una muestra con Ha y nano-partículas de plata, que llamaremos TxHaAg.

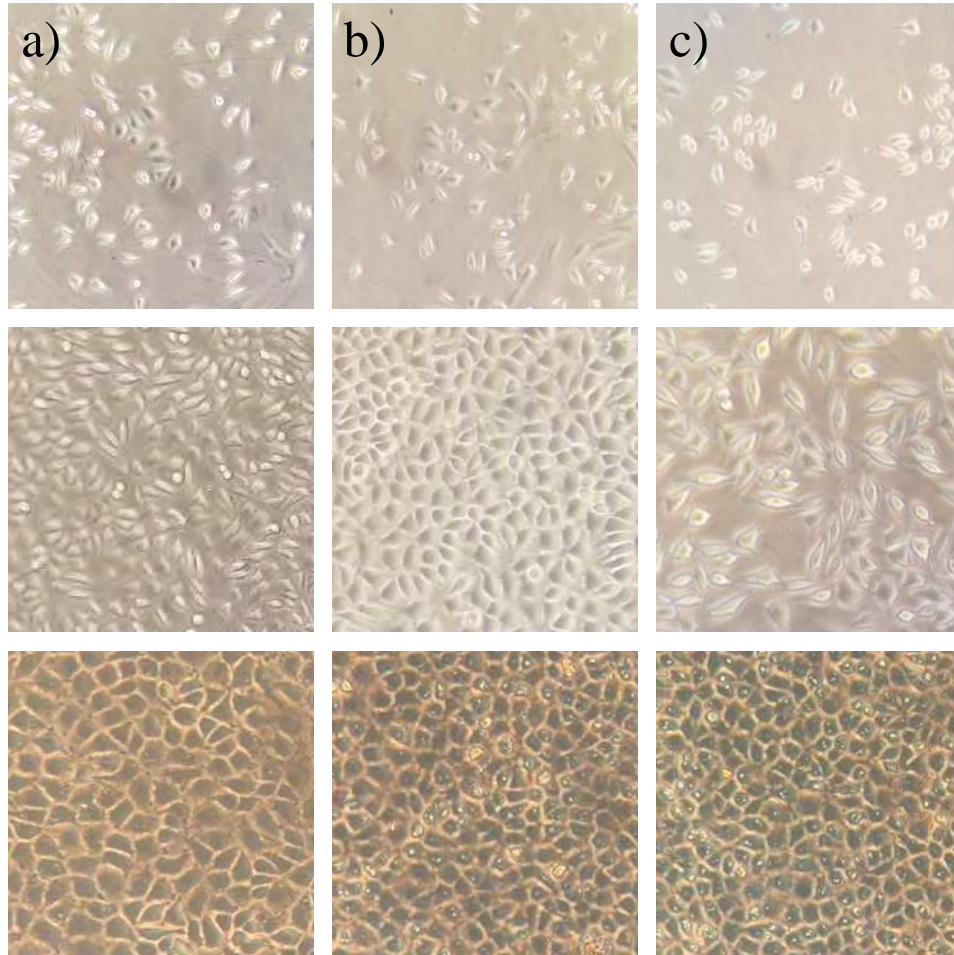


Figura 6.1: Micrografía de células de osteosarcoma. Fila superior: células a los 3 días de incubación, fila media: células a los 7 días de incubación y fila inferior: células a los 14 días de incubación. a) células control, b) células con Ha (TxHa) c) células con Ha y nano-partículas de plata (TxHaAg).

El primer grupo se midió a los 3 días de incubación, el segundo grupo a los 7 días y el tercer grupo a los 14 días.

Cabe mencionar que a 3 y 7 días las mediciones fueron realizadas en células individuales, a los 14 días de incubación las células ya habían formado una capa cubriendo todo el sustrato, por tanto las mediciones fueron realizadas en grupos celulares. Una imagen óptica de estas células en los diferentes días de incubación se muestra en las Figs. 6.1, 6.2.

Para determinar los parámetros visco-elásticos de estas células usamos el modelo fraccional de Zener. La ecuación de ajuste de este modelo está dada por la ec. (5.5):

$$F(t) = \frac{C}{1 - \nu} \left[E_0 + E_1 \varepsilon_{\alpha,1} \left(- \left(\frac{t}{\tau} \right)^\alpha \right) \right].$$

En el capítulo 5 se hizo una discusión sobre el significado de los parámetros obtenidos con los

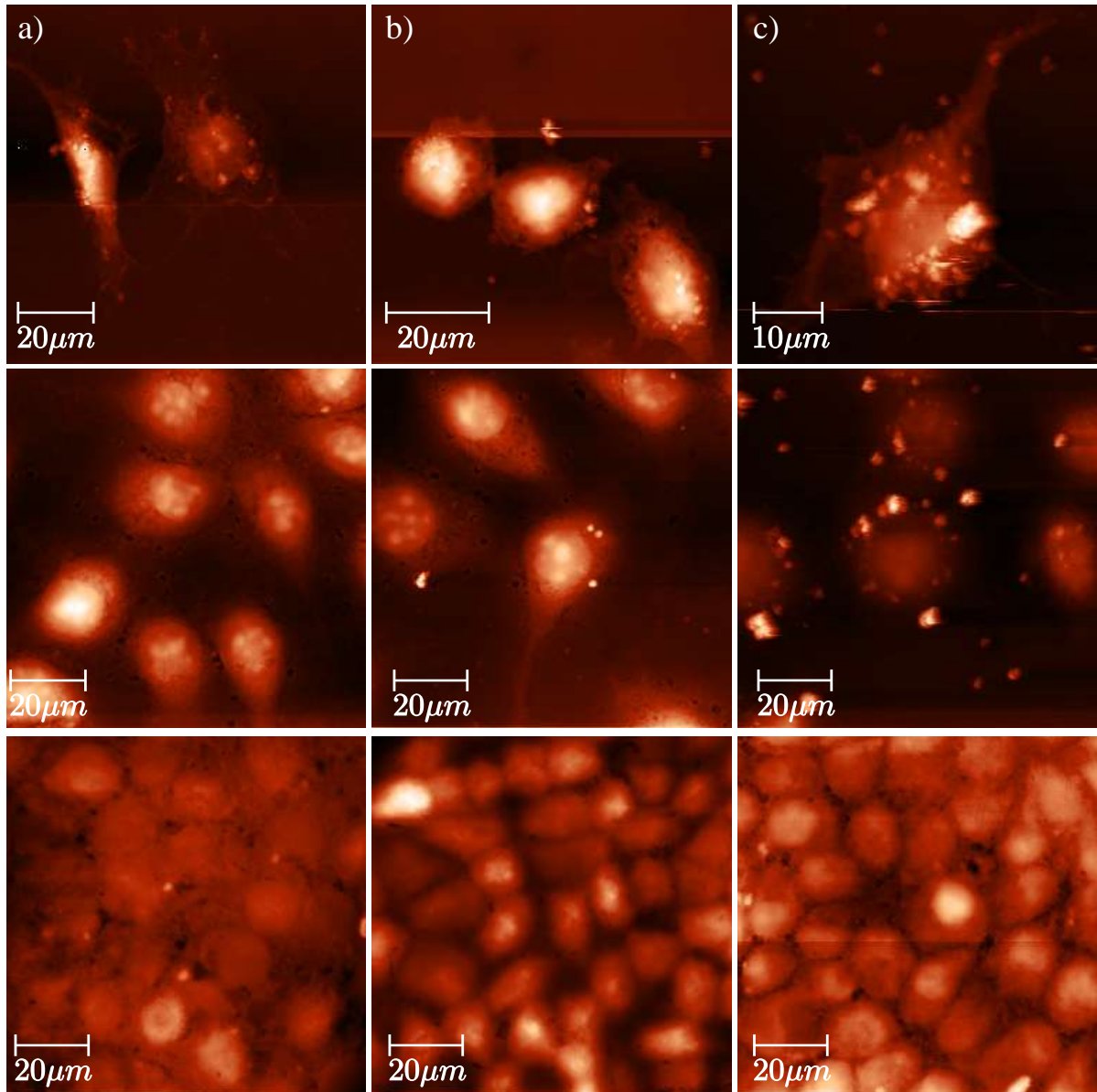


Figura 6.2: Imágenes de células de osteosarcoma obtenidas mediante un microscopio de fuerza atómica en aire. Columna a) corresponde al sistema control, columna b) al sistema Ha y la columna c) es el sistema HaAg. En la parte superior se muestran los sistemas a 3 días, en la parte media los sistemas a 7 días finalmente en la parte inferior se muestran los sistemas a 14 días.

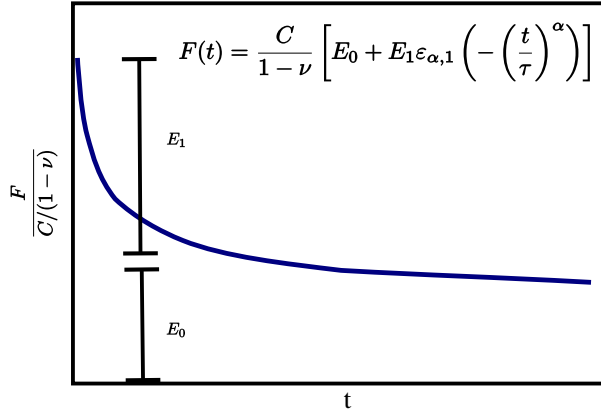


Figura 6.3: Representación gráfica de los parámetros E_0 y E_1 obtenidos con el modelo fraccional de Zener en una curva de relajación de esfuerzos.

diferentes modelos de relajación. El parámetro E_0 representa el módulo elástico de equilibrio o la respuesta final de la célula y E_1 la respuesta inicial (ver Fig. 6.3). El símbolo τ representa el tiempo de relajación. Finalmente el valor de α es una medida de la visco-elasticidad del material.

6.3. Parámetros visco-elásticos como función de la fuerza aplicada en células de osteosarcoma.

En esta sección estudiamos el comportamiento de los parámetros visco-elásticos del modelo fraccional de Zener como función de la fuerza aplicada. Para cuantificar la relación entre la fuerza aplicada y los parámetros visco-elásticos determinamos el coeficiente de correlación de Pearson.

El **coeficiente de correlación de Pearson** mide que tan fuerte es la correlación lineal entre dos variables. El valor del coeficiente varía en el rango $[-1, 1]$. Un coeficiente positivo indica una correlación positiva, es decir, si una variable aumenta la otra también lo hace. Si el coeficiente es negativo, entonces, cuando una variable aumenta la otra disminuye. Un coeficiente igual a cero indica que no hay correlación lineal entre las variables. Cuando el valor es igual a 1 o -1 los datos se ajustan perfectamente a una línea recta con pendiente positiva o negativa, según sea el caso.

El coeficiente de correlación de Pearson, r , entre dos variables x y y se obtiene con la siguiente ecuación [80]:

$$r_{x,y} = \frac{\sum_{i=1}^n \left(\frac{x_i - \bar{x}}{s_x} \right) \left(\frac{y_i - \bar{y}}{s_y} \right)}{n - 1}, \quad (6.1)$$

donde, n es el tamaño de la muestra, x_i y y_i son los puntos individuales de x y y respectivamente. Los símbolos \bar{x} y \bar{y} corresponden al promedio de cada variable mientras que s_x y s_y

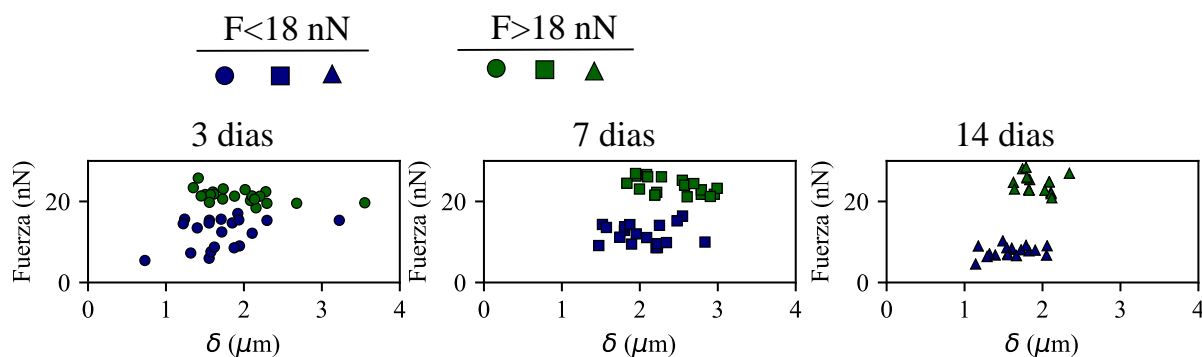


Figura 6.4: Gráfica de fuerza contra indentación para el grupo de células control. Los marcadores de color azul corresponden a fuerzas menores a 18 nN y los de color verde corresponden a fuerzas mayores a 18 nN. a) grupo control a 3 días; b) grupo control a 7 días y c) grupo control a 14 días de incubación.

representan las desviaciones estándar de cada variable.

6.3.1. Profundidad de indentación como función de la fuerza

La fuerza que aplicamos a las células de osteosarcoma se encuentra dentro de dos rangos, el primero va desde 5 nN hasta 18 nN y el segundo desde 18 nN hasta 30 nN. De aquí en adelante el rango de fuerzas menores a 18 nN lo identificaremos con F_s y el rango de fuerzas mayores a 18 nN con F_l .

En la Fig. 6.4 mostramos la profundidad de indentación que se produjo con la fuerza aplicada para las células de los grupos control a los 3, 7 y 14 días de incubación. Como podemos observar, la profundidad de indentación depende de las características de la célula. Si se tiene una célula más rígida que otra y se penetran con la misma fuerza, entonces, la indentación será mayor en la célula más suave, es decir, la profundidad de indentación en la célula no depende de la fuerza aplicada. Podemos observar que la profundidad máxima que se alcanza a los 14 días es menor que la alcanzada a los 3 y 7 días lo que podría indicar mayor rigidez en el cultivo de 14 días.

6.3.2. Parámetro E_0 como función de la fuerza

Obtuvimos el coeficiente de correlación de Pearson entre la fuerza y el parámetro E_0 , para determinar si hay una relación lineal entre estas variables. El coeficiente fue alrededor de 0.2 para el cultivo de 3 días y aproximadamente 0.5 para el cultivo de 7 días indicando una relación débil entre la fuerza y E_0 tanto en F_s como en F_l . En el cultivo de 14 días el coeficiente fue de ≈ 0.7 con ambos grupos de fuerzas indicando una relación lineal fuerte entre E_0 y la fuerza. En la Fig. 6.5 podemos observar el comportamiento de E_0 como función de la fuerza. En los cultivos de 3 y 7 días no observamos relación entre estos dos parámetros mientras que en el

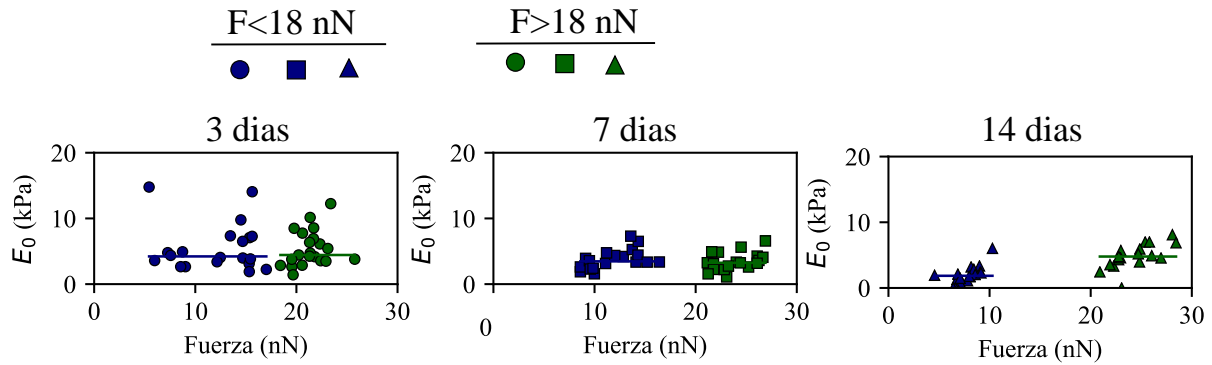


Figura 6.5: Gráfica del parámetro E_0 como función de la fuerza aplicada para cada célula. Los marcadores azules indican células medidas con fuerzas menores a 18 nN y los marcadores verdes indican las células medidas con fuerzas mayores a 18 nN. a) grupo control a 3 días; b) grupo control a 7 días y c) grupo control a 14 días de incubación.

cultivo de 14 días E_0 aumenta con el aumento de la fuerza, tal como predice el análisis de correlación.

El análisis de correlación de Pearson indica que el parámetro E_0 no tiene una relación lineal con la fuerza en los cultivos de 3 y 7 días, pero esto no implica que el parámetro permanecerá constante, pueden existir relaciones no lineales o simplemente cambiar sin mantener alguna relación. En la Fig. 6.6 comparamos los valores medios obtenidos con F_s y F_l para los grupos controles. En los cultivos de 3 y 7 días las diferencias entre el valor obtenido con F_s y el obtenido con F_l son muy pequeñas mientras que en el cultivo de 14 días es grande. Realizamos un análisis estadístico, aplicando la prueba Kruskal-Wallis, para determinar si estas diferencias son significativas. En los cultivos de 3 y 7 días no hubo diferencias estadísticamente significativas. A los 14 días la diferencia fue significativa, con $p < 0.005$, mientras que a los 14 días la superficie de la caja de Petri está totalmente cubierta de células, a diferencia de 3 y 7 días donde teníamos células individuales. Esto puede explicar el comportamiento de E_0 , es decir, en una célula individual de osteosarcoma el módulo de equilibrio es el mismo independientemente de la fuerza aplicada. Por el contrario cuando existe toda una matriz de células el módulo de equilibrio se ve afectado con las diferentes cargas indicando que las células alrededor están influyendo sobre la célula medida.

6.3.3. Parámetro E_1 como función de la fuerza

En la Fig. 6.7 podemos observar que los cultivos de 3 y 7 días muestran una ligera tendencia a aumentar con el incremento de la fuerza. El coeficiente de correlación fue de 0.4 para F_s y 0.8 para F_l . En el cultivo de 14 días la relación lineal entre estos parámetros es muy débil, con un coeficiente de aproximadamente 0.2 tanto para F_s como para F_l .

Aunque la relación lineal entre E_1 y la fuerza es débil en el cultivo de 14 días vemos una diferencia grande en el valor medio de este parámetro, tanto en el cultivo de 14 días como en

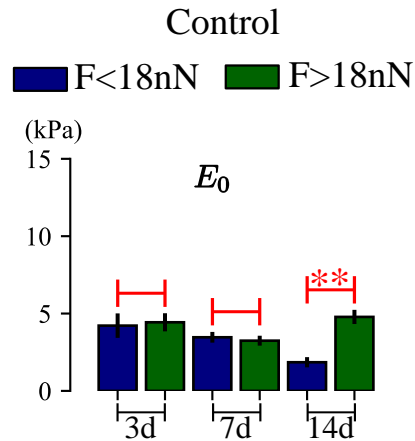


Figura 6.6: Valores de las medianas obtenidos para el parámetro E_0 a partir del ajuste de las curvas de relajación con el modelo fraccional de Zener. El color azul representa los valores obtenidos para $F < 18$ nN y el color verde los valores obtenidos para $F > 18$ nN. Los cultivos de 3, 7 y 14 días los señalamos con 3d, 7d y 14d respectivamente.

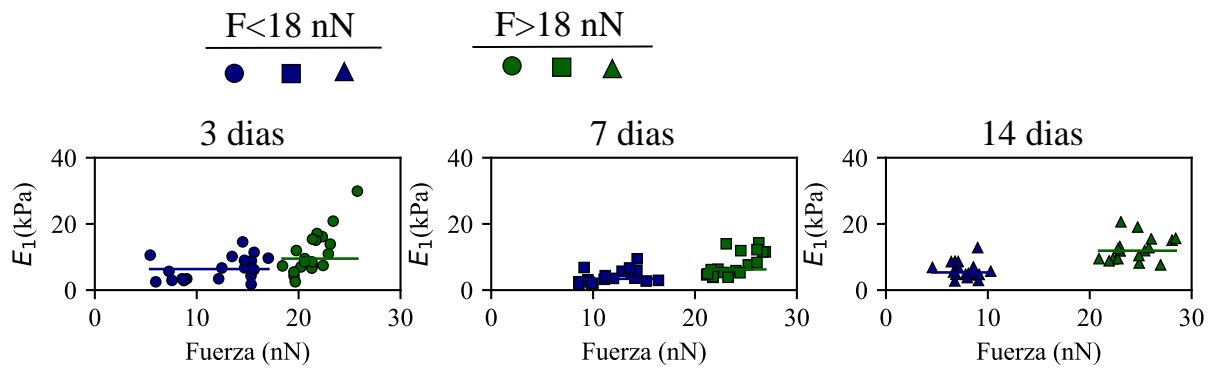


Figura 6.7: Gráfica del parámetro E_1 como función de la fuerza aplicada para cada célula. Los marcadores azules indican células medidas con fuerzas menores a 18 nN y los marcadores verdes indican las células medidas con fuerzas mayores a 18 nN. a) grupo control a 3 días; b) grupo control a 7 días y c) grupo control a 14 días de incubación.

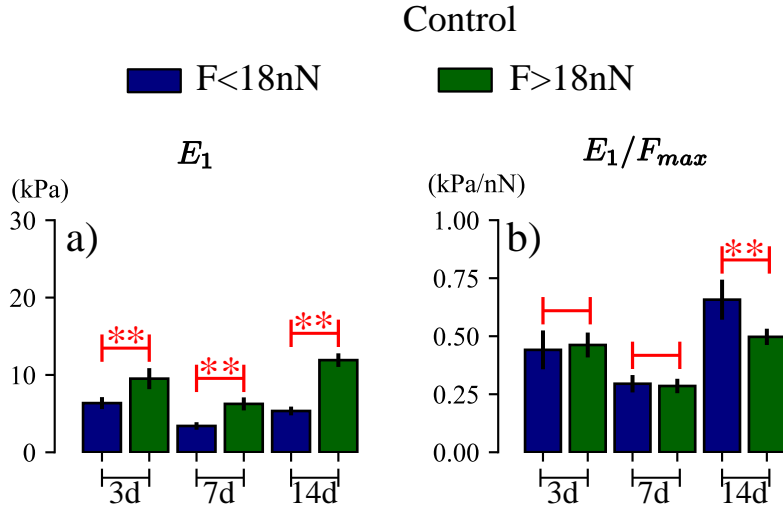


Figura 6.8: a) Valores de las medianas obtenidos para el parámetro E_1 a partir del ajuste de las curvas de relajación con el modelo fraccional de Zener. b) Valores de las medianas de la razón entre E_1 y F_{max} para los diferentes grupos. El color azul representa los valores obtenidos para $F < 18$ nN y el color verde los valores obtenidos para $F > 18$ nN. Los cultivos de 3, 7 y 14 días los señalamos con 3d, 7d y 14d respectivamente. ** significa que las diferencias entre los grupos señalados son estadísticamente significativas con $p < 0.005$.

los de 3 y 7 días, Fig. 6.8a. Esta diferencia es estadísticamente significativa, con $p < 0.005$ para los tres cultivos.

Por otro lado, dividimos el parámetro E_1 con su respectiva fuerza, para cada célula, y comparamos los valores obtenidos con F_s y los obtenidos con F_l , Fig. 6.8b. Resulta que en los cultivos de 3 y 7 días no hay diferencias significativas, contrario al cultivo de 14 días donde $p < 0.005$. Más aún, podríamos decir que el parámetro E_1 , para los cultivos de 3 y 7, días cumple con la relación:

$$E_{1_{F_l}} = \frac{F_l}{F_s} E_{1_{F_s}}, \quad (6.2)$$

donde $E_{1_{F_s}}$ y $E_{1_{F_l}}$ corresponden al valor de E_1 obtenido con fuerzas menores a 18 nN y fuerzas mayores a 18 nN, respectivamente.

6.3.4. Parámetro τ como función de la fuerza

En el cultivo de 3 días el coeficiente de correlación fue de 0.3 para F_s y de -0.2 para F_l . En el primer caso es un valor positivo indicando un aumento de τ con el aumento de la fuerza y en el segundo caso ocurre lo contrario, sin embargo en ambos casos la relación es débil. En el cultivo de 7 días el coeficiente de correlación fue de 0.1 para F_s y 0.4 para F_l , en ambos casos es una relación positiva pero débil. En el cultivo de 14 días el coeficiente de correlación fue de -0.1 para ambos grupos de fuerzas. En varios casos se tiene un coeficiente negativo indicando una disminución en el tiempo de relajación con el aumento de la fuerza, sin embargo,

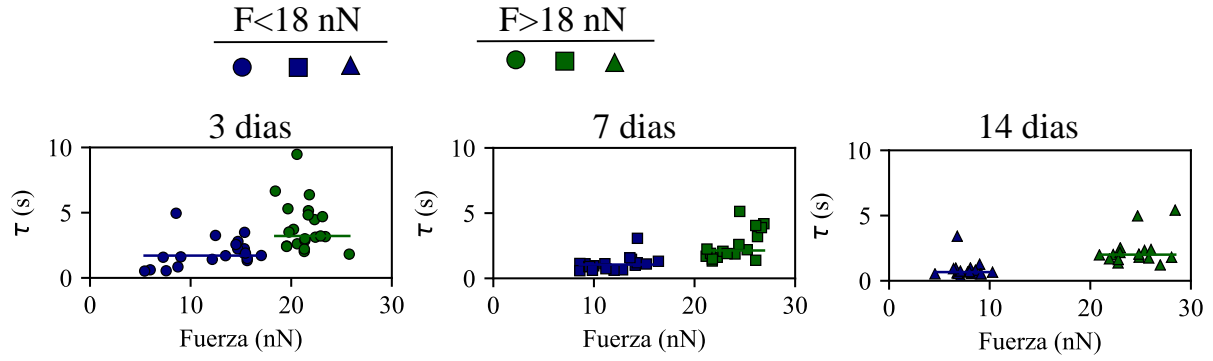


Figura 6.9: Gráfica del parámetro τ como función de la fuerza aplicada para cada célula. Los marcadores azules indican células medidas con fuerzas menores a 18 nN y los marcadores verdes indican las células medidas con fuerzas mayores a 18 nN. a) grupo control a 3 días; b) grupo control a 7 días y c) grupo control a 14 días de incubación.

este comportamiento no se observa cuando consideramos los dos rangos de fuerzas como uno solo, (ver Fig. 6.9), por tanto, es posible que los valores atípicos estén influyendo en estos resultados. Realizando un análisis de correlación considerando los dos rangos de fuerza, el coeficiente de correlación es de 0.5 para los tres cultivos.

En la figura 6.10a podemos ver que el tiempo de relajación es mayor cuando la fuerza es más grande. La diferencia entre los valores obtenidos con fuerzas menores a 18 nN y los obtenidos con fuerzas mayores a 18 nN es estadísticamente significativa para los tres cultivos, con $p < 0.005$ en todos los casos.

Por otro lado, dividimos el tiempo de relajación de cada célula entre la fuerza que se le aplicó y después comparamos los valores obtenidos para fuerzas menores a 18 nN con los obtenidos para fuerzas mayores a 18 nN. Los resultados se muestran en la Fig. 6.10b. La prueba estadística no mostró diferencias significativas en ninguno de los cultivos, por lo tanto, podríamos decir que el aumento del tiempo de relajación con el incremento de la fuerza es proporcional a la razón entre las fuerzas, es decir, se cumple que:

$$\mathcal{T}_{F_l} = \frac{F_l}{F_s} \mathcal{T}_{F_s}, \quad (6.3)$$

para los grupos control a los 3, 7 y 14 días de cultivo. En la ecuación anterior \mathcal{T}_{F_s} corresponde al tiempo de relajación obtenido para fuerzas menores a 18 nN y \mathcal{T}_{F_l} a fuerzas mayores a 18 nN.

6.3.5. Parámetro α como función de la fuerza

El valor de α tiende a disminuir ligeramente con el aumento de la fuerza, 6.11. El análisis de correlación de Pearson muestra una relación muy débil entre la fuerza y este parámetro. En el cultivo de 3 días está alrededor de -0.3 para F_s y F_l , en el cultivo de 7 días el coeficiente

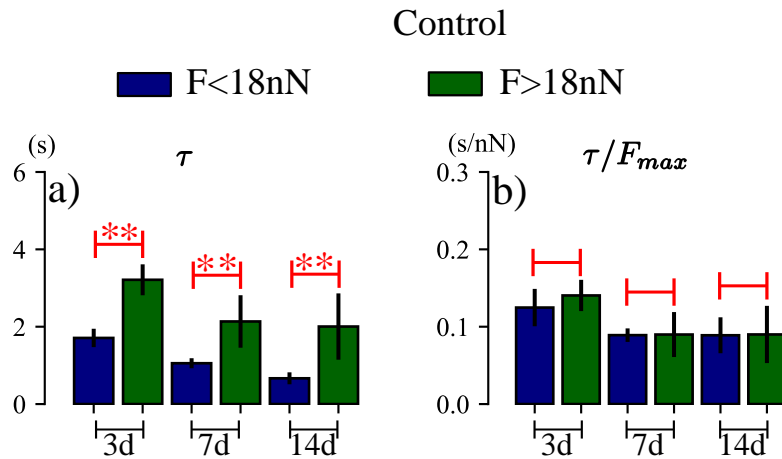


Figura 6.10: a) Valores de las medianas obtenidos para el parámetro τ a partir del ajuste de las curvas de relajación con el modelo fraccional de Zener. b) Valores de las medianas de la razón entre τ y F_{max} para los diferentes grupos. El color azul representa los valores obtenidos para $F < 18$ nN y el color verde los valores obtenidos para $F > 18$ nN. Los cultivos de 3, 7 y 14 días los señalamos con 3d, 7d y 14d respectivamente. ** significa que las diferencias entre los grupos señalados son estadísticamente significativas con $p < 0.005$.

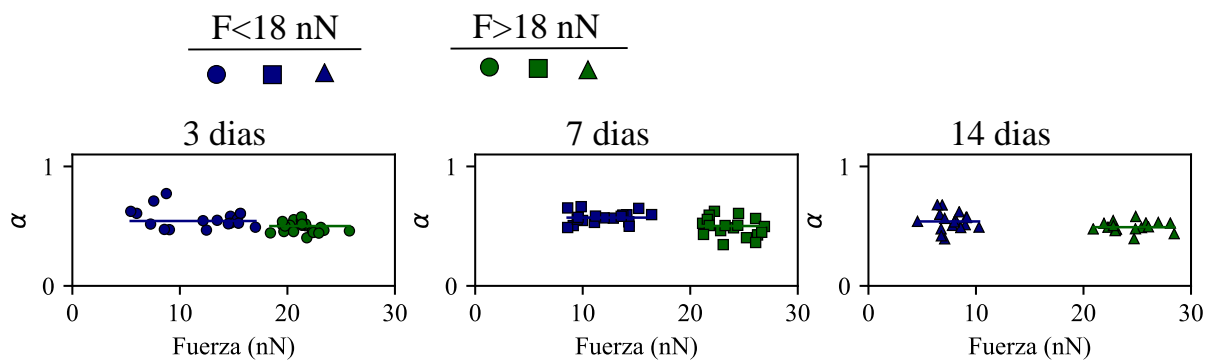


Figura 6.11: Gráfica del parámetro α como función de la fuerza aplicada para cada célula. Los marcadores azules indican células medidas con fuerzas menores a 18 nN y los marcadores verdes indican las células medidas con fuerzas mayores a 18 nN. a) grupo control a 3 días; b) grupo control a 7 días y c) grupo control a 14 días de incubación.

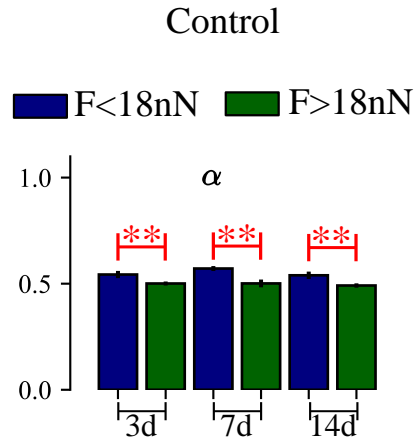


Figura 6.12: Valores de las medianas obtenidos para el parámetro α a partir del ajuste de las curvas de relajación con el modelo fraccional de Zener. El color azul representa los valores obtenidos para $F < 18$ nN y el color verde los valores obtenidos para $F > 18$ nN. Los cultivos de 3, 7 y 14 días los señalamos con 3d, 7d y 14d respectivamente. ** significa que las diferencias entre los grupos señalados son estadísticamente significativas con $p < 0.005$.

es de 0.1 y de -0.2 para las fuerzas en F_s y F_l respectivamente. En el cultivo de 14 días el coeficiente due de -0.1 y 0.1 para F_s y F_l respectivamente.

Comparando los valores obtenidos con fuerzas menores a 18 nN con los obtenidos para fuerzas mayores a 18 nN vemos que la diferencia entre estos grupos es estadísticamente significativa, con $p < 0.005$ para los 3 cultivos como se muestra en la Fig. 6.12.

6.4. Parámetros visco-elásticos como función de la fuerza aplicada en células de osteosarcoma + Ha + Ag.

En esta sección discutimos los cambios que sufren los parámetros visco-elásticos, de células de osteosarcoma con hidroxapatita (TxHa) y con hidroxapatita más nano-partículas plata (Tx-HaAg), aplicando diferentes fuerzas. La prueba que usamos para determinar si existe diferencias entre los valores obtenidos fue la Kruskal-Wallis. Consideramos diferencias significativas cuando $p < 0.05$.

6.4.1. Parámetro E_0 como función de la fuerza

En los cultivos de tres días observamos una ligera disminución en el valor de E_0 con el aumento de la fuerza en ambos tratamientos, pero esta diferencia no fue significativa, Fig. 6.14. En el cultivo de TxHa a los 7 días aumentó significativamente el valor de E_0 con el aumento de la fuerza, con $p < 0.05$. El cultivo de TxHaAg no mostró cambios significativos en este parámetro

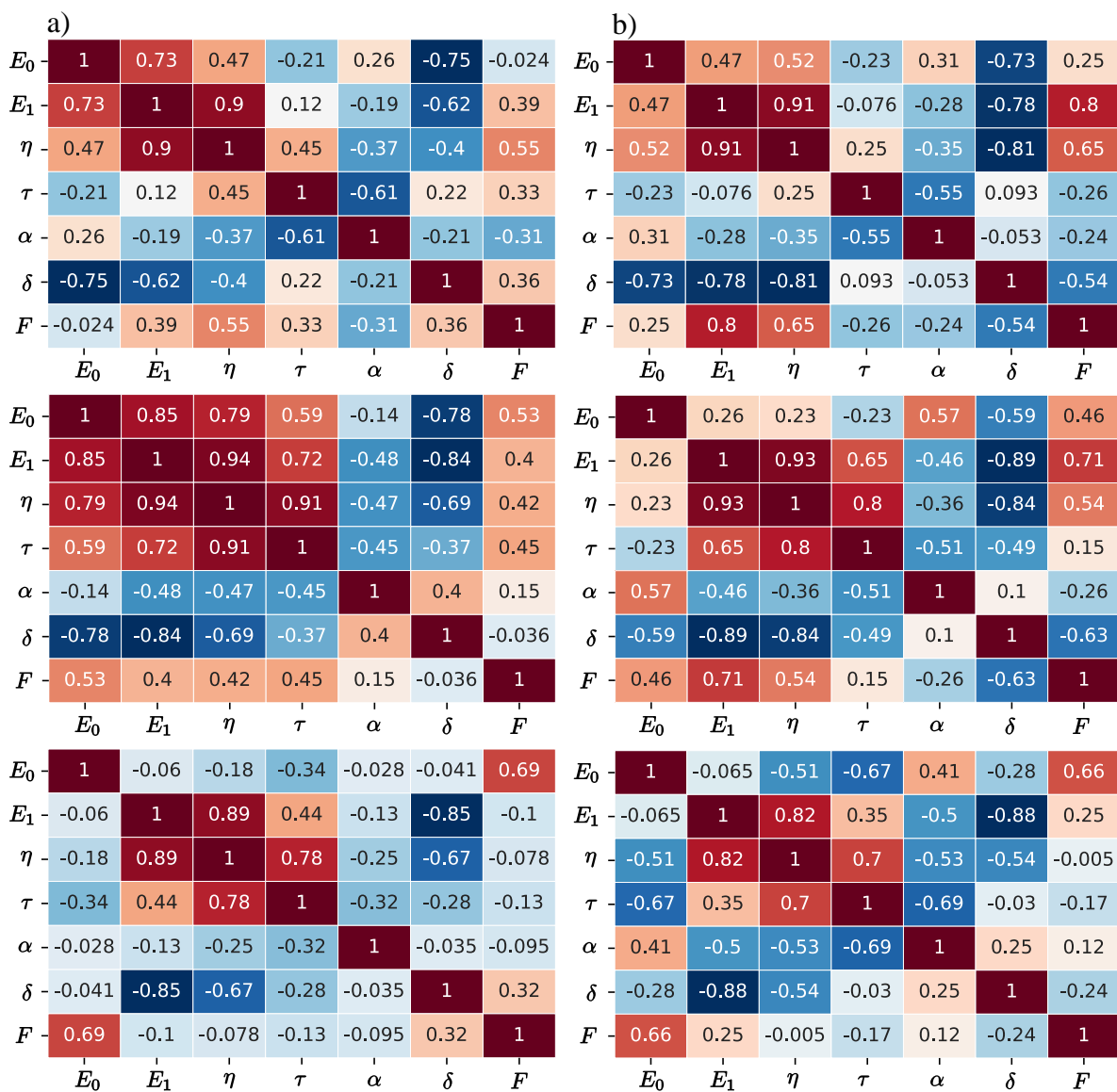


Figura 6.13: Coeficiente de correlación de Pearson entre los diferentes parámetros obtenidos con el modelo fraccional de Zener, la fuerza y la profundidad de indentación para los diferentes grupos control con: a) fuerzas menores a 18 nN, b) fuerzas mayores a 18 nN. Fila superior: 3 días de incubación; fila media: 7 días de incubación; fila inferior: 14 días de incubación.

E_0

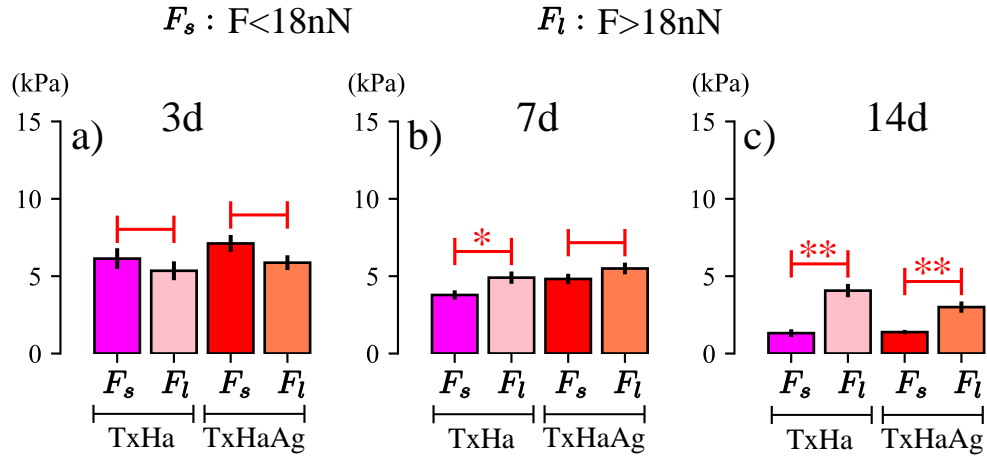


Figura 6.14: Comparación entre el valor del parámetro E_0 obtenido a partir del ajuste de las curvas de relajación con $F < 18$ nN y el obtenido con $F > 18$ nN para las células osteosarcoma con hidroxapatita (TxHa) y células con hidroxapatita más plata (TxHaAg). El * indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos señalados (* $\implies p < 0.05$, ** $\implies p < 0.005$). Los datos se representan como el promedio \pm el error estándar.

con el cambio de la fuerza. A los 14 días de cultivo ambos tratamientos mostraron un aumento significativo en E_0 con el aumento de la fuerza, $p < 0.005$.

6.4.2. Parámetro E_1 como función de la fuerza

En la Fig. 6.15 mostramos los valores de E_1 obtenidos con los dos rangos de fuerzas para las células con tratamiento. Este parámetro tiende a aumentar con el aumento de la fuerza. Las diferencias entre los valores de E_1 obtenidos con F_s y los obtenidos con F_l a los 3, 7 y 14 días de cultivo son estadísticamente significativas, con $p < 0.005$ en ambos tratamientos.

Por otro lado, dividimos E_1 entre la fuerza aplicada y realizamos un análisis estadístico para determinar si las muestras cumplen con la relación

$$\frac{E_{1F_s}}{F_s} = \frac{E_{1F_l}}{F_l}, \quad (6.4)$$

como pasa con el grupo control. La relación anterior se cumplió en la muestra de TxHa a los 7 y 14 días de cultivo y en la muestra de TxHaAg únicamente se cumplió a los 3 días de cultivo, Fig. 6.15.

6.4.3. Parámetro τ como función de la fuerza

El parámetro τ mostró un aumento con el incremento de la fuerza aplicada, Fig. 6.16. Las diferencias entre los valores obtenidos para $F < 18$ nN y los obtenidos para $F > 18$ nN son

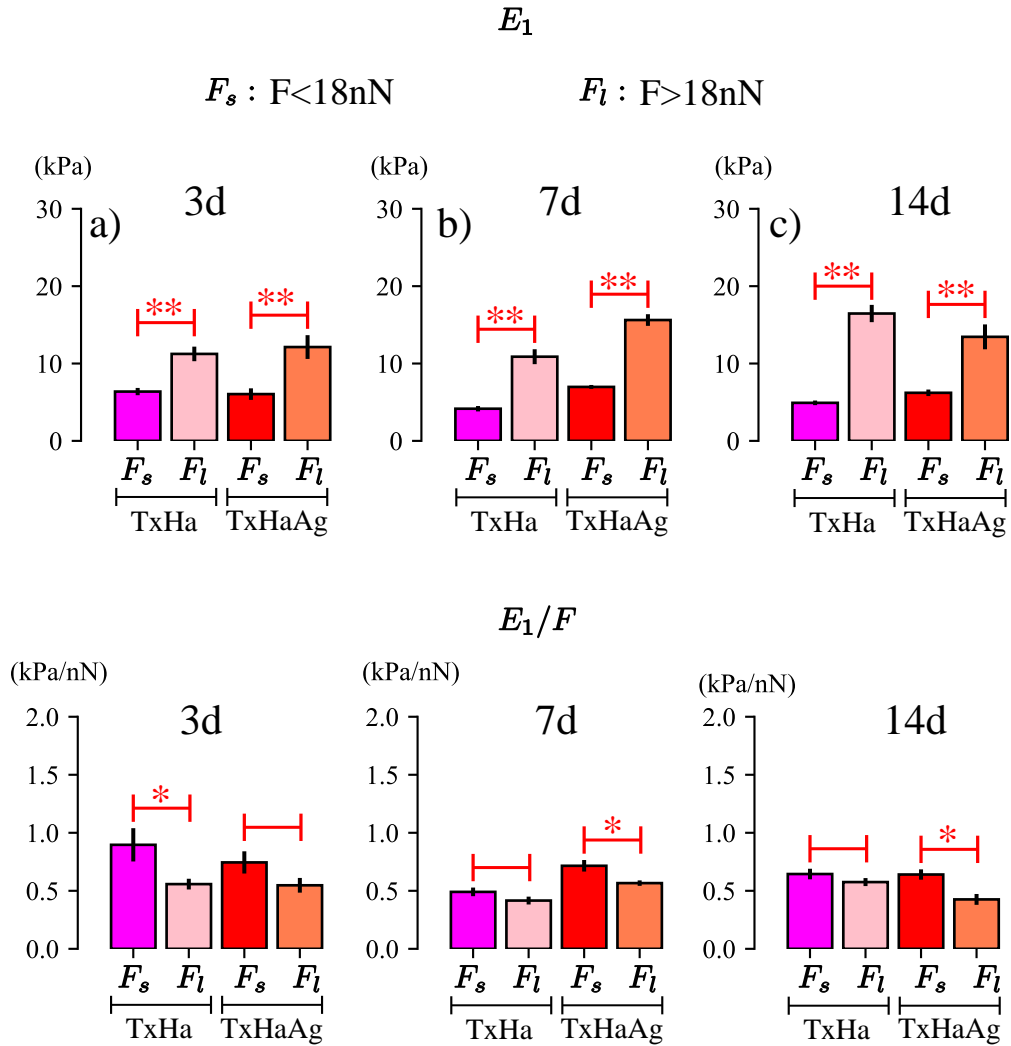


Figura 6.15: Comparación entre el valor del parámetro E_1 obtenido a partir de las curvas de relajación con $F < 18\text{ nN}$ y el obtenido con $F > 18\text{ nN}$ para las células osteosarcoma con hidroxapatita (TxHa) y células con hidroxapatita más plata (TxHaAg). Parte superior: comparación de E_1 . Parte inferior: comparación de E_1/F . El * indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos señalados (* $\implies p < 0.05$, ** $\implies p < 0.005$). Los datos se representan como el promedio \pm el error estándar.

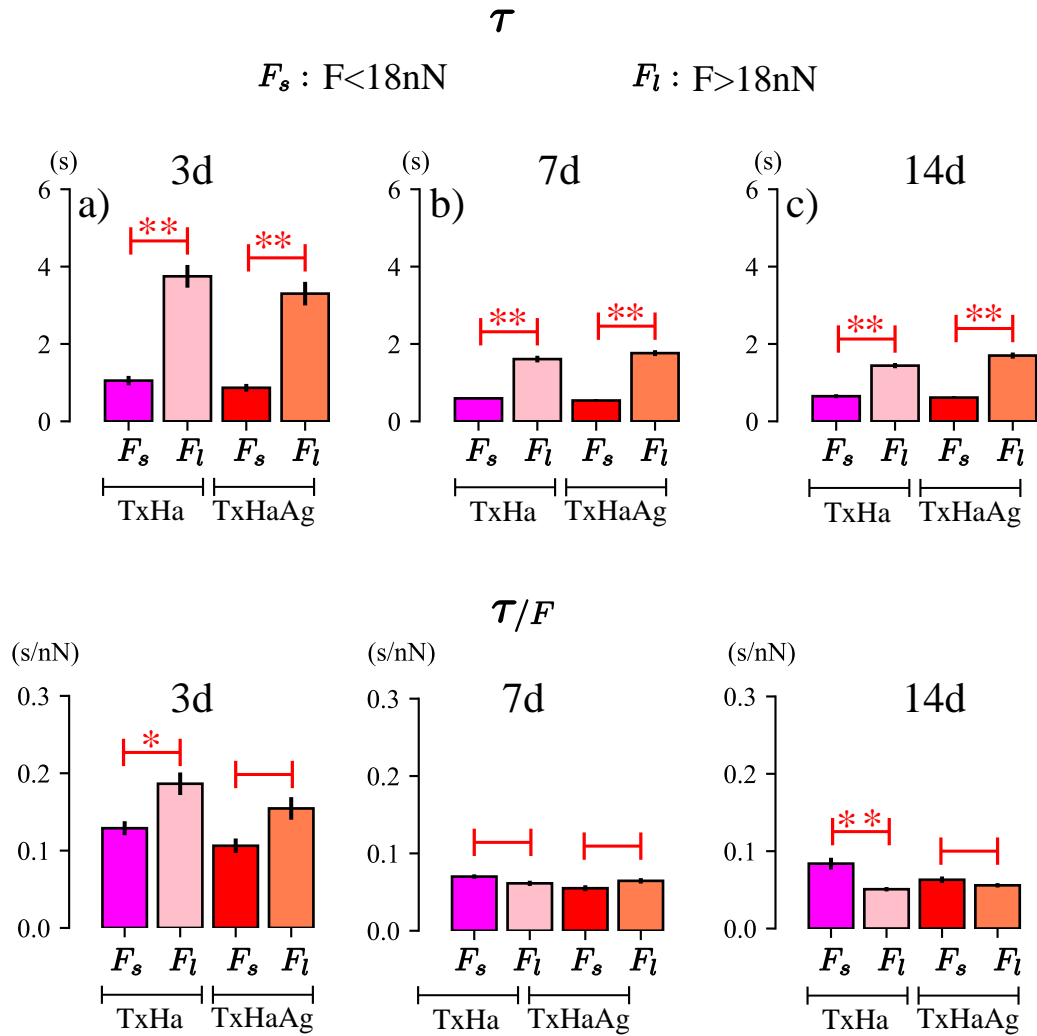


Figura 6.16: Comparación entre el valor del parámetro τ obtenido a partir de las curvas de relajación con $F < 18 \text{ nN}$ y el obtenido con $F > 18 \text{ nN}$ para las células osteosarcoma con hidroxiapatita (TxHa) y células con hidroxiapatita más plata (TxHaAg). Parte superior: comparación de τ . Parte inferior: comparación de τ/F . El * indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos señalados (* $\implies p < 0.05$, ** $\implies p < 0.005$). Los datos se representan como el promedio \pm el error estándar.

α

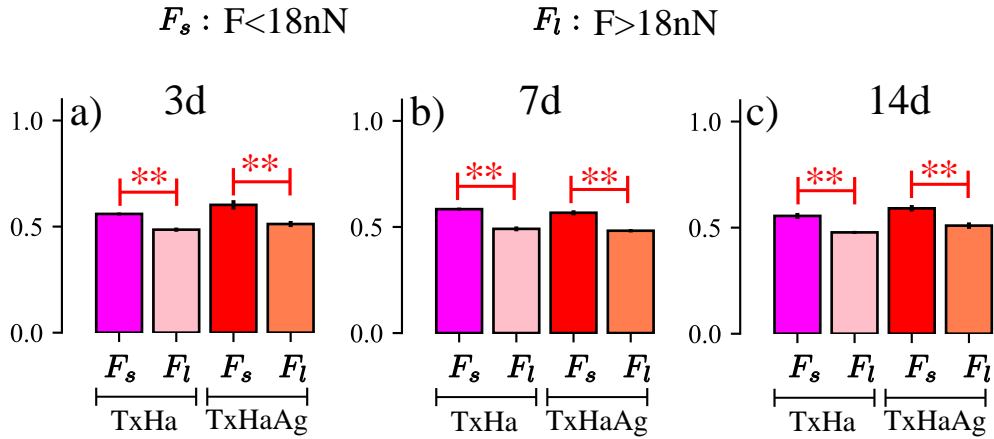


Figura 6.17: Comparación entre el valor del parámetro α obtenido a partir de las curvas de relajación con $F < 18$ nN y el obtenido con $F > 18$ nN para las células osteosarcoma con hidroxiapatita (TxHa) y células con hidroxiapatita más plata (TxHaAg). El * indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos señalados (* $\implies p < 0.05$, ** $\implies p < 0.005$). Los datos se representan como el promedio \pm el error estándar.

estadísticamente significativas, con $p < 0.005$ en los diferentes días de cultivo.

Por otro lado, en el grupo control se cumple que

$$\frac{\tau_{F_s}}{F_s} = \frac{\tau_{F_l}}{F_l}, \quad (6.5)$$

para los cultivos de 3, 7 y 14 días. En el caso de los tratamientos la relación no se cumple en la muestra TxHa a los 3 y 14 días.

6.4.4. Parámetro α como función de la fuerza

El parámetro α tiende a disminuir con el aumento de la fuerza. Las diferencias entre los valores obtenidos para $F < 18$ nN y $F > 18$ nN son estadísticamente significativas, con $p < 0.005$, Fig. 6.17.

6.5. Efecto de hidroxiapatita y partículas de plata en células osteosarcoma

En esta sección comparamos los parámetros visco-elásticos obtenidos para los grupos control con los obtenidos para TxHa y TxHaAg.

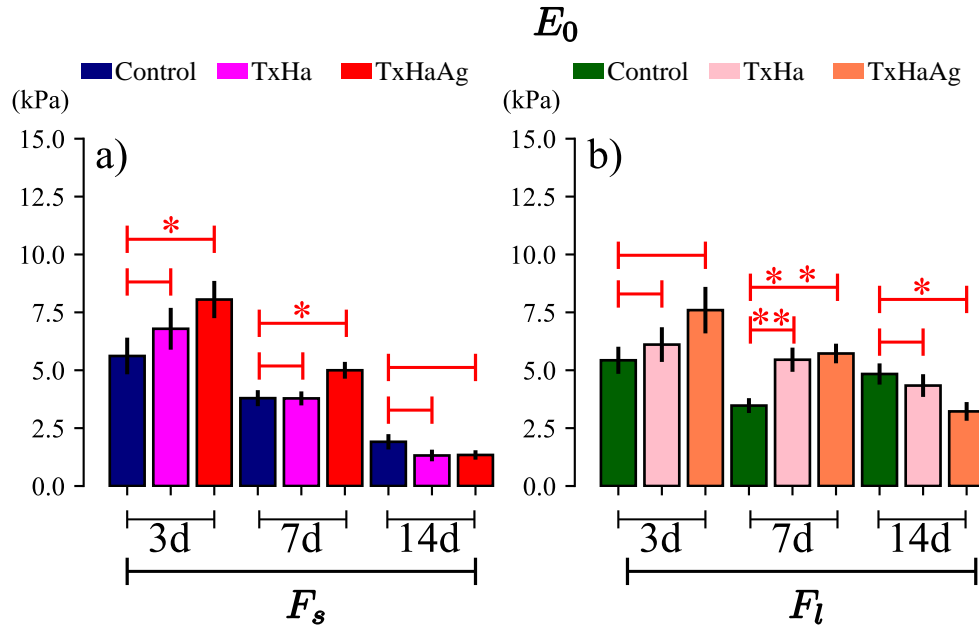


Figura 6.18: Valor del parámetro E_0 de células osteosarcoma obtenido a partir del ajuste de las curvas de relajación con el modelo fraccional de Zener. Las mediciones fueron realizadas en células a los 3, 7 y 14 días de incubación, señaladas con la leyenda 3d, 7d y 14d respectivamente. En cada experimento analizamos un grupo de células control, un grupo de células con hidroxiapatita (TxHa) y uno más con hidroxiapatita y nano-partículas de plata (TxHaAG). a) Valores obtenidos aplicando fuerzas menores a 18 nN. b) Valores obtenidos aplicando fuerzas mayores a 18 nN. Los datos se representan como el promedio \pm el error estándar. El * indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos señalados (* $\implies p < 0.05$, ** $\implies p < 0.005$).

6.5.1. Parámetro E_0

En los cultivos de tres días observamos que el valor de E_0 obtenido para los tratamientos fue mayor que el obtenido para control, Fig. 6.18. Este comportamiento lo observamos en fuerzas menores a 18 nN y en fuerzas mayores a 18 nN. En el caso de F_s hubo una diferencia significativa entre control y TxHaAg con $p = 0.01$. En el caso de F_l no consideramos diferencias significativas aunque para la muestra de TxHaAg el valor de p fue de 0.06.

A los 7 días, el comportamiento de E_0 cuando $F < 18$ nN no es el mismo que observamos cuando $F > 18$ nN, Fig. 6.18. En F_s no identificamos diferencias entre control y TxHa, mientras que en la muestra TxHaAg el aumento fue significativo, $p = 0.02$. En F_l el valor de E_0 aumentó significativamente con ambos tratamientos, $p < 0.005$.

En los cultivos de 14 días, el comportamiento de E_0 que observamos en F_s es similar al que observamos en F_l . En ambos casos vemos que el valor de E_0 es menor en los tratamientos que en el control. Sin embargo, la diferencia fue significativa únicamente en el caso de F_l para la muestra TxHaAg, con $p = 0.007$.

6.5.2. Parámetro E_1

En los cultivos de tres días el parámetro E_1 no mostró cambios significativos con los tratamientos. A los siete días hubo un incremento con los tratamientos, siendo mayor el cambio en la muestra TxHaAg con $p < 0.005$. A los 14 días ya no vemos cambios significativos.

Este parámetro es muy sensible a cambios en la fuerza. Al realizar el análisis estadístico en E_1/F hay un ligero cambio en el comportamiento de los parámetros. A los tres días el valor de E_1/F es ligeramente mayor con los tratamientos, pero esto sólo se observa con F_s . A los 7 días el valor obtenido con los tratamientos es mayor al del grupo control. El mismo comportamiento lo observamos en F_s y en F_l . La diferencia entre control y los tratamientos estadísticamente significativa, con $p < 0.05$ para TxHa y $p < 0.005$ para TxHaAg, tanto en F_s como en F_l . A los 14 días no vemos cambios significativos debido a los tratamientos, ni con fuerzas menores a 18 nN, ni con fuerzas mayores a 18 nN.

En el cultivo de 14 días ya no observamos diferencias significativas entre el valor obtenido para los tratamientos y el de control.

6.5.3. Parámetro τ

Con fuerzas menores a 18 nN observamos una disminución en el tiempo de relajación debido a los tratamientos en los diferentes días de incubación. Esta disminución fue más notable a los 7 días, la diferencia entre control y los tratamientos fue significativa, con $p < 0.005$ para ambos tratamientos, Fig. 6.20a. Con fuerzas mayores a 18 nN, en los tratamientos de 3 días no observamos cambios en el tiempo de relajación. Pero a los 7 y 14 días el cambio en τ producido por los tratamientos es significativo, con $p < 0.05$ en todos los casos, Fig. 6.20b.

Cuando analizamos el tiempo de relajación dividido entre la fuerza aplicada, en los cultivos de tres días no hay diferencias estadísticamente significativas entre control y los tratamientos, ni para $F < 18$ nN ni para $F > 18$ nN. En los cultivos de siete días, hay una diferencia estadísticamente significativa entre control y los dos tratamientos para ambos grupos de fuerzas. En los cultivos de 14 días se observa la misma tendencia. En ambos grupos de fuerzas hay una disminución en el tiempo de relajación con los tratamientos. Esta diferencia es significativa en todos los casos excepto en TxHa para $F < 18$ nN.

6.5.4. Parámetro α

En los cultivos de 3 días el valor α para TxHaAg es ligeramente más grande que control y TxHa pero la diferencia no es significativa, $p \approx 0.7$. Esto se observa con ambos grupos de fuerzas. En los cultivos de 7 y 14 días este parámetro no sufre cambios con los tratamientos, Fig. 6.21.

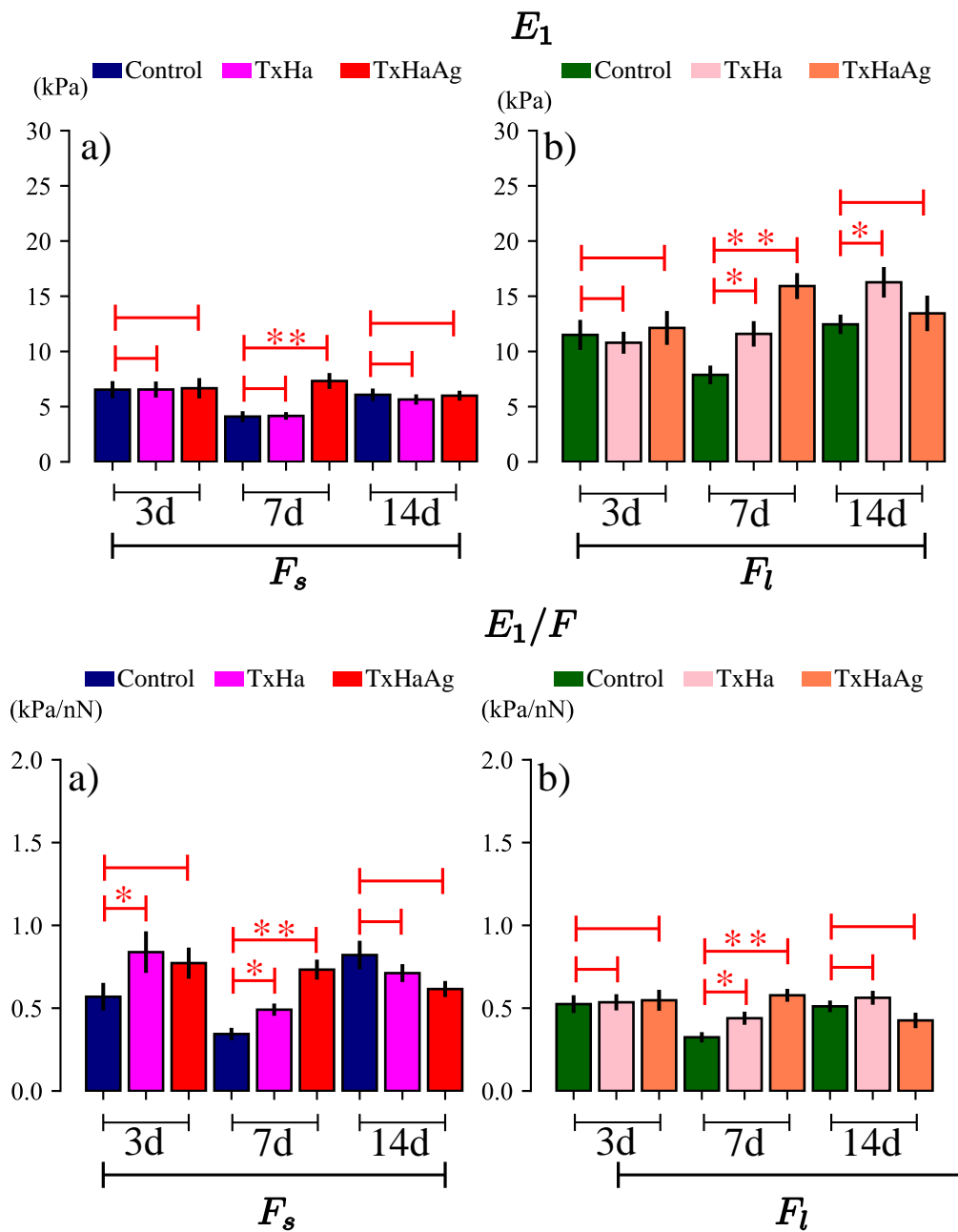


Figura 6.19: Valor del parámetro E_1 de células osteosarcoma obtenido a partir del ajuste de las curvas de relajación con el modelo fraccional de Zener. Las mediciones fueron realizadas en células a los 3, 7 y 14 días de incubación, señaladas con la leyenda 3d, 7d y 14d respectivamente. En cada experimento analizamos un grupo de células control, un grupo de células con hidroxiapatita (TxHa) y uno más con hidroxiapatita y nano-partículas de plata (TxHaAG). a) Valores obtenidos aplicando fuerzas menores a 18 nN. b) Valores obtenidos aplicando fuerzas mayores a 18 nN. Los datos se representan como el promedio \pm el error estándar. En la parte superior mostramos el parámetro E_1 y en la parte inferior E_1/F . El * indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos señalados (* $\implies p < 0.05$, ** $\implies p < 0.005$).

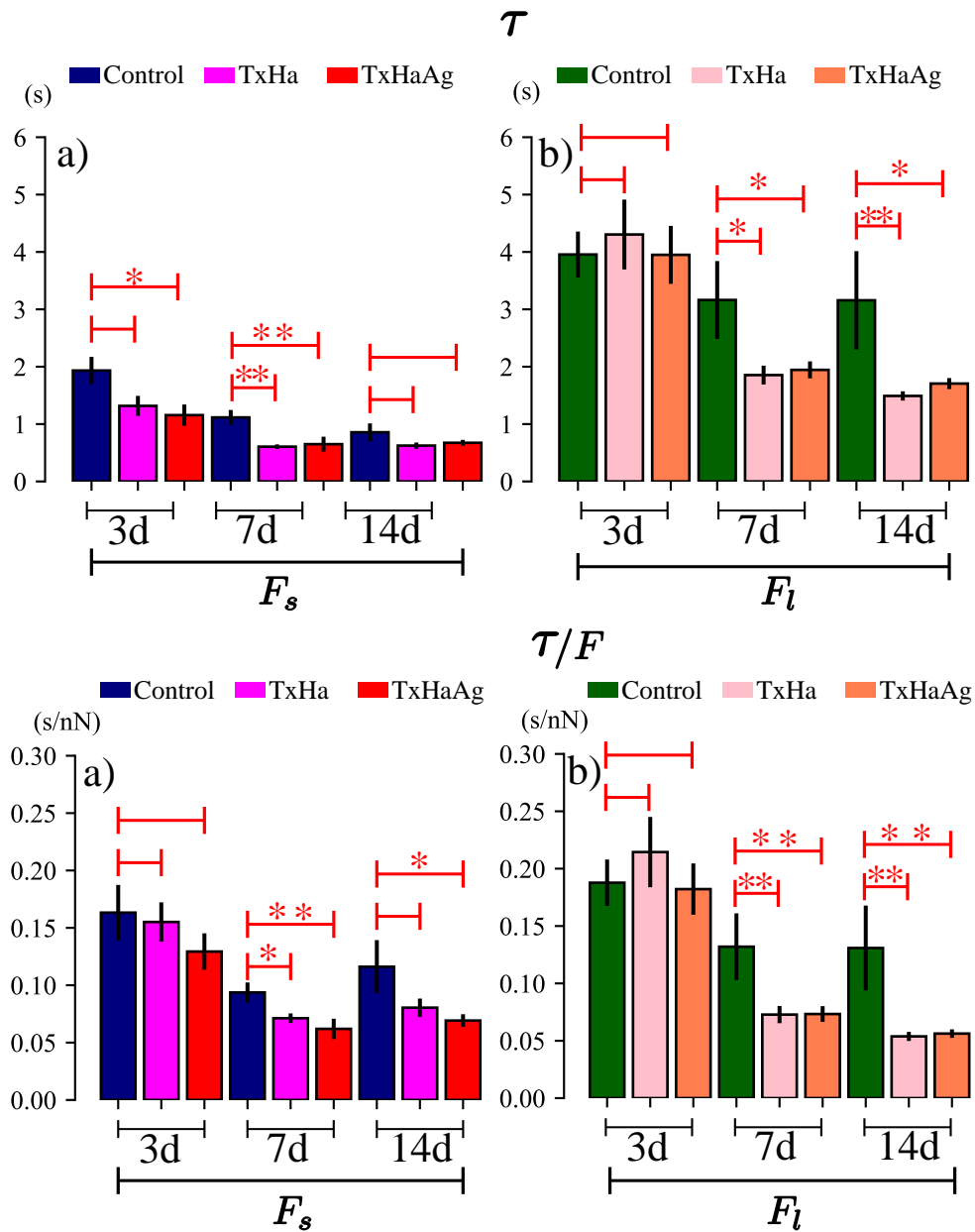


Figura 6.20: Valor del parámetro E_1 de células osteosarcoma obtenido a partir del ajuste de las curvas de relajación con el modelo fraccional de Zener. Las mediciones fueron realizadas en células a los 3, 7 y 14 días de incubación, señaladas con la leyenda 3d, 7d y 14d respectivamente. En cada experimento analizamos un grupo de células control, un grupo de células con hidroxiapatita (TxHa) y uno más con hidroxiapatita y nano-partículas de plata (TxHaAG). a) Valores obtenidos aplicando fuerzas menores a 18 nN. b) Valores obtenidos aplicando fuerzas mayores a 18 nN. Los datos se representan como el promedio \pm el error estándar. En la parte superior mostramos el parámetro E_1 y en la parte inferior E_1/F . El * indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos señalados (* $\implies p < 0.05$, ** $\implies p < 0.005$).

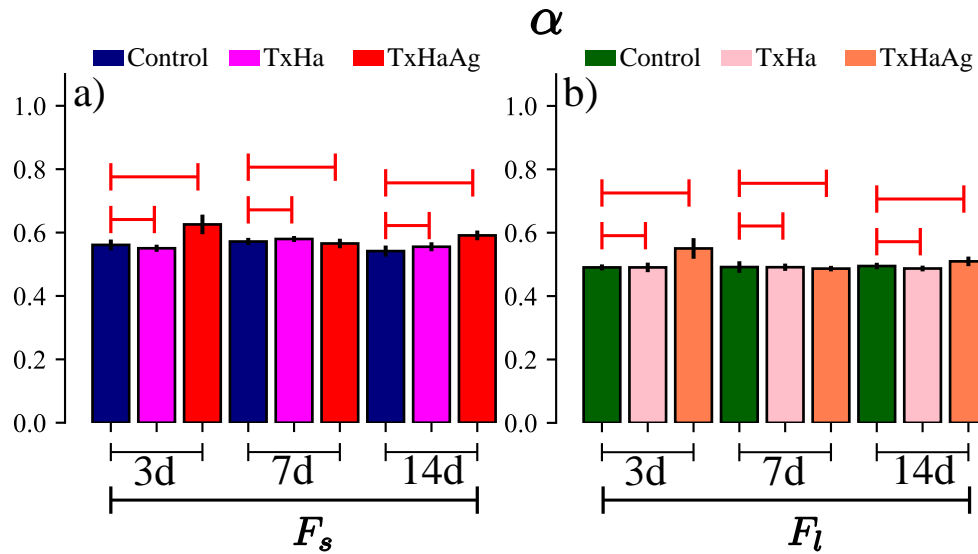


Figura 6.21: Valor de la mediana de los parámetros obtenidos a partir del ajuste de las curvas de fuerza vs tiempo con el modelo de Zener fraccional para células control y células con Hidroxiapatita aplicando una fuerza menor a 18 nN ($F < 18$ nN). Las células se midieron a los 3, 7 y 14 días de sembradas, representadas con 3d, 7d y 14d respectivamente. Hicimos un análisis estadístico entre los grupos señalados con la línea roja. El * indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados (* $\implies p < 0.05$, ** $\implies p < 0.005$). Las barras de error representan el error estándar.

6.5.5. Módulo de Young

Al realizar 4 compresiones en la célula es posible que reaccione al esfuerzo y provoque cambios en sus propiedades mecánicas. Los parámetros visco-elásticos los obtuvimos a partir de las curvas que realizamos en la segunda y cuarta compresión. Por lo tanto, para identificar si los cambios son debido a las compresiones analizamos las curvas de fuerza-distancia para cuantificar cambios en el módulo de Young.

La figura 6.22 mostramos el módulo de Young de las células control y las células con Ha y HaAg en los 4 ciclos. En los cultivos de 3 días con Ha y HaAg el módulo de Young aumenta ligeramente después de la primer compresión. Los cambios que hay en el módulo de Young del ciclo uno al ciclo dos no llegan a ser significativos, $p \approx 0.1$ para TxHa y $p \approx 0.06$ para TxHaAg. De la segunda a la tercera, aplicamos una fuerza mayor y se observó un incremento en el módulo en todas las muestras causado probablemente por el aumento de la fuerza. De la tercera a la cuarta compresión, la fuerza aplicada fue de la misma magnitud y no observamos cambios en la elasticidad.

En control de 3 días y en los cultivos de 7 y 14 días sólo vemos cambios cuando aumenta la fuerza aplicada, es decir, en estas muestras aparentemente no hay efectos producidos por las compresiones.

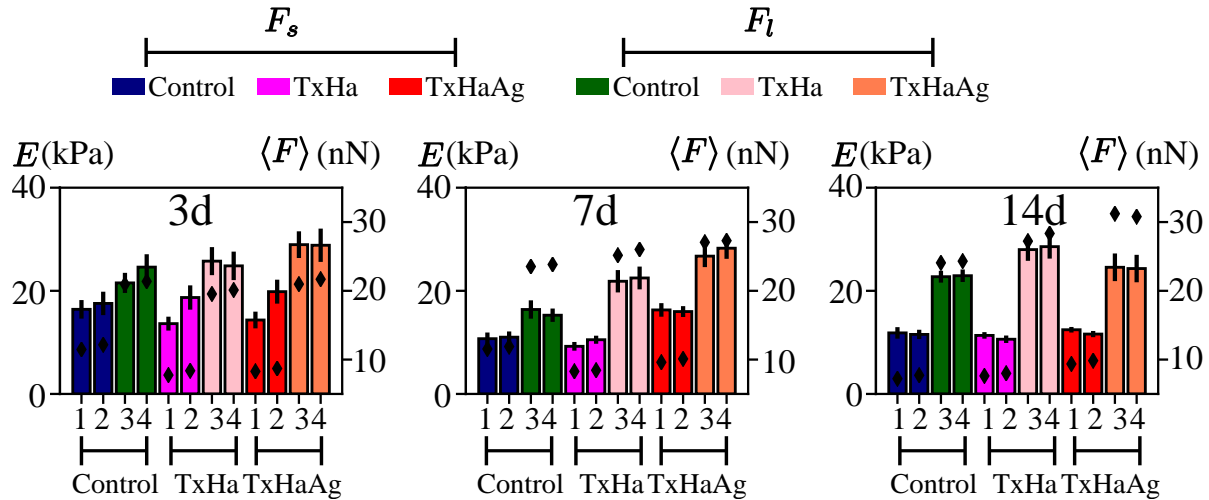


Figura 6.22: Módulo de Young de células osteosarcoma a lo largo de cuatro compresiones. El valor obtenido en la primer compresión lo señalamos con el número 1 y así sucesivamente. Las barras representan el valor promedio del módulo de Young y los rombos señalan la fuerza promedio que se aplicó en cada muestra.

6.6. Efecto del tiempo de incubación en osteosarcoma

Algo que notamos con el grupo control es que independientemente de la fuerza aplicada los módulos elásticos y viscosos disminuyen de 3 a 7 días, y de 7 a 14 días se observa un aumento en estos módulos. En cuanto al tiempo de relajación, este disminuye a lo largo del tiempo mientras que el exponente fraccionario permanece constante a lo largo del tiempo, el cambio es significativo entre los módulos obtenidos a los 3 días y los obtenidos a los 7 días ($p < 0.005$).

6.6.1. Observaciones

Identificamos cambios en el parámetro E_0 a los 3 y 7 días debida a los tratamientos. En ambos casos el valor aumentó, esto podría estar indicando que la hidroxiapatita está produciendo cambios al interior de la célula. Aparentemente, el efecto de la hidroxiapatita en las células osteosarcoma no se ve afectado por el efecto de las nano-partículas de plata.

El parámetro E_1 es muy sensible a cambios en la fuerza. Es posible que algunas de las discrepancias obtenidas en la estadística se deban a la magnitud de la fuerza aplicada. En la tabla 6.1 podemos ver que en el caso de $F < 18$ nN la fuerza promedio aplicada a los tratamientos es menor a la de control, mientras que en fuerzas mayores a 18 nN, la fuerza aplicada a los tratamientos fue ligeramente mayor a la de control. Cuando dividimos entre la fuerza el comportamiento obtenido con F_s se acerca más al obtenido con F_l . Por tanto, en el caso de células de osteosarcoma, la fuerza aplicada es un factor importante para la caracterización de las mismas. otro factor puede ser en respuesta de la célula a las compresiones realizadas durante el experimento como ocurre en los cultivos de 3 días con Ha y HaAg.

$F < 18 \text{ nN}$			$F > 18 \text{ nN}$		
3d	7d	14d	3d	7d	14d
Control					
12.0 ± 3.7	11.6 ± 2.4	7.7 ± 1.3	21.6 ± 1.5	23.8 ± 2.1	24.3 ± 2.0
TxHa					
8.1 ± 2.6	8.4 ± 1.0	7.6 ± 1.3	20.1 ± 1.4	26.4 ± 2.1	34.0 ± 3.5
TxHaAg					
8.2 ± 2.9	9.9 ± 2.4	8.8 ± 1.5	21.5 ± 1.9	27.7 ± 2.3	29.2 ± 3.0

Tabla 6.1: Valor medio de la fuerza máxima expresada en nN para los grupos: Control, TxHa y TxHaAg.

En el tiempo de relajación observamos que este disminuye con los tratamientos. Esta disminución se presentó en los cultivos de 7 y 14 días. Además, el tiempo de relajación en células control es proporcional a la fuerza aplicada. A pesar de esto, cuando analizamos τ/F la dispersión entre estos valores no disminuye. Lo que nos lleva a pensar que existen otros factores que producen la dispersión en los datos. Por ejemplo, las diferentes formas que adoptan las células. En un mismo cultivo de células osteosarcoma encontramos células con diferentes formas como se observa en la Fig. 6.2. La forma que tiene la célula podría estar influyendo en la manera en que se ancla a la superficie, y a su vez en el soporte de la célula, produciendo variaciones en los parámetros visco-elásticos.

El efecto de los tratamientos comienza a notarse en los parámetros elásticos en la respuesta final de la célula. El parámetro E_0 aumenta con los tratamientos. De alguna manera la respuesta de la célula ante el esfuerzo es mayor cuando es tratada con Ha y Ha+Ag. A los 7 días se mantiene esa respuesta interna pero a los 14 días ya no vemos cambios. A partir de 7 días, hay otro tipo de cambios, observamos mayor rigidez y un tiempo de relajación más pequeño en las células con Ha y Ha+Ag. A los 14 días vemos diferencias principalmente en el tiempo de relajación.

6.7. Conclusiones

En este capítulo investigamos las propiedades visco-elásticas de células de osteosarcoma usando el modelo fraccional de Zener. También estudiamos los cambios que sufren las propiedades visco-elásticas cuando se encuentran en un medio con hidroxiapatita y otro más que contiene hidroxiapatita y nano-partículas de plata. Las mediciones fueron realizadas en células a los 3, 7 y 14 días de incubación.

Las mediciones de los diferentes sistemas de células fueron caracterizados usando dos rangos de fuerza, fuerzas pequeñas ($F < 18 \text{ nN}$) y fuerzas grandes ($F > 18 \text{ nN}$).

Los cultivos de tres días con Ha y HaAg son mecanosensibles en fuerzas menores a 18 nN. En fuerzas mayores a 18 nN no tenemos evidencia de que sean mecanosensibles.

Encontramos que el parámetro E_0 no depende de la fuerza aplicada.

También encontramos que, en las células de osteosarcoma, la relación entre los parámetros E_1/F y τ/F se mantiene constante para ambas fuerzas utilizadas, esta relación se cumple tanto para células solas como para células agrupadas.

El comportamiento de los parámetros visco-elásticos de células aisladas es diferente al de las células agrupadas. Estas diferencias pueden deberse a que hay contribuciones de las células que rodean a la célula medida, en los cultivos a 14 días.

También observamos que los valores de los parámetros cambian con los días de incubación, lo cual indica que la mecánica de la célula se está modificando.

Los efectos que producen la hidroxiapatita y la hidroxiapatita+plata en las propiedades mecánicas de células de osteosarcoma se reflejan principalmente en el tiempo de relajación. Estos materiales producen una disminución en este parámetro.

Capítulo 7

Conclusiones y perspectivas

7.1. Conclusiones

En esta tesis presentamos el estudio de las propiedades mecánicas de diferentes líneas celulares de cáncer mediante microscopía de fuerza atómica. Las líneas investigadas fueron MDA-MB-231 (cáncer de mama), DU-145 (cáncer de próstata), HT-29 (cáncer de colon) y osteosarcoma (cáncer de hueso).

Se implementaron dos metodologías para investigar de las propiedades visco-elásticas: la metodología de Ting que usa curvas de fuerza vs. distancia y la metodología de Darling que estudia las curvas de relajación.

Las propiedades visco-elásticas fueron evaluadas empleando diferentes modelos mecánicos para representar el módulo de relajación. Los modelos mecánicos usados fueron el modelo SLS, el GM, el PL y el FZ.

Encontramos que la línea celular DU-145 es sensible a los esfuerzos ejercidos por la punta del AFM, indicando que esta línea celular es mecano-sensible cuando se somete a fuerzas de ≈ 20 nN.

Con la metodología de Ting hay alguna inconsistencias entre los parámetros obtenidos con los diferentes modelos. Mientras que con la metodología de Darling la información es consistente.

El modelo fraccional de Kelvin (modelo de ley de potencias) y el modelo fraccional de Zener son los más adecuados para modelar el comportamiento de las células MDA-MB-231 y DU-145.

Estudiamos las propiedades mecánicas de la línea celular HT-29 de cáncer de colon y los cambios producidos por la doxorrubicina a dos tiempos diferentes de exposición usando imágenes de AFM y curvas de fuerza.

Obtuvimos las propiedades mecánicas usando sondas coloidales y puntas cónicas. Observamos que el tiempo de relajación es un buen candidato para estudiar el efecto de un tratamiento

farmacológico, ya que su comportamiento es independiente del tamaño de la punta.

Con el análisis de la morfología y las propiedades mecánicas encontramos que la doxorrubicina produce cambios en las células HT-29. Los cuales se identifican bien con el análisis del modelo fraccional de Zener.

En el estudio de las propiedades visco-elásticas de osteosarcoma encontramos que la hidroxiapatita y la hidroxiapatita+plata producen cambios en las células de osteosarcoma y estos pueden ser evaluados con el modelo fraccional de Zener.

Estudiamos los parámetros visco-elásticos de células de osteosarcoma usando dos rangos de fuerza: fuerzas pequeñas ($F < 18$ nN) y fuerzas grandes ($F > 18$ nN) usando el modelo fraccional de Zener. Encontramos que en las células de osteosarcoma la relación entre los parámetros E_1/F y τ/F se mantiene constante para ambas fuerzas utilizadas, esta relación se cumple tanto para células solas como para células agrupadas.

Encontramos que los cultivos de tres días con Ha y HaAg son mecano-sensibles en fuerzas menores a 18 nN. En fuerzas mayores a 18 nN no tenemos evidencia de que mantengan este mismo comportamiento.

En las células de osteosarcoma el comportamiento de los parámetros visco-elásticos de células solas es diferente al de las células agrupadas. Estas diferencias pueden deberse a que hay contribuciones de las células que rodean a la célula medida, en los cultivos a 14 días.

Los cambios producidos por la hidroxiapatita y la hidroxiapatita+plata se reflejan principalmente en el tiempo de relajación. Estos materiales producen una disminución en el tiempo de relajación de las células de osteosarcoma. Finalmente podemos concluir que el cálculo fraccional resulta ser una buena herramienta para describir el comportamiento mecánico de células cancerosas.

En resumen, en este trabajo se desarrolló una metodología para estudiar propiedades visco-elásticas de células cancerosas por microscopia de fuerza atómica. Además se propuso un modelo fraccional para la descripción de las propiedades visco-elásticas del sistema. Se encontró que este modelo es cuantitativamente mejor que los ya propuestos en la literatura. El modelo fraccional es capaz de describir procesos celulares como son: los cambios visco-elásticos de células debido al efecto de una droga y los procesos de regeneración de tejido en el caso de osteosarcoma adicionado con hidroxiapatita e hidroxiapatita+plata.

7.2. Perspectivas

En este trabajo utilizamos diferentes modelos mecánicos para la caracterización de las propiedades visco-elásticas de células cancerosas. Caracterizamos diferentes líneas celulares e identificamos los parámetros que pueden ayudar a encontrar la huella mecánica de la célula o

en su caso a evaluar el efecto que tienen los tratamientos en las propiedades mecánicas. Dentro de este proceso de caracterización encontramos una dispersión grande en las propiedades mecánicas. Es posible que la dispersión de los datos se deba a las diferencias morfológicas que se presentan en un cultivo celular. Para tratar de esclarecer este punto, sería conveniente estudiar la relación entre las propiedades mecánicas y la morfología de la célula. Para esto, sería necesario estudiar la morfología y las propiedades mecánicas de la célula al mismo tiempo, en otras palabras, es necesario utilizar un equipo de AFM acoplado con un microscopio óptico invertido de fluorescencia.

En el estudio de la mecánica de la célula se ha encontrado que la rigidez de la célula depende de las propiedades mecánicas del sustrato. Este sistema se asemeja a estudiar células cancerosas metastásicas. Sería importante estudiar como varían los parámetros visco-elásticos de una misma línea celular cuando se encuentra en sustratos con propiedades mecánicas muy distintas.

Algunos estudios han mostrado que las propiedades mecánicas de la célula cambian cuando varía la velocidad de deformación. Para entender mejor los parámetros visco-elásticos es necesario identificar los cambios en la mecánica de la célula cuando se modifican los parámetros del experimento, tales como la velocidad de indentación. Considerando que la célula es un sistema muy complejo, quizá deberíamos comenzar por estudiar sistemas más simples como las vesículas. También es necesario estudiar diversos materiales y una gran variedad de células sanas y células cancerosas para entender mejor los parámetros visco-elásticos.

Para entender mejor la célula desde el punto de vista mecánico es importante diseñar experimentos programados, por ejemplo, a través de algún proceso conocido inhibir la producción de tubulina, esto con la intención de que la dinámica de crecimiento de los microtubulos no se modifique y esto nos ayude a elucidar los efectos de la inhibición de la tubulina en las propiedades visco-elásticas de la célula.

Apéndice A

Función de Mittag-Leffler en Python

```
from scipy.stats import *
from scipy.special import gamma
from statsmodels.nonparametric.smoothers_lowess import lowess
from scipy.optimize import curve_fit
from scipy.integrate import quad
import numpy as np

def Kf(r, alf, bet, z):
    res = (1/(np.pi*alf))*r**((1-bet)/alf)*np.exp(-r**(1/alf))
    res *= (r*np.sin(np.pi*(1-bet)) - z*np.sin(np.pi*(1-bet+alf)))
    res /= (r**2 - 2*r*z*np.cos(np.pi*alf)+z**2)
    return res

def P(phi, alf, bet, eps, z):
    w = eps**(1/alf)*np.sin(phi/alf) + phi*(1+(1-bet)/alf)
    res = eps**(1+(1-bet)/alf)/(2*np.pi*alf)
    res *= np.exp(eps**(1/alf)*np.cos(phi/alf))*(np.cos(w)+1j*np.sin(w))
    res /= eps*np.exp(1j*phi)-z
    return res

def mlf2(z, alf, bet, K=10):
    e = 1/gamma(bet)
    for k in range(1,K):
        e += z**k/gamma(alf*k+bet)
    return e

#####
#####
def mlf(z, alf, bet, K=10):
```

```

rho = 1e-10
if z == 0:
    mit = 1/gamma(bet)
    return mit.real
elif abs(z)<1e-15:
    mit = 1/gamma(bet)
    return mit.real
#####
##### alf > 1
elif 1 < alf:
    k0 = int(np.ceil(alf))
    e = 0
    for k in range(k0):
        z1 = z**(1/k0)
        w = np.exp(1j* 2 * np.pi*k/k0)
        e += (1/(k0))*mlf( z1*w, alf/k0, bet,K)
    return e.real
#####
#####
elif abs(z) < 1 :
    k0= int(max(abs(np.ceil((1-bet)/alf)),abs(np.log(rho*(1-abs(z)))))/
    e=0
    for k in range(k0):
        e += z**(k)/gamma(bet+alf*k)
    return(e.real)
elif abs(z) > abs(10+5*alf):
    k0 = int(np.ceil(abs(-np.log(rho)/np.log(abs(z)))))
    if abs(np.angle(z)) < alf*np.pi/4 + 0.5*min(np.pi,alf*np.pi):
        e = -(1/alf)*z**((1-bet)/alf)*np.exp(z**(1/alf))
        for k in range(1,k0):
            e += z**(-k)/gamma(bet-alf*k)
        return(-e.real)
    else :
        e = 0
        for k in range(1,k0):
            e += z**(-k)/gamma(bet-alf*k)
            #e += -t
        return (-e.real)
else :
    ji0 = max(1,2*abs(z),(-np.log(np.pi*rho/6))**alf)
    if abs(np.angle(z)) > alf*np.pi:
        if bet <= 1+alf:
            I1, err = quad(Kf,0,ji0, args=(alf,bet,z))

```

```

        mit = I1
        return mit.real
    else:
        I1, err = quad(Kf, 1, ji0, args=(alf, bet, z))
        I2, err2 = quad(P, -np.pi*alf, np.pi*alf, args=(alf, bet, 1, z))
        mit = I1+I2
        return mit.real
elif abs(np.angle(z)) < alf*np.pi:
    if bet <= 1+alf:
        I1, err = quad(Kf, 0, ji0, args=(alf, bet, z))
        mit = I1 + (1/alf)*z**((1-bet)/alf)*np.exp(z**(1/alf))
        return mit.real
    else:
        eps=abs(z)/2
        I1, err = quad(Kf, eps, ji0, args=(alf, bet, z))
        I2, err2 = quad(P, -np.pi*alf, np.pi*alf, args=(alf, bet, eps, z))
        I1 = I1 + 1/alf*z**((1-bet)/alf)*np.exp(z**(1/alf))
        mit = I1+I2
        return mit.real
else:
    eps=abs(z)+1/2
    I1, err = quad(Kf, eps, ji0, args=(alf, bet, z))
    I2, err2 = quad(P, -np.pi*alf, np.pi*alf, args=(alf, bet, eps, z))
    mit = I1+I2
    return mit.real
return 0
#####
#####
def mlfm(z, a, b, n):
    if n==0:
        return mlf(z, a, b)
    else:
        h = mlfm(z, a, b-1, n-1)
        A = mlfm(z, a, b, n-1)
        h += (b-float(n-1)*a-1)*float(A)
    return (1/z)*h

def fpp2(delta, nu, n, t):
    z = nu*t**delta
    retur

```

Bibliografía

- [1] H Milton Jr, Charles D Stiles, et al. *Molecular dynamics in biological membranes*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [2] Harvey Lodish, Arnold Berk, Chris A Kaiser, Monty Krieger, Matthew P Scott, Anthony Bretscher, Hidde Ploegh, Paul Matsudaira, et al. *Molecular cell biology*. Macmillan, 2008.
- [3] Viola Vogel and Michael Sheetz. Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(4):265–275, 2006.
- [4] Paul A Janmey and Christopher A McCulloch. Cell mechanics: integrating cell responses to mechanical stimuli. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 9:1–34, 2007.
- [5] Brenton D Hoffman and John C Crocker. Cell mechanics: dissecting the physical responses of cells to force. *Annual review of biomedical engineering*, 11:259–288, 2009.
- [6] A Wayne Orr, Brian P Helmke, Brett R Blackman, and Martin A Schwartz. Mechanisms of mechanotransduction. *Developmental cell*, 10(1):11–20, 2006.
- [7] Paolo P Provenzano and Patricia J Keely. Mechanical signaling through the cytoskeleton regulates cell proliferation by coordinated focal adhesion and rho gtpase signaling. *Journal of cell science*, 124(8):1195–1205, 2011.
- [8] Ma Igorzata Lekka, Katarzyna Pogoda, Justyna Gostek, Olesya Klymenko, Szymon Prauzner-Bechcicki, Joanna Wiltowska-Zuber, Justyna Jaczewska, Janusz Lekki, and Zbigniew Stachura. Cancer cell recognition – mechanical phenotype. *Micron*, 43(12):1259 – 1266, 2012. Special issue on AFM in Biology & Bionanomedicine.
- [9] Tadanori Mammoto, Akiko Mammoto, and Donald E Ingber. Mechanobiology and developmental control. *Annual review of cell and developmental biology*, 29:27–61, 2013.
- [10] Qing Luo, Dongdong Kuang, Bingyu Zhang, and Guanbin Song. Cell stiffness determined by atomic force microscopy and its correlation with cell motility. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1860(9):1953–1960, 2016.
- [11] Donald Ingber. Mechanobiology and diseases of mechanotransduction. *Annals of medicine*, 35(8):564–577, 2003.

- [12] Claudia Tanja Mierke. The fundamental role of mechanical properties in the progression of cancer disease and inflammation. *Reports on Progress in Physics*, 77(7):076602, 2014.
- [13] Gabriel YH Lee and Chwee T Lim. Biomechanics approaches to studying human diseases. *Trends in biotechnology*, 25(3):111–118, 2007.
- [14] CT Lim, EH Zhou, and ST Quek. Mechanical models for living cells—a review. *Journal of biomechanics*, 39(2):195–216, 2006.
- [15] C.T. Lim, E.H. Zhou, A. Li, S.R.K. Vedula, and H.X. Fu. Experimental techniques for single cell and single molecule biomechanics. *Materials Science and Engineering: C*, 26(8):1278 – 1288, 2006. Proceedings of the First TMS Symposium on Biological Materials Science.
- [16] Xin Wu, Mariappan Muthuchamy, and Doodipala Samba Reddy. Atomic force microscopy protocol for measurement of membrane plasticity and extracellular interactions in single neurons in epilepsy. *Frontiers in aging neuroscience*, 8:88, 2016.
- [17] Lucy V Hiscox, Curtis L Johnson, Matthew DJ McGarry, Helen Marshall, Craig W Ritchie, Edwin JR van Beek, Neil Roberts, and John M Starr. Mechanical property alterations across the cerebral cortex due to alzheimer’s disease. *Brain Communications*, 2019.
- [18] Diana E Jaalouk and Jan Lammerding. Mechanotransduction gone awry. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(1):63–73, 2009.
- [19] Chwee Teck LIM. Single cell mechanics study of the human disease malaria. *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, 1(1):82–92, 2006.
- [20] M. Dao, C.T. Lim, and S. Suresh. Mechanics of the human red blood cell deformed by optical tweezers. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, 51(11):2259 – 2280, 2003. Proceedings of a Symposium on Dynamic Failure and Thin Film Mechanics, honoring Professor L.B. Freund.
- [21] MM Brandao, A Fontes, ML Barjas-Castro, LC Barbosa, FF Costa, CL Cesar, and STO Saad. Optical tweezers for measuring red blood cell elasticity: application to the study of drug response in sickle cell disease. *European journal of haematology*, 70(4):207–211, 2003.
- [22] Julien Husson, Karine Chemin, Armelle Bohineust, Claire Hivroz, and Nelly Henry. Force generation upon t cell receptor engagement. *PloS one*, 6(5):e19680, 2011.
- [23] Murali M Yallapu, Kalpana S Katti, Dinesh R Katti, Sanjay R Mishra, Sheema Khan, Meena Jaggi, and Subhash C Chauhan. The roles of cellular nanomechanics in cancer. *Medicinal research reviews*, 35(1):198–223, 2015.
- [24] Carmela Rianna and Manfred Radmacher. Cell mechanics as a marker for diseases: Biomedical applications of afm. *AIP Conference Proceedings*, 1760(1):020057, 2016.

- [25] Vinay Swaminathan, Karthikeyan Mythreye, E Tim O'Brien, Andrew Berchuck, Gerard C Blobe, and Richard Superfine. Mechanical stiffness grades metastatic potential in patient tumor cells and in cancer cell lines. *Cancer research*, 71(15):5075–5080, 2011.
- [26] SM Seyedpour, M Pachenari, M Janmaleki, M Alizadeh, and H Hosseinkhani. Effects of an antimetabolic drug on mechanical behaviours of the cytoskeleton in distinct grades of colon cancer cells. *Journal of biomechanics*, 48(6):1172–1178, 2015.
- [27] Wenwei Xu, Roman Mezencev, Byungkyu Kim, Lijuan Wang, John McDonald, and Todd Sulchek. Cell stiffness is a biomarker of the metastatic potential of ovarian cancer cells. *PloS one*, 7(10):e46609, 2012.
- [28] Jinghui Sun, Qing Luo, Lingling Liu, Bingyu Zhang, Yisong Shi, Yang Ju, and Guanbin Song. Biomechanical profile of cancer stem-like cells derived from mhcc97h cell lines. *Journal of biomechanics*, 49(1):45–52, 2016.
- [29] Sharda Yadav, Matthew J Barton, and Nam-Trung Nguyen. Biophysical properties of cells for cancer diagnosis. *Journal of biomechanics*, 86:1–7, 2019.
- [30] Xiaofang Cai, Xiaobo Xing, Jiye Cai, Qian Chen, Shixian Wu, and Feicheng Huang. Connection between biomechanics and cytoskeleton structure of lymphocyte and Jurkat cells: an AFM study. *Micron*, 41(3):257–262, 2010.
- [31] Ting-Jung Chen, Chia-Ching Wu, and Fong-Chin Su. Mechanical models of the cellular cytoskeletal network for the analysis of intracellular mechanical properties and force distributions: A review. *Medical engineering & physics*, 34(10):1375–1386, 2012.
- [32] Mi Li, Lianqing Liu, Xiubin Xiao, Ning Xi, and Yuechao Wang. Effects of methotrexate on the viscoelastic properties of single cells probed by atomic force microscopy. *Journal of biological physics*, 42(4):551–569, 2016.
- [33] Pablo D Garcia, Carlos R Guerrero, and Ricardo Garcia. Time-resolved nanomechanics of a single cell under the depolymerization of the cytoskeleton. *Nanoscale*, 9(33):12051–12059, 2017.
- [34] J. M. Mitchison and M. M. Swann. The mechanical properties of the cell surface. *Journal of Experimental Biology*, 31(3):443–460, 1954.
- [35] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and Steven Chu. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Opt. Lett.*, 11(5):288–290, May 1986.
- [36] G. Binnig, C. F. Quate, and Ch. Gerber. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.*, 56:930–933, Mar 1986.
- [37] Carmela Rianna and Manfred Radmacher. Comparison of viscoelastic properties of cancer and normal thyroid cells on different stiffness substrates. *European Biophysics Journal*, 46(4):309–324, May 2017.

- [38] Carmela Rianna, Prem Kumar, and Manfred Radmacher. The role of the microenvironment in the biophysics of cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 73, 07 2017.
- [39] Heinrich Hertz, Daniel Evan Jones, and George Adolphus Schott. *Miscellaneous papers*. Macmillan and Company, 1896.
- [40] Ian N. Sneddon. The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *International Journal of Engineering Science*, 3(1):47–57, 1965.
- [41] B Carmichael, H Babahosseini, S N Mahmoodi, and M Agah. The fractional viscoelastic response of human breast tissue cells. *Physical Biology*, 12(4):46001, 2015.
- [42] Jordi Alcaraz, Lara Buscemi, Mireia Grabulosa, Xavier Trepas, Ben Fabry, Ramon Farré, and Daniel Navajas. Microrheology of human lung epithelial cells measured by atomic force microscopy. *Biophysical journal*, 84(3):2071–2079, 2003.
- [43] Kenneth Langstreth Johnson, Kevin Kendall, and AD Roberts. Surface energy and the contact of elastic solids. *Proceedings of the royal society of London. A. mathematical and physical sciences*, 324(1558):301–313, 1971.
- [44] Boris V Derjaguin, Vladimir M Muller, and Yu P Toporov. Effect of contact deformations on the adhesion of particles. *Journal of Colloid and interface science*, 53(2):314–326, 1975.
- [45] E. M. Darling, S. Zauscher, and F. Guilak. Viscoelastic properties of zonal articular chondrocytes measured by atomic force microscopy. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(6):571–579, 2006.
- [46] R.M. Christensen. Chapter i - viscoelastic stress strain constitutive relations. In R.M. Christensen, editor, *Theory of Viscoelasticity (Second Edition)*, pages 1 – 34. Academic Press, second edition edition, 1982.
- [47] John E Sader, Ian Larson, Paul Mulvaney, and Lee R White. Method for the calibration of atomic force microscope cantilevers. *Review of Scientific Instruments*, 66(7):3789–3798, 1995.
- [48] JP Cleveland, Srinivas Manne, D Bocek, and PK Hansma. A nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning force microscopy. *Review of scientific instruments*, 64(2):403–405, 1993.
- [49] LD Landau and EM Lifshitz. *Theory of elasticity*. Pergamon Press, Oxford, UK, 3 edition, 1986.
- [50] Yuji Ohta, Hiroshi Okamoto, Masahiro Kanno, and Tomoko Okuda. Atomic force microscopic observation of mechanically traumatized erythrocytes. *Artificial organs*, 26(1):10–17, 2002.

- [51] Arnaldo da Silva Junior and Omar Teschke. Dynamics of the antimicrobial peptide pglA action on escherichia coli monitored by atomic force microscopy. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(6-7):1103–1110, 2005.
- [52] Yuri M Efremov, Takaharu Okajima, and Arvind Raman. Measuring viscoelasticity of soft biological samples using atomic force microscopy. *Soft matter*, 16(1):64–81, 2020.
- [53] Manfred Radmacher. Measuring the elastic properties of biological samples with the afm. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*, 16(2):47–57, 1997.
- [54] Igor Sokolov, Maxim E Dokukin, and Nataliia V Guz. Method for quantitative measurements of the elastic modulus of biological cells in afm indentation experiments. *Methods*, 60(2):202–213, 2013.
- [55] Jia-Jye Lee, Satish Rao, Gaurav Kaushik, Evren U Azeloglu, and Kevin D Costa. Dehomogenized elastic properties of heterogeneous layered materials in afm indentation experiments. *Biophysical journal*, 114(11):2717–2731, 2018.
- [56] Yuri M Efremov, Wen-Horng Wang, Shana D Hardy, Robert L Geahlen, and Arvind Raman. Measuring nanoscale viscoelastic parameters of cells directly from afm force-displacement curves. *Scientific reports*, 7(1):1541, 2017.
- [57] TCT Ting. The contact stresses between a rigid indenter and a viscoelastic half-space. *Journal of Applied Mechanics*, 33(4):845–854, 1966.
- [58] Hisashi Haga, Masafumi Nagayama, and Kazushige Kawabata. Imaging mechanical properties of living cells by scanning probe microscopy. *Current Nanoscience*, 3(1):97–103, 2007.
- [59] William H. Kruskal and W. Allen Wallis. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47(260):583–621, 1952.
- [60] Kozaburo Hayashi and Mayumi Iwata. Stiffness of cancer cells measured with an afm indentation method. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 49:105–111, 2015.
- [61] Loredana Serpe, Maria Graziella Catalano, Roberta Cavalli, Elena Ugazio, Ornella Bosco, Roberto Canaparo, Elisabetta Muntoni, Roberto Frairia, Maria Rosa Gasco, Mario Eandi, et al. Cytotoxicity of anticancer drugs incorporated in solid lipid nanoparticles on ht-29 colorectal cancer cell line. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58(3):673–680, 2004.
- [62] Stephane Oudard, Alain Thierry, Timothy J Jorgensen, and Aquilur Rahman. Sensitization of multidrug-resistant colon cancer cells to doxorubicin encapsulated in liposomes. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 28(4):259–265, 1991.

- [63] Seong-Oh Kim, Joonhui Kim, Takaharu Okajima, and Nam-Joon Cho. Mechanical properties of paraformaldehyde-treated individual cells investigated by atomic force microscopy and scanning ion conductance microscopy. *Nano Convergence*, 4(1):5, 2017.
- [64] N ria Gavara and Richard S. Chadwick. Determination of the elastic moduli of thin samples and adherent cells using conical atomic force microscope tips. *Nature Nanotechnology*, 7(11):733–736, nov 2012.
- [65] Olli J. Arola, Antti Saraste, Kari Pulkki, Markku Kallajoki, Martti Parvinen, and Liisa Maria Voipio-Pulkki. Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis. *Cancer Research*, 60(7):1789–1792, 2000.
- [66] A. Molinari, A. Calcabrini, P. Crateri, and G. Arancia. Interaction of anthracyclinc antibiotics with cytoskeletal components of cultured carcinoma cells (CG5). *Experimental and Molecular Pathology*, 53(1):11–33, 1990.
- [67] Lifu Xiao, Mingjie Tang, Qifei Li, and Anhong Zhou. Non-invasive detection of biomechanical and biochemical responses of human lung cells to short time chemotherapy exposure using AFM and confocal Raman spectroscopy. *Analytical Methods*, 5(4):874–879, 2013.
- [68] Martha E Grady, Russell J Composto, and David M Eckmann. Cell elasticity with altered cytoskeletal architectures across multiple cell types. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 61:197–207, 2016.
- [69] Huiqing Liu, Nan Wang, Zhe Zhang, Hongda Wang, Jun Du, and Jilin Tang. Effects of tumor necrosis factor- α on morphology and mechanical properties of HCT116 human colon cancer cells investigated by atomic force microscopy. *Scanning*, 2017, 2017.
- [70] Kyung Sook Kim, Chang Hoon Cho, Eun Kuk Park, Min Hyung Jung, Kyung Sik Yoon, and Hun Kuk Park. AFM-Detected apoptotic changes in morphology and biophysical property caused by paclitaxel in Ishikawa and HeLa cells. *PLoS ONE*, 7(1):e30066, 2012.
- [71] R. Vargas-Pinto, H. Gong, A. Vahabikashi, and M. Johnson. The effect of the endothelial cell cortex on atomic force microscopy measurements. *Biophysical Journal*, 105(2):300–309, 2013.
- [72] M. Pachenari, S. M. Seyedpour, M. Janmaleki, S. Babazadeh Shayan, S. Taranejoo, and H. Hosseinkhani. Mechanical properties of cancer cytoskeleton depend on actin filaments to microtubules content: Investigating different grades of colon cancer cell lines. *Journal of Biomechanics*, 47(2):373–379, 2014.
- [73] Chuanzhuang Zhao, Guangcui Yuan, Di Jia, and Charles C Han. Macrogel induced by microgel: bridging and depletion mechanisms. *Soft Matter*, 8(26):7036–7043, 2012.
- [74] Maolin Du, Zaihua Wang, and Haiyan Hu. Measuring memory with the order of fractional derivative. *Scientific Reports*, 3(1):3431, 2013.

- [75] Pablo D Garcia, Carlos R Guerrero, and Ricardo Garcia. Time-resolved nanomechanics of a single cell under the depolymerization of the cytoskeleton. *Nanoscale*, 9:12051–12059, 2017.
- [76] Susana Moreno-Flores, Rafael Benitez, Maria dM Vivanco, and José Luis Toca-Herrera. Stress relaxation microscopy: Imaging local stress in cells. *Journal of biomechanics*, 43(2):349–354, 2010.
- [77] Caroline F Thorn, Connie Oshiro, Sharon Marsh, Tina Hernandez-Boussard, Howard McLeod, Teri E Klein, and Russ B Altman. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and genomics*, 21(7):440, 2011.
- [78] Luca Ianeselli, Fajun Zhang, Maximilian WA Skoda, Robert MJ Jacobs, Richard A Martin, Shirley Callow, Sylvain Prevost, and Frank Schreiber. Protein-protein interactions in ovalbumin solutions studied by small-angle scattering: effect of ionic strength and the chemical nature of cations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(11):3776–3783, 2010.
- [79] Sukumaran Prabhu and Eldho K Poulouse. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International nano letters*, 2(1):32, 2012.
- [80] Sarah Boslaugh. *Statistics in a nutshell: A desktop quick reference*. .°Reilly Media, Inc.”, 2012.