

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Física



**PINZAS ÓPTICAS Y ESPECTROSCOPIA DE FLUCTUACIONES: MECÁNICA
DE NEURITAS EN TIEMPO REAL**

FERNANDA ANDREA GÁRATE MARÍN

Profesor Guía: Roberto Alexander Bernal Valenzuela

Trabajo de graduación presentado a la Facultad de Ciencias, en cumplimiento parcial de los requerimientos exigidos para optar al grado de Doctora en Ciencias con mención en Física

Santiago - Chile
2015

@(Fernanda Andrea Gárate Marín)

(2015)

Todos los derechos reservados.
Queda prohibida la reproducción total
o parcial sin autorización previa y por escrito.

**PINZAS ÓPTICAS Y ESPECTROSCOPIA DE FLUCTUACIONES:
MECÁNICA DE NEURITAS EN TIEMPO REAL**

FERNANDA ANDREA GÁRATE MARÍN

Este trabajo de graduación fue elaborado bajo la supervisión del profesor guía Dr. Roberto Alexander Bernal Valenzuela del Departamento de Física y ha sido aprobado por los miembros de la Comisión Calificadora de la candidata, Dr. Francisco Melo, Dr. Yaroslav Ispolatov, Dr. María Pertusa, Dr. Christian Wilson y Dr. Juan Carlos Retamal.

Dr. Francisco Melo

Dr. Yaroslav Ispolatov

Dr. María Pertusa

Dr. Christian Wilson

Dr. Juan Carlos Retamal

Profesor guía Dr. Roberto Bernal

Director

RESUMEN

Numerosos estudios muestran como algunas enfermedades provocan, o son producto de, cambios en las propiedades mecánicas de las células. Estas alteraciones en la estructura y mecánica celular, están directamente relacionadas con enfermedades humanas de gran importancia, tales como la malaria, el cáncer y enfermedades neurodegenerativas, como el parkinson y el alzheimer. Existe una gran variedad de herramientas que han sido utilizadas para determinar las propiedades mecánicas de las células, incluyendo microagujas, flujo laminar, pinzas magnéticas, microscopio de fuerza atómica, entre otras. Sin embargo, las técnicas nombradas, sufren de baja resolución espacial y temporal, perdiendo toda información sobre la dinámica celular intrínseca. Además, son técnicas invasivas que no dan cuenta de los cambios que provocan en la estructura celular.

En este trabajo desarrollamos una técnica para determinar las propiedades mecánicas de neuritas de manera no invasiva, a tiempo real, con alta resolución espacial y temporal del orden de los nm y μs respectivamente. Nuestra técnica se basa en obtener información mecánica mediante el estudio de las fluctuaciones que experimenta una neurita, producto del baño térmico en que se encuentra. Para medir las fluctuaciones utilizamos la técnica de detección interferométrica de fluctuaciones, implementada mediante pinzas ópticas. Este método de detección, basado en la utilización de un láser a baja potencia, permite detectar fluctuaciones con alta resolución espacial y temporal en comparación con otras técnicas basadas en video detección. Para la interpretación de nuestras mediciones, hemos desarrollado un modelo físico que describe nuestro sistema biológico. Este modelo describe la neurita como una cuerda con sus extremos fijos, la cual fluctúa en torno a su posición de equilibrio. Como primera aproximación, nuestro modelo da cuenta del comportamiento pasivo de la neurita, asumiendo el equilibrio térmico, es decir, la energía elástica de la cuerda inmersa en un baño térmico, es del orden $k_B T$.

Nuestra técnica ha sido probada en células PC12, las cuales han sido ampliamente utilizadas como modelo biofísico de neuronas. Debido a la concordancia entre el marco teórico desarrollado y las mediciones experimentales, hemos determinado aspectos claves de la mecánica de neuritas de células PC12: tensión axial de la neurita, bending y tensión de la membrana. Nuestros resultados, obtenidos en unos cuantos segundos, son consistentes con valores reportados previamente, los cuales fueron determinados mediante el uso de técnicas invasivas con tiempos de observación del orden de los minutos.

Finalmente se presenta un capítulo con resultados preliminares y perspectivas de este trabajo. Así por ejemplo, se muestra el comportamiento dinámico de las propiedades mecánicas de neuritas en condiciones normales de observación. Así como la cuantificación de cambios en la mecánica de neuritas de células PC12 debido a la acción de drogas. Por último, con la finalidad de potenciar nuestro trabajo, presentamos resultados preliminares de mediciones hechas en neuronas sensoriales primarias procedentes del ganglio de la raíz dorsal.

ABSTRACT

Several studies have indicated that some diseases give rise to, or arise from, changes in the mechanical properties of cells. These alterations in cell structure and mechanics, are directly related to several important human diseases, such as malaria, cancer and neurodegenerative diseases such as parkinson's and alzheimer's. There are a variety of tools that have been used to determine the mechanical properties of cells, including microneedles, laminar flow, magnetic tweezers, atomic force microscopy, among others. However, all of these techniques suffer from poor spatial and temporal resolution, missing information about dynamical cellular behavior. Moreover, they are invasive techniques that do not account for the changes themselves do to the cell structure.

In the present work we develop a technique to get mechanical properties of neurites in a non-invasive way, in real time, with high spatial and temporal resolution of the order of nm and μs respectively. Our technique is based on to get mechanical information by means of the study of neurite fluctuations on a thermal bath. To measure fluctuations we used a interferometric fluctuation detection technique using optical tweezers. This detection method based on laser detection at very low power, can detect fluctuations with high spatial and temporal resolution compared to video detection techniques. For the interpretation of our results, we have developed a physical model that describes our biological system. This model describes the neurite as a string with fixed ends, which fluctuates around its equilibrium position. As a first approximation, our model accounts for neurite passive behavior, assuming thermal equilibrium, this means that elastic energy of the string immersed in a thermal bath, it is of the order of $k_B T$.

Our technique has been tested on PC12 cells, which have been widely used as biophysical model of neurons. Because of the agreement between the theoretical framework and experimental measurements, we have determined key aspects of the PC12 neurites mechanics: neurite axial tension and bending and tension of the membrane. Our results, obtained in a few seconds, are consistent with previously reported values, which were determined using invasive techniques and long term experiments the order of minutes.

Finally, a chapter with preliminary results and perspectives of this work is presented. For instance, the dynamic behaviour of the mechanical properties of neurites under normal observation is displayed. And the quantification of biochemical disruptions in the neurite mechanics of PC12 cell due to the action of drugs. Last, in order to promote our work, we present preliminary results of measurements made on primary sensory neurons from dorsal root ganglion.

AGRADECIMIENTOS

Detrás de un trabajo como este hay un gran número de personas que contribuyen a su realización, desde el ámbito profesional hasta el apoyo incondicional de los más cercanos, el cual te brinda la energía necesaria para enfrentar un desafío tan grande como este.

Es por eso que quiero agradecer especialmente a Roberto Bernal, que a pesar de enfrentarnos con una gran muralla al comienzo de este trabajo, siempre me decía que le echara pa' delante, confiando siempre en que lograríamos nuestros objetivos. Agradecer también su disposición de escuchar y discutir cualquier pregunta con la que me presentara en su oficina, y si fuese necesario discutir por horas, hasta aclarar toda duda alguna. Por presentarme el fascinante mundo de la biofísica, un mundo que pretendo dedicarme durante toda mi carrera.

Al profesor Bernardo Morales, por recibirme en su laboratorio a lo largo de toda mi tesis de la mejor forma, de manera que nunca me sentí ajena a su grupo.

A María Pertusa por tener la paciencia de enseñarme todas las herramientas necesarias para poder ejecutar mi tesis, por tener la disposición de querer compartir sus conocimientos con una persona de un área completamente distinta.

A Timo Betz, por recibirme en su laboratorio y transmitirme todos sus conocimientos en trampas ópticas, tanto teóricos como experimentales. Por tener la disposición de contestar cualquier pregunta que le enviara vía correo electrónico. Y por la amabilidad con la que me recibió durante mi estadía en París, haciendo este proceso un poco menos difícil.

Todos ustedes han sido una pieza clave para el desarrollo de este trabajo, y para fortalecer la idea de que la unión de conocimientos interdisciplinarios permiten realizar un bello trabajo.

También quiero agradecer a Kari Tralma, Yahaira Arana y Gonzalo Arrieta, por ser una mano de ayuda en la realización de mis experimentos, ya sea en el área técnica de biología o en la ejecución de partes fundamentales para realizar los experimentos.

A Juan Rayas, por la gran ayuda brindada en la parte óptica del instrumento, siempre con la mejor disposición y sin esperar nada a cambio.

Y a todos los profesores que me acompañaron tanto desde pregrado como en el difícil camino del doctorado. Cada uno de ellos ha aportado un granito de arena para mi crecimiento profesional.

A todos mis compañeros y amigos de generación del doctorado, Nicolás Vargas, Alvaro Espejo, Roberto Escobar y Claudia Sanchez, ya que este camino comenzó junto a ellos. Al grupo de No lineal, que a pesar de no pertenecer, siempre me sentí uno de ellos. En particular agradecer Romina Muñoz, que siempre me animó en los momentos difíciles, además de las conversaciones científicas que me ayudaron a seguir adelante en muchos momentos de estancamiento. A Milenka V., por sus consejos y apoyo en los momentos difíciles.

Finalmente, mi familia, en particular mis hermanos y mi cuñada Victoria, por siempre estar a mi lado. A Pancho, por toda la paciencia y por ser la persona más apañadora que se ha cruzado en

mi camino y la que me ha dado uno de los mejores consejos que pude recibir durante mi tesis: “avanza”. De lo contrario aún estaría alineando el instrumento. Mis papás, sin ellos no hubiese sido posible llegar hasta donde estoy, y se los agradezco de corazón. Es por eso que dedico esta tesis a mi mamá, el sueño que ella tuvo que dejar de lado por su familia, lo cumplió su hija. Sea donde sea que estés mamita, este trabajo te lo dedico a tí.

Tabla de contenidos

1. Introducción general	1
1.1. Estructura neuronal	1
1.2. Propiedades mecánicas	3
1.3. Modelos mecánicos	6
1.4. Fluctuaciones y movimiento Browniano	8
1.5. Problema de estudio	10
2. Pinzas ópticas	11
2.1. Principios físicos de las trampas ópticas	13
2.2. Trampa óptica simple	14
2.2.1. Principios físicos de una trampa óptica simple	14
2.2.2. Arreglo óptico de una pinza óptica simple	17
2.3. Detección de fluctuaciones	22
2.3.1. Video detección	22
2.3.2. Detección interferométrica	22
2.3.3. Régimen de baja potencia	23
2.4. Densidad espectral de potencia (<i>PSD</i>)	26
2.4.1. Ecuación de Langevin	26
2.4.2. <i>PSD</i> de una partícula confinada	27
2.5. Técnica híbrida	31
2.5.1. Microscopía de fluorescencia	31
2.5.2. Diseño experimental del instrumento híbrido	32
2.5.3. Limitaciones experimentales	37
2.6. Conclusiones	38
3. Caracterización del instrumento	39
3.1. Introducción	39
3.2. Caracterización de la trampa óptica	41

TABLA DE CONTENIDOS

3.2.1.	Medición de la constante de atrapamiento k_T	41
3.2.2.	Curva de calibración	43
3.2.3.	Cintura lateral del haz, ϖ	45
3.2.4.	Preparación de las muestras y análisis de datos	46
3.3.	Resultados y discusión	48
3.3.1.	Tamaño de la cintura del haz (ϖ)	48
3.3.2.	Curva de calibración experimental	48
3.3.3.	Determinación de la constante de atrapamiento k_T y viscosidad del medio η	49
3.3.4.	Ruido de fondo de la trampa óptica	51
3.3.5.	Simetría de la trampa óptica	52
3.3.6.	Influencia de la potencia del láser en la trampa óptica	53
3.3.7.	Estabilidad temporal de la trampa	58
3.3.8.	Comportamiento de la trampa óptica en función de la cercanía de la superficie (Z').	59
3.3.9.	Dependencia de la constante de atrapamiento en función del tamaño de la partícula.	64
3.4.	Conclusiones	69
4.	Propiedades mecánicas de neuritas	71
4.1.	Introducción	71
4.2.	Células PC12, un modelo biológico simplificado de neuronas	72
4.3.	Modelo físico: La neurita como una cuerda ideal	74
4.3.1.	Fluctuaciones térmicas de una neurita	78
4.4.	Materiales y métodos	79
4.4.1.	Aplicación de las pinzas ópticas en su régimen de baja potencia	79
4.4.2.	Montaje experimental para medir la amplitud de las fluctuaciones	80
4.4.3.	Medición de la amplitud de fluctuaciones de una neurita	82
4.4.4.	Curva de calibración para la neurita	82
4.4.5.	Cultivo celular y preparación de muestras	83
4.4.6.	Colección y análisis de datos	83
4.5.	Resultados	85
4.5.1.	Curva de calibración	85
4.5.2.	Espectro de fluctuaciones de neuritas	86
4.5.3.	Influencia de la potencia del láser	89
4.6.	Discusión	91
4.6.1.	Bajas frecuencias, tensión axial σ	91
4.6.2.	Segundo régimen, rigidez de flexión B	91

TABLA DE CONTENIDOS

4.6.3. Régimen dominado por la tensión de membrana σ_{\perp}	92
4.6.4. Altas frecuencias, bending de membrana β_{\perp}	93
4.6.5. Comparación propiedades mecánicas entre neuritas	94
4.6.6. Valores medios y dispersión estadística	96
4.7. Conclusiones	98
5. Perspectivas y resultados preliminares	101
5.1. Introducción	101
5.2. Materiales y método	103
5.3. Resultados preliminares	105
5.3.1. Evolución temporal de la mecánica de neuritas	105
5.3.2. Efecto del Latrunculin-A y del Paraformaldehído	107
5.3.3. F-actina vs. tensión axial	110
5.3.4. Espectro de fluctuaciones para una neurona DRG.	111
5.4. Discusión resultados preliminares	113
5.4.1. Dinámica de la mecánica de una neurita	113
5.4.2. Efectos del LAT-A y PFA	113
5.4.3. Rol de F-actina	115
5.4.4. Un caso más real: neuronas DRG	116
5.5. Conclusiones	117
6. Conclusiones Generales	120
A. Protocolos	128
A.1. Cultivo celular de células PC12	128
A.1.1. Preparación del medio, colágeno, factor de crecimiento neuronal (NGF)	128
A.1.2. Cultivo regular	130
A.1.3. Preparación de muestras	131
A.2. Transfección de células PC12	133
A.2.1. Transformación de bacterias competentes	133
A.2.2. Purificación de DNA plasmidial con kit Minipress E.N.Z.A (Omega).	134
A.2.3. Preparación placa de cultivo de 24 pocillos	135
A.2.4. Transfección con el plásmido meGFP-Lifeact-7	136
A.2.5. Preparación de muestras de células PC12 transfectadas	136
A.3. Línea celular estable	137
A.4. Fijación células con Paraformaldehído	138
A.5. Preparación Latrunculin-A	138
A.6. Procedimiento para congelar células PC12	138

TABLA DE CONTENIDOS

A.7. Cultivo celular de neuronas DRG.	139
A.7.1. Soluciones y medio de cultivo	139
B. Selección del plásmido	142
B.0.2. Eficiencia de transfección	142
B.0.3. Decaimiento de fluorescencia en el tiempo	144
B.0.4. Conclusión	145
C. Desarrollo matemático del modelo	147
D. Cálculo del aumento de temperatura debido a la presencia del láser infrarrojo	153

Índice de tablas

4.1. Resumen parámetros experimentales de la neurita de la figura 4.6C	88
4.2. Resumen comparativo de las propiedades mecánicas para neuritas distintas	95
5.1. Resumen de ley de potencia y valor de la amplitud 10^m para una neurita bajo condiciones normales	108
5.2. Resumen de ley de potencia y valor de la amplitud 10^m para una neurita tras interacción con LAT-A	108
5.3. Resumen parámetros experimentales para neurita de una célula DRG	112
5.4. Resumen comparativo de las propiedades mecánicas de la neurita antes y después de interactuar con LAT-A	114
5.5. Resumen comparativo de las propiedades mecánicas de una neurita bajo el efecto de dos drogas distintas	115
5.6. Propiedades mecánicas de una neurona DRG.	116
5.7. Comparación entre prolongaciones de células PC12 y neuritas DRG	116

Índice de ilustraciones

1.1. Estructura de una neurona	2
1.2. Elementos principales que conforman el citoesqueleto neuronal	2
1.3. Modelos mecánicos	6
2.1. Diagrama de rayos régimen de Mie	16
2.2. Esquema pinza óptica Simple	18
2.3. Esquema de la apertura numérica de un objetivo de microscopio	19
2.4. Esquema de la apertura numérica y el índice de refracción del medio de inmersión .	20
2.5. Representación de una trampa óptica	27
2.6. Microscopía de fluorescencia	32
2.7. Diseño experimental del instrumento híbrido	35
2.8. Esquema del detector, porta muestra y cámara	36
3.1. Imagen de referencia	44
3.2. Calibración para pinzas ópticas	45
3.3. Imagen de la trampa óptica	47
3.4. Curva de calibración e imagen partícula de sílica	49
3.5. Señal entregada por el detector, curva de la <i>PSD</i> y distribución de las fluctuaciones de una partícula	50
3.6. Comparación de la <i>PSD</i> : ruido de fondo	52
3.7. Simetría de la trampa óptica	53
3.8. Dependencia de los parámetros f_c y D con la potencia del láser	54
3.9. Curva para k_T en función de la potencia del láser	55
3.10. Curva viscosidad del medio	56
3.11. Dependencia de la amplitud de las fluctuaciones con la potencia del láser	57
3.12. Fuerza que ejerce la trampa en función de la potencia del láser	58
3.13. Estabilidad temporal de la trampa óptica	59
3.14. Curva f_c y D con la distancia entre el centro de la partícula y la superficie	61

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

3.15. Curva para k_T en función de la distancia entre la partícula y la superficie	62
3.16. Curva para F_{T_x} y $\sqrt{\langle(\Delta x)^2\rangle}$ para distintos Z'	63
3.17. Curva de calibración e imagen de una partícula de sílica $2\mu\text{m}$ de diámetro	64
3.18. Influencia del tamaño de la partícula en el comportamiento de la trampa	65
3.19. Curva para k_T de una partícula de $2\mu\text{m}$ de diámetro	66
3.20. Distribución de las fluctuaciones para partículas de distinto tamaño	67
3.21. Fuerza que ejerce la trampa en función de la potencia del láser	68
4.1. Imagen campo claro células DRG y PC12	73
4.2. Vista esquemática de la cuerda como modelo de una neurita	74
4.3. Esquema del arreglo experimental aplicado a neuritas	80
4.4. Esquema experimental para la neurita	81
4.5. Curva de calibración de una neurita	85
4.6. Densidad espectral de potencia (PSD) para una neurita	87
4.7. PSD de una neurita, una partícula y del ruido de fondo.	89
4.8. Influencia de la potencia del láser en la neurita	90
4.9. Comparación de la densidad espectral de potencia (PSD) para neuritas distintas	95
4.10. Histogramas de los parámetros experimentales	96
4.11. Contribución de las propiedades mecánicas	100
5.1. Evolución temporal para los parámetros mecánicos de una neurita	106
5.2. PSD de una neurita bajo la influencia latruncullin-A	108
5.3. Comparación de los histogramas de fluctuaciones para LAT-A y PFA	109
5.4. PSD comparativa entre LAT-A y PFA	109
5.5. Rol de la F-actina en la tensión axial de neuritas	110
5.6. PSD para una neurona DRG	111
5.7. Gráfico de barra que resume las propiedades mecánicas de una neurita tras interactuar con distintas drogas.	115
A.1. Placa de muestra	132
B.1. Imágenes de campo claro y fluorescencia para células PC12	143
B.2. Gráfico de barras que presenta el porcentaje de células fluorescente en función del tipo y concentración del plásmido	144
B.3. Decaimiento de la fluorescencia en el tiempo	145

Capítulo 1

Introducción general

En este capítulo revisaremos conceptos generales de los temas a tratar en este trabajo de tesis. Así por ejemplo, se introducirán conceptos de biología celular, origen de las propiedades mecánicas de los sistemas biológicos y el uso de las fluctuaciones como una herramienta para obtener información del sistema bajo estudio.

1.1. Estructura neuronal

La neurona es la unidad funcional del sistema nervioso. Son células eucariotas especializadas en recibir y transmitir información mediante señales eléctricas o químicas (neurotransmisores). Como cualquier otra célula eucariota, los elementos principales que conforman las neuronas son; el núcleo, el citoplasma, el citoesqueleto y la membrana plasmática.

El núcleo es el organelo que contiene la información genética (ADN), y se encuentra definido por una membrana. La región comprendida entre la membrana plasmática y el núcleo, es el citoplasma, el cual comprende el citosol (elemento líquido) y los organelos celulares [1]. La estabilidad estructural de la célula está dada por el citoesqueleto. Este último, es una estructura dinámica, la cual se reorganiza continuamente según la actividad celular, como por ejemplo; movilidad, adaptación de forma, ciclo de división celular, entre otros. El citoesqueleto de una neurona está conformado por tres tipos de filamentos; los microtúbulos (MT), los microfilamentos de actina

(AF) y los neurofilamentos filamentos (NF), los cuales se distinguen por su diámetro y por las sub unidades constituyentes [1] (ver figura 1.2).

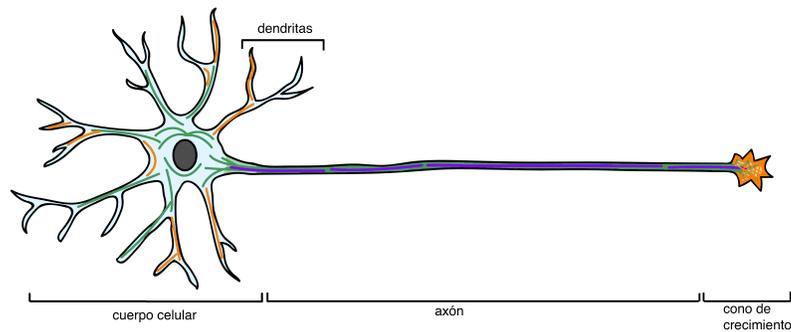


Figura 1.1: Estructura de una neurona

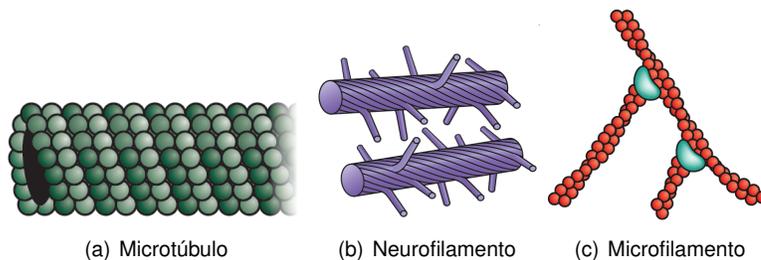


Figura 1.2: Elementos principales que conforman el citoesqueleto neuronal. Figura modificada de Cell mechanics and the cytoskeleton, Daniel A. Fletcher y colaboradores, Nature 2010.

Los filamentos de actina resultan de la polimerización de monómeros globulares llamados G-actina, en un polímero llamado microfilamento de actina (F-actina), para finalmente formar una hélice. Estudios recientes de imágenes de super resolución (STORM) muestran una arquitectura muy definida para los filamentos de actina, los cuales se encuentran dispuestos en forma de anillos y en forma periódica a lo largo del axón [2, 3], por debajo de la membrana, formando la corteza celular [1]. Mientras que, los microtúbulos y los filamentos intermedios dominan la parte central y se encuentran alineados a lo largo del axón. Un microtúbulo es un polímero de subunidades de tubulina globulares (heterodímero de α y β tubulina), que están dispuestos en forma cilíndrica. Como consecuencia de su geometría tubular, estas estructuras son mucho más rígidas que los filamentos de actina. Por otra parte, los neurofilamentos, son un tipo de filamentos intermedios y son los filamentos más abundantes del sistema nervioso [4], están formados por filamentos α -helicoidal que se ensamblan formando una especie de cuerda [1]. Finalmente, la membrana plasmática consiste en una bicapa lipídica compuesta por lípidos y proteínas asociadas, cuya función principal es la de separar la célula del medio externo que la rodea. Debido a la permeabilidad selectiva de la membrana, propiedades que otorgan los canales iónicos, existe una diferencia de cargas en el interior y exterior de la célula. Esta diferencia de carga o diferen-

cia de potencial se conoce como potencial de membrana o potencial de acción. En neuronas, el potencial de membrana permite la transmisión de señales entre las diferentes partes de la célula.

Aunque la morfología de diversos tipos de neuronas difieren en algunos aspectos, se pueden identificar tres regiones de las neuronas con funciones bien definidas: el cuerpo celular, el cono de crecimiento y las neuritas (ya sea una dendrita o axón [1]) (ver figura 1.1). El cuerpo celular contiene el núcleo y es el sitio de síntesis de prácticamente todas las proteínas y membranas neuronales. Estas últimas son ensambladas en vesículas y posteriormente transportadas por el axón a los terminales de la neurita, a través de los microtúbulos, mediante proteínas motoras. Las proteínas motoras, un tipo de motor molecular, son enzimas especializadas en generar las fuerzas necesarias para los movimientos celulares, por ejemplo el transporte de cargas. Estas enzimas convierten energía química en movimiento, mediante la hidrólisis de ATP [1]. El proceso en el cual las proteínas motoras transportan cargas desde el cuerpo celular a los terminales del axón se llama transporte anterógrado. También existe el proceso inverso, donde membranas u organelos dañados, se mueven hacia el cuerpo celular, este mecanismo se denomina transporte retrogrado [1].

La mayoría de las neuronas tienen múltiples dendritas, las que se extienden como prolongaciones desde el cuerpo celular y se especializan en recibir señales químicas desde los terminales de axones de otras neuronas. Las dendritas convierten estas señales químicas en señales eléctricas, que luego son transmitidas al cuerpo celular, para finalmente llegar al axón en forma de potencial de acción [1].

Gran parte de las neuronas poseen un axón, cuya característica geométrica más distintiva es la razón de aspecto, un largo promedio de casi diez veces su radio típico ($1\mu\text{m}$). Los axones se encuentran especializados para la conducción del potencial de acción, desde el cuerpo celular a los terminales del axón [1].

1.2. Propiedades mecánicas

Aunque hemos considerado los microtúbulos, filamentos de actina y neurofilamentos individualmente, estos componentes no actúan completamente independientes unos de otros, de hecho se encuentran organizados en forma de redes, cuyos filamentos se encuentran cruzados unos con otros u ordenados paralelamente en forma de paquete. En ambas configuraciones los

filamentos se encuentran unidos entre sí mediante proteínas de entrecruzamiento. Esta red intrínca de proteínas y filamentos es lo que conocemos como citoesqueleto. A su vez, el citoesqueleto se encuentra adherido a la membrana a través de entrelazamientos más complejos, realizados por proteínas de acoplamiento[1]. Es entonces que, de la interacción de todos estos elementos, surgen propiedades elásticas, procesos de disipación y procesos activos que dependen de los procesos biológicos de la células.

La interacción de todos estos elementos modula las propiedades mecánicas de las neuronas, y afecta su respuesta frente a estímulos externos, composición y más importante aún, puede modificar su función celular [4]. Es por esta razón que el estudio de la arquitectura celular, su dinámica y las propiedades mecánicas de las células son de gran interés. Por ejemplo, las neuritas, en su estado natural, se encuentran bajo tensión mecánica[5]. Esta tensión es controlada y mantenida por la presencia de los filamentos de actina, por la actividad de las proteínas motoras y por la constante tracción ejercida por el cono de crecimiento [2, 3, 5, 6]. A su vez, esta tensión modifica la polimerización de los microtúbulos y los microfilamentos [7], por lo que indirectamente, modula la dinámica del transporte axonal lento y rápido, con valores promedios típicos para las velocidades igual $0,002 - 0,09 \mu\text{m/s}$ y $4 \mu\text{m/s}$, respectivamente [8–10]. Estos cambios en la velocidad de transporte axonal y en la concentración de vesículas sinápticas, pueden modular el proceso de sinapsis [7], función principal de las neuronas. Por otra parte, los microtúbulos, además de estar relacionados con el transporte axonal [7] y tienen una gran contribución en la rigidez mecánica del axón [11]. En cambio, los filamentos intermedios tienen un mayor rol en el diámetro de la neurita [12]. Por otro lado, la constante polimerización y depolimerización de los microfilamentos y los microtúbulos generan fuerzas que dirigen los cambios en la forma de las células [13]. Sin embargo, muchos de los comportamientos mecánicos de los axones no están completamente entendidos. Esto debido a la falta de herramientas directas y no invasivas para determinar los parámetros tales como; la tensión axial, la rigidez de flexión, la tensión de membrana, el bending de membrana, y a la vez relacionarlos con el transporte axonal y los distintos componentes que conforman el citoesqueleto.

De interés particular son las mediciones locales y la evolución temporal de estos parámetros, ya que son claves para la regulación del transporte intracelular de proteínas y mitocondrias, desde el cuerpo celular a la periferia [8]. De hecho, gradientes de velocidades están presentes a lo largo del axón, velocidad de transporte que aumenta desde las regiones proximales (cuerpo celular) a las regiones distales (cono de crecimiento). Estas velocidades de transporte se miden directamente por microscopía de imágenes, pero para una correlación local cuantitativa entre las propiedades mecánicas y el transporte celular, se requiere de técnicas no invasivas.

Hasta ahora se han utilizado una amplia gama de técnicas experimentales para medir la elasticidad de las neuritas ($k_e = 0,05 - 0,6 \text{ nN/m}$), la viscosidad interna ($\gamma = 0,5 - 10 \text{ nN}\cdot\text{s/m}$) y las fuerzas generadas por axones (σ tensión activa $0,1 - 1,5 \text{ nN}$ y la tasa de contracción activa $v = 0,01 - 1 \mu\text{m/s}$) como por ejemplo técnicas de microajugas y flujo laminar [14],[15],[16, 17]. Además, ha sido reportada la viscosidad dinámica en el centro de neuritas de células PC12 ($\beta \approx 1,1 \text{ Pa}\cdot\text{s}$), mediante el seguimiento de partículas a lo largo del axón [18]. Técnicas de indentación, mediante microscopía de fuerza atómica (AFM), han sido utilizadas para estudiar la contribución de las componentes del citoesqueleto al módulo de Young del cuerpo celular y de axones de neuronas ($E \sim 1\text{kPa}$ y $E \sim 10\text{kPa}$, respectivamente) [11, 19]. Por otro lado, la dependencia en la cinética de la fuerza en el crecimiento de las prolongaciones de las neuronas, ha sido estudiada mediante la utilización de pinzas magnéticas [20].

Las técnicas que hemos nombrado son capaces de medir los valores de los parámetros macroscópicos o efectivos luego de varios minutos de observación, por lo que en el proceso de medición, pierden toda información mecánica local y la evolución de estos parámetros. Además de ser técnicas complejas de aplicar, son técnicas que perturban mecánicamente el sistema biológico para poder realizar la medición.

Por lo que se requiere de otro enfoque para obtener información de sistemas biológicos de manera no invasiva con excelente resolución espacial y temporal.

1.3. Modelos mecánicos

Como hemos dicho, desde un punto de vista puramente mecánico, las neuritas poseen características similares a una cuerda, es decir, pueden soportar un esfuerzo mecánico respondiendo con una deformación elástica. Por lo tanto un axón puede ser modelado como una combinación de elementos mecánicos que incluye un resorte lineal, de constante elástica principal (κ_e), en serie con un elemento de Voigt, el cual modela el comportamiento viscoelástico del axón. Este último está compuesto por una constante elástica secundaria (k) en paralelo con un amortiguador (γ), el cual da cuenta de los procesos disipativos del axón [15]. Esta combinación de elementos mecánicos es una variante del modelo estándar de sólidos viscoelásticos, utilizado por primera vez en la descripción mecánica de neuritas por Lamoureux en 1989 [15] como se muestra en la figura 1.3A. Este modelo describe el comportamiento viscoelástico del axón, sin embargo, las neuritas también presentan procesos de contracción, provocados por la acción de los motores moleculares, los cuales ejercen una fuerza contraria a la tensión intrínseca del axón. Este comportamiento activo queda descrito al agregar un tercer elemento al modelo, M el cual da cuenta de la acción de los motores moleculares en el axón [16] (figura 1.3B).

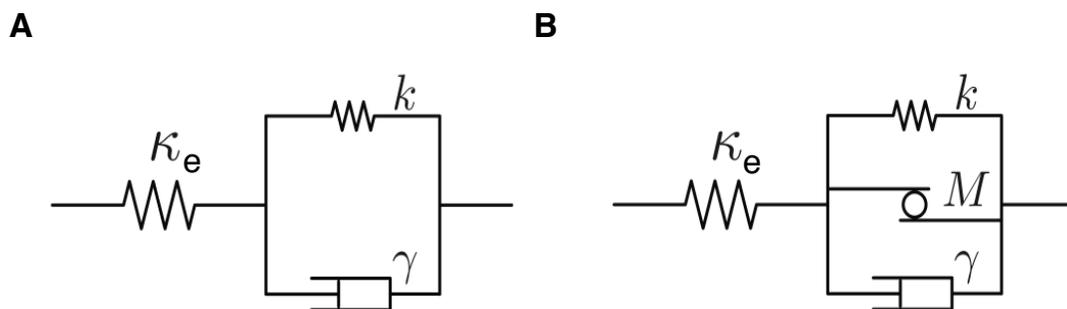


Figura 1.3: Modelos mecánicos que describen el comportamiento viscoelástico de un axón. A) Modelo clásico desarrollado por primera vez por Denner. B) Modelo que incluye los motores moleculares desarrollado por Bernal y Melo [16]. Los elementos κ_e , k , γ y M dan cuenta del comportamiento netamente elástico, viscoelástico (procesos elásticos y disipativos) y los motores moleculares, respectivamente.

Debido a las limitaciones experimentales, los parámetros mecánicos son considerados como constantes. Además no dan cuenta del efecto de las fuerzas externas en los parámetros mecánicos o en el transporte axonal, es decir, los valores medidos no dependen de la magnitud de la fuerza aplicada. Por ejemplo, la dinámica de reordenamiento del citoesqueleto de un axón está relacionada con las propiedades mecánicas y la actividad de las proteínas motoras, las que a su vez están reguladas por la tensión mecánica. Como consecuencia la velocidad de transporte

y la actividad de los motores moleculares se ven afectados por la fuerza aplicada [21]. Entonces cualquier avance en esta dirección, que permita medir las propiedades mecánicas localmente y su evolución temporal, sin fuerza aplicada, impulsará la comprensión de la mecánica de células y el desarrollo de modelos biofísicos que permitirán describir escenarios más complejos, como el desarrollo y reparación neuronal [22].

1.4. Fluctuaciones y movimiento Browniano

Consideremos a una partícula (ya sea una esfera dieléctrica, célula, proteína o molécula) inmersa en un fluido. La partícula se encontrará sometida a fuerzas térmicas, que tienen su origen del cambio de momento en la partícula provocado por los choques contra las moléculas que conforman el fluido que la rodea. Su nombre se debe al hecho de que la amplitud de la fuerza es proporcional a la temperatura del fluido. El movimiento resultante producto de las colisiones es denominado movimiento térmico o fluctuaciones térmicas. “Debido a que las fuerzas son dirigidas aleatoriamente, el movimiento está caracterizado por frecuentes cambios en su dirección, esto es la difusión. Para una partícula libre la difusión es lo que llamamos movimiento Browniano” [23].

Las primeras observaciones del movimiento estocástico de partículas en un fluido, fueron hechas por el poeta Lucrecio en su poema “De Rerum natura”(Sobre la naturaleza de las cosas, siglo I a.C.). En el cual describe el movimiento, aparentemente aleatorio, de las partículas de polvo en el aire. Posteriormente, en 1827 este proceso es llamado movimiento Browniano en honor al botánico James Brown, quien se encontraba mirando a través del microscopio partículas de polen suspendidas en agua, cuando notó que estas partículas se movían. Sin embargo, Brown no pudo explicar el mecanismo que causaba esto. En 1905 Albert Einstein, publica un artículo en el cual explica detalladamente como las partículas de polen eran movidas por las moléculas de agua que la rodeaban [23]. De esta manera, Einstein es capaz de relacionar las fluctuaciones del sistema, que ocurren a escala microscópica, con la disipación microscópica que ejerce el fluido sobre la partícula de polen.

De igual manera, a partir de las fluctuaciones que experimenta una neurita, nos será posible extraer información sobre sus propiedades mecánicas, mediante la interpretación de la densidad espectral de potencia (*PSD*) determinada a partir de la medición de estas fluctuaciones.

Existen diversas maneras de registrar las fluctuaciones experimentadas por un sistema biológico producto del baño térmico. Por ejemplo, el acceso a la elasticidad local de la membrana de glóbulos rojos se ha realizado mediante el seguimiento de nano-partículas fluorescentes, las cuales han sido adheridas a la membrana para posteriormente registrar sus movimientos térmicos[24]. Otros trabajos, directamente detectan el borde de la célula mediante el análisis de imágenes de contraste de fase [25, 26]. Sin embargo, todas estas técnicas se basan en la video detección, por lo que sufren de una baja resolución temporal, la que no supera algunas decenas de Hertz. No obstante, una comprensión más profunda del comportamiento celular a nivel mo-

lecular, requiere la combinación de resolución espacial y temporal del orden de los nanómetros y microsegundos respectivamente, debido a que los eventos moleculares suelen tener lugar en estas escalas [27].

Entre las nuevas técnicas se destaca la evolución de las pinzas ópticas en el estudio de sistemas biológicos. Con ellas, ha sido posible el desarrollo de métodos ópticos para estudiar la membrana de glóbulos rojos, con una resolución espacial sub-micrométrica y una tasa de adquisición de datos del orden de los 200kHz . La técnica es una extensión de la detección de partículas interferométrica en pinzas ópticas, sin embargo, la potencia del láser se reduce a potencias minúsculas con la finalidad de no ejercer fuerzas sobre el objeto de estudio. Este método se basa en la diferencia de índice de refracción que existe entre el objeto y el medio, provocando una deflexión en el haz, el cual se encuentra al borde de la célula. Posteriormente las deflexiones del haz son registradas por un detector fotodiodo [28]. La interpretación de estas mediciones y posterior cuantificación de las propiedades mecánicas, requiere de un modelo físico que describa mecánicamente el sistema en estudio.

1.5. Problema de estudio

Con el propósito de determinar, de manera no invasiva, las propiedades mecánicas de neuritas y su dinámica en el tiempo, hemos medido las fluctuaciones laterales que experimenta una neurita en su medio, utilizando la técnica de detección interferométrica. Para implementar esta técnica, construimos y caracterizamos un instrumento basado en la física de las trampas ópticas. La teoría, el arreglo experimental y la caracterización de este instrumento, se explica en detalle en los capítulos 2 y 3. Este último, es de gran importancia para el análisis de las mediciones en neuritas, ya que una adecuada caracterización le da significado físico a los parámetros determinados experimentalmente. Para la interpretación de las mediciones y posterior caracterización de las propiedades mecánicas, desarrollamos un modelo el cual simplifica la neurita como una cuerda fluctuando en torno a su posición de equilibrio con sus extremos fijos. Análogamente para la neurita, los extremos corresponden a sus puntos de adhesión con el sustrato, el cuerpo celular y el cono de crecimiento. Una explicación detallada del modelo se encuentra en el capítulo 4. Nuestro modelo fue probado en neuritas de células PC12, un conocido modelo de axones en el área de la neurociencia, con el propósito de simplificar el sistema biológico en estudio. En el capítulo 4 se demuestra que, mediante nuestra técnica, es posible determinar, de manera no invasiva, tres aspectos claves en la mecánica de axones; la tensión axial, el bending y la tensión de membrana, con una resolución espacial de aproximadamente $0,2nm$ y una resolución temporal del orden de los μs .

Capítulo 2

Pinzas ópticas

La posibilidad de capturar ópticamente partículas, fue demostrado por primera vez por Ashkin en su trabajo publicado en 1970. En este experimento se observó que era posible la aceleración de partículas de latex suspendidas libremente en agua mediante la fuerza de presión radiación de un láser. En el experimento, las partículas que se encontraban cerca del haz de perfil gaussiano, eran atraídas al interior del haz y acelerada en dirección de la propagación del haz [29]. Se demostró además, que era posible confinar establemente una esfera de latex, utilizando dos láseres enfrentados (trampa óptica doble). No fue hasta 1986 que se realiza la primera trampa óptica estable mediante el uso de un sólo láser y un objetivo de microscopio [30] (trampa óptica simple). Una partícula que se haya cerca de un haz altamente enfocado es atraído hacia el centro de la trampa ubicada en el plano focal del objetivo.

Las pinzas ópticas han demostrado ser una herramienta muy versátil para muchas aplicaciones en diversas disciplinas que van desde la física hasta ciencias de la vida, incluyendo campos interdisciplinarios como la biofísica [28]. La técnica ha sido utilizada para manipular e investigar material biológico en ambos niveles; celulares y moleculares. Han sido aplicadas para atrapar y manipular desde células hasta partículas muy pequeñas, como organelos, virus y bacterias [31]. Así como también, se han utilizado para medir fuerzas, estudiar estructura y dinámica de micro y macro biomoléculas [32]. Tienen también la gran ventaja que pueden ser utilizadas para manipular y medir simultáneamente [27]. Actualmente, las pinzas ópticas modernas tienen una muy alta resolución y un gran rango dinámico para mediciones de fuerzas ($0,02 - 250pN$), espacialmente ($0,2nm$ a $50\mu m$), y temporalmente ($0,1ms$ hasta $3000s$), lo que las hace ser herramientas idea-

les para caracterizar la termodinámica, la cinética y mecánica de biomacromoléculas [32]. Son muy útiles en el campo de molécula individual, de hecho han sido ampliamente utilizadas para el estudio de proteínas motoras [32, 33].

En la secciones siguientes se introducen los principios y el funcionamiento de las pinzas ópticas y su relación con la densidad espectral de potencia para extraer información mecánica del sistema y su entorno. Luego se muestra y describe el arreglo experimental típico para una pinza óptica simple y un pequeño resumen de las formas para detectar posición. Finalmente se introduce la técnica híbrida, su diseño experimental y las variables que se miden para la caracterización del instrumento.

2.1. Principios físicos de las trampas ópticas

El fenómeno físico principal en el que se basan las trampas ópticas se conoce como presión de radiación, fuerza que surge de la interacción luz y materia y el momento lineal transferido de los fotones a la partícula dieléctrica que será confinada por la pinza. Al colisionar dos partículas, el cambio de momento de una partícula debe ser igual en módulo y opuesto en sentido, al cambio de momento de la otra partícula. Por la segunda ley de Newton ($\vec{F} = d\vec{p}/dt$) este cambio de momento lineal genera una fuerza. Por lo tanto cuando un fotón (considerando la luz como un haz de partículas) colisiona con una partícula, su momento lineal cambia, es decir, la partícula realizó una fuerza sobre el fotón, y por la tercera ley de Newton (ley de acción-reacción) el fotón genera una fuerza, de igual magnitud y en sentido contrario, sobre la partícula.

Para luz ordinaria, la fuerza ejercida por la presión de radiación es muy pequeña. Por ejemplo, Para una intensidad de luz, $I = 1000 \text{Wm}^{-2}$ que llega a un objeto de coeficiente de reflexión R , la presión de radiación de la luz, P , está dada por $P = (1 + R)I/c$, donde c es la velocidad de la luz. Analizando el caso ideal, $R = 1$, la fuerza de radiación, F_{rad} máxima que puede ser ejercida sobre una superficie, $S = 1\mu\text{m}^2$ es:

$$F_{rad} = P \cdot S = \frac{2IS}{c} \sim 10^{-17} \text{N} \quad (2.1)$$

Por otra parte, la fuerza necesaria para arrastrar una partícula del mismo tamaño ($r = 1\mu\text{m}$, donde r es el radio de la partícula) en un fluido como el agua ($F_{drag} = 6\pi\eta r$ donde η : viscosidad del medio) a una velocidad de $1\mu\text{ms}^{-1}$ es del orden de los *femtonewton*, 1000 veces más que la fuerza ejercida por la radiación de presión de la luz. Ahora bien, generalmente en los arreglos experimentales ópticos, la fuente de luz proviene de un láser o un diodo láser de alta potencia (300mW), que es concentrado en una superficie de 1mm^2 , generando una fuerza del orden de los *piconewton*. En cambio, si este mismo haz es altamente enfocado al atravesar un objetivo de microscopio de gran apertura numérica ($N.A. \geq 1$), toda la energía se concentrará en un área típica del orden de $1\mu\text{m}^2$ aumentando la fuerza en 3 órdenes de magnitud. Por lo tanto una pinza óptica puede ejercer una fuerza suficiente como para confinar a una micropartícula.

2.2. Trampa óptica simple

Existe una amplia variedad de trampas ópticas para partículas dieléctricas que se basan en el principio de la fuerza de presión-radiación [30]. Sin embargo, las trampas conformadas por un sólo láser son una de las trampas más simples de implementar. La primera trampa conformada por un sólo láser, es la llamada trampa de levitación óptica, donde la estabilidad axial depende del balance entre la fuerza de dispersión de radiación y la fuerza de gravedad. Por lo tanto, para este tipo de trampa, sólo un tipo de configuración es posible. Por ejemplo, si uno invierte la trampa, la partícula sería dirigida fuera del centro de la trampa debido a la fuerza de radiación. Dado que el atrapamiento dependía siempre de una fuerza adicional, o la necesidad de usar múltiples láseres, la trampa óptica única fue desarrollada. Esta última sólo necesita de un haz de perfil gaussiano altamente enfocado para ser una trampa estable.

2.2.1. Principios físicos de una trampa óptica simple

Una explicación detallada sobre el comportamiento del atrapamiento óptico va a depender del radio r de la partícula atrapada, relativo a la longitud de onda λ de la luz utilizada para confinarla. En casos en donde las dimensiones de la partícula son mayores que la longitud de onda, un simple tratamiento de rayos es suficiente. Por otro lado, si la longitud de onda de la luz excede a las dimensiones de la partícula, estas son descritas como dipolos eléctricos inducidos inmersos en un campo eléctrico. El régimen $r \approx \lambda$ no es parte de ninguna de las categorías anteriores, para describir su comportamiento es necesario una descripción electromagnética más completa [34].

Régimen de Mie, $r \gg \lambda$

Bajo este régimen, la interacción partícula-láser puede ser explicada mediante un simple tratamiento de rayos (figura 2.1). Por tanto, consideremos un par de rayos que llegan a la superficie de una esfera dieléctrica, cuyo índice de refracción n_a es mayor que el índice de refracción del medio n_b . Tomando en cuenta el rayo "brillante", de momento inicial P_i , incide la superficie (externa o interna), parte del haz se refleja y otra parte se refracta. El rayo refractado tiene un momento final P_f , el cambio de momento es δP , en la dirección y sentido que muestra la flecha de color gris de la figura 2.1A. Según la segunda ley de Newton ($F = \delta P/dt$) el cambio de momento implica que la esfera genera una fuerza que desvía al haz en la dirección del cambio de momento. Por la tercera ley de Newton, ley de acción-reacción, el haz genera una fuerza opuesta sobre la esfera

(dirección y sentido que muestra la flecha gruesa de color rojo). Por otra parte, el rayo "tenue", también genera una fuerza neta sobre la esfera, indicada por la flecha delgada de color rojo. Como este rayo proviene de los bordes del haz, la magnitud de la fuerza es menor en comparación a la fuerza que ejerce el haz brillante, por lo tanto la fuerza resultante acerca la partícula al eje del haz y luego la mueve en la dirección de propagación del mismo. Esta fuerza es la que se conoce con el nombre de fuerza de presión radiación y puede descomponerse en dos partes; la fuerza gradiente, que es la que acerca la esfera al eje del haz (componente lateral) y la otra componente es la fuerza de dispersión, la cual dirige la esfera en el sentido de propagación del haz (componente axial).

Analicemos ahora el diagrama de rayos cuando se coloca una lente en el camino óptico del par de rayos. Supongamos ahora que la esfera se encuentra en el eje del haz, bajo el foco de la lente. Los rayos que provienen del foco de la lente generan una fuerza de refracción en dirección y sentido como lo muestran las flechas rojas de la figura 2.1B. La fuerza neta dirige a la esfera hacia el foco de la lente, zona de trampa. Esta fuerza recibe varios nombres tales como, fuerza restauradora o fuerza de radiación inversa, pues siempre dirige a la partícula a la zona de trampa. Los rayos que se reflejan también generan una fuerza (no se muestra en el esquema), y apunta en dirección $+z$, en otras palabras, alejaría a la esfera de la zona de trampa, sin embargo, la mayoría de los rayos son refractados, por lo tanto la contribución a la fuerza neta de los rayos reflejados se desprecia. Finalmente para confinar la partícula debe existir un balance entre la fuerza de dispersión y la fuerza restauradora, esta es la condición de estabilidad de la trampa óptica.

Régimen de Rayleigh, $r \ll \lambda$

Bajo esta aproximación la partícula puede ser tratada como un dipolo inducido. En efecto, una esfera dieléctrica inmersa en un campo eléctrico reordena sus cargas de tal manera que se induce una polarización. La energía de un dipolo eléctrico $U = -\vec{p} \cdot \vec{E}$, es mínima cuando el campo eléctrico es máximo. Por lo tanto, como todos los sistemas físicos buscan estar en su estado de mínima energía, una partícula dieléctrica cerca de un haz altamente enfocado, tenderá a irse al centro de la trampa, zona de máxima intensidad del campo eléctrico.

Veremos que en este régimen, la fuerza sobre la partícula también se puede descomponer en una fuerza lateral y una fuerza axial. Para una partícula de Rayleigh en un medio de índice de refracción n_b la fuerza de dispersión en la dirección del haz incidente es $F_{scat} = n_b P_{scat}/c$, donde P_{scat} es la energía dispersada[30]. En términos de la intensidad I_0 y del índice de refracción

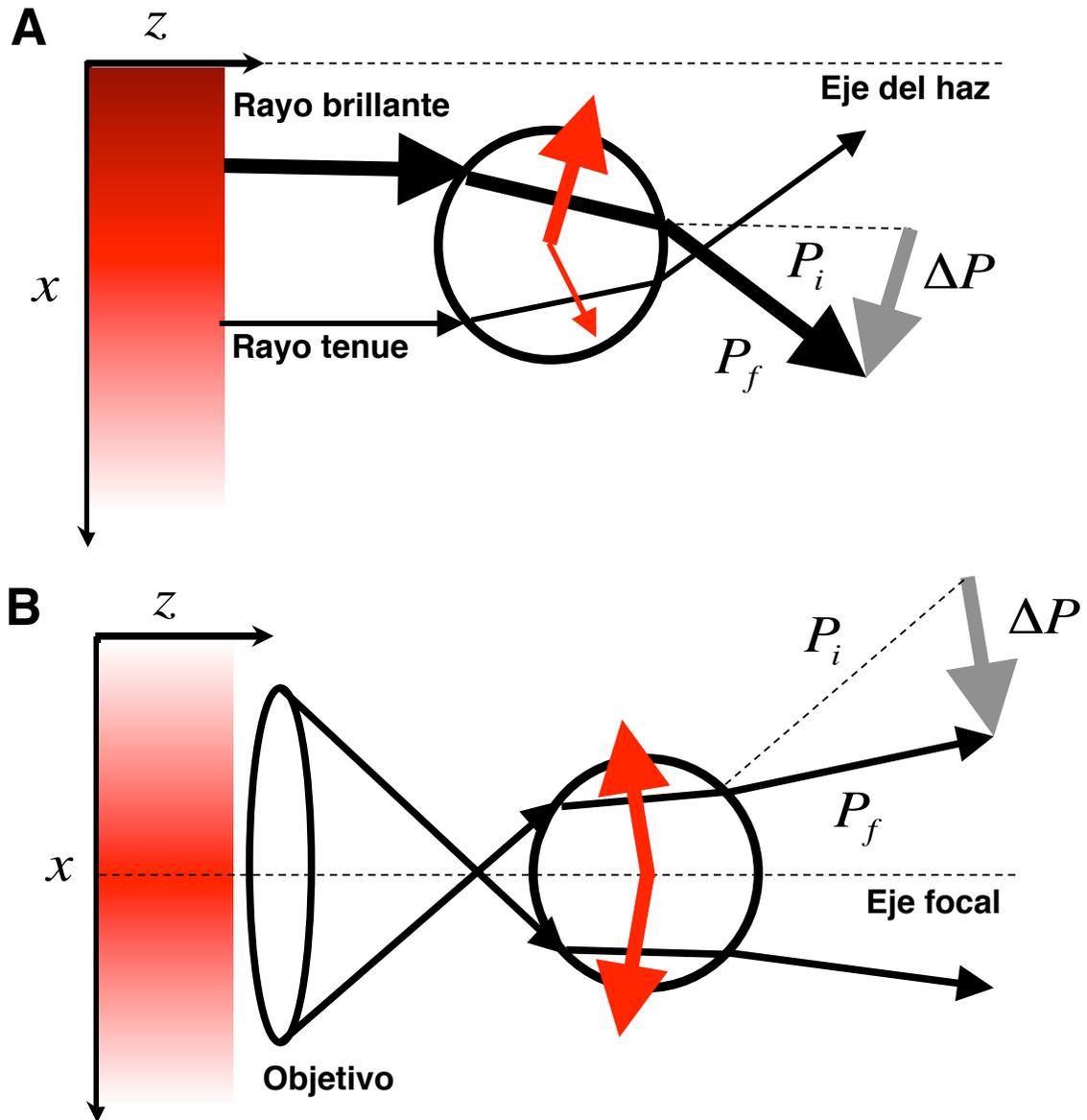


Figura 2.1: Diagrama de rayos que muestra la refracción de un par de rayos provenientes de un haz de perfil gaussiano, al atravesar una esfera dieléctrica de índice de refracción mayor que el índice de refracción del medio que la rodea. Las fuerzas sobre la esfera se muestran con las flechas de color rojo. A) dos rayos paralelos atraviesan la esfera generando una fuerza que la mueve hacia $+z$ y $-x$. B) muestra dos rayos que son enfocados al atravesar una lente y luego atraviesan la esfera que se encuentra en el eje focal. Esto genera una fuerza que mueve la esfera en dirección $-z$

efectivo $m = n_a/n_b$ la fuerza axial queda expresada como:

$$F_{scat} = \frac{I_0}{c} \frac{128\pi^5 r^6}{3\lambda^4} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 n_b \quad (2.2)$$

La fuerza gradiente F_{grad} en la dirección de la intensidad del gradiente para la partícula de

Rayleigh de polarizabilidad α es $-n_b\alpha\nabla E^2/2$ en términos del índice efectivo [30]:

$$F_{grad} = \pi n_b^2 \epsilon_0 r^3 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \nabla E^2 \quad (2.3)$$

Donde ϵ_0 es la permitividad del vacío. El criterio para la estabilidad axial de una partícula en una trampa óptica está dado por la razón entre la fuerza gradiente (fuerza restauradora) y la fuerza de dispersión, la cual debe ser mayor que la unidad[30]:

$$R = \frac{F_{grad}}{F_{scat}} \geq 1 \quad (2.4)$$

2.2.2. Arreglo óptico de una pinza óptica simple

Los elementos ópticos básicos para crear una trampa tradicional estable son: un láser de perfil gaussiano, un expansor de haz o telescopio y un objetivo de microscopio de gran apertura numérica (ver figura 2.2).

Láser

Los típicos láseres usados para pinzas ópticas están cerca del infrarojo (800 – 1100 nm) con perfiles de intensidad gaussiano y con un rango de potencia entre los 50mW a los 5W [35]. Dado que las variaciones en la potencia del láser provocan cambios en la rigidez de la trampa, es de suma importancia tener un control sobre la potencia y la temperatura del láser, asegurando de esta manera la estabilidad del láser utilizado.

Objetivo de microscopio

De la sección anterior vimos que la fuerza de dispersión es proporcional a la intensidad del haz y apunta en la dirección de propagación del láser incidente. La fuerza gradiente es proporcional al gradiente de intensidad y apunta en dirección del gradiente [30]. Entonces para que una trampa óptica cumpla la condición de estabilidad (ecuación 2.4) debe utilizar un objetivo de microscopio de gran apertura numérica ($NA > 1$) para obtener un haz altamente enfocado, con la finalidad de generar una fuerza de gradiente de gran magnitud, que se contrapone a la fuerza de dispersión.

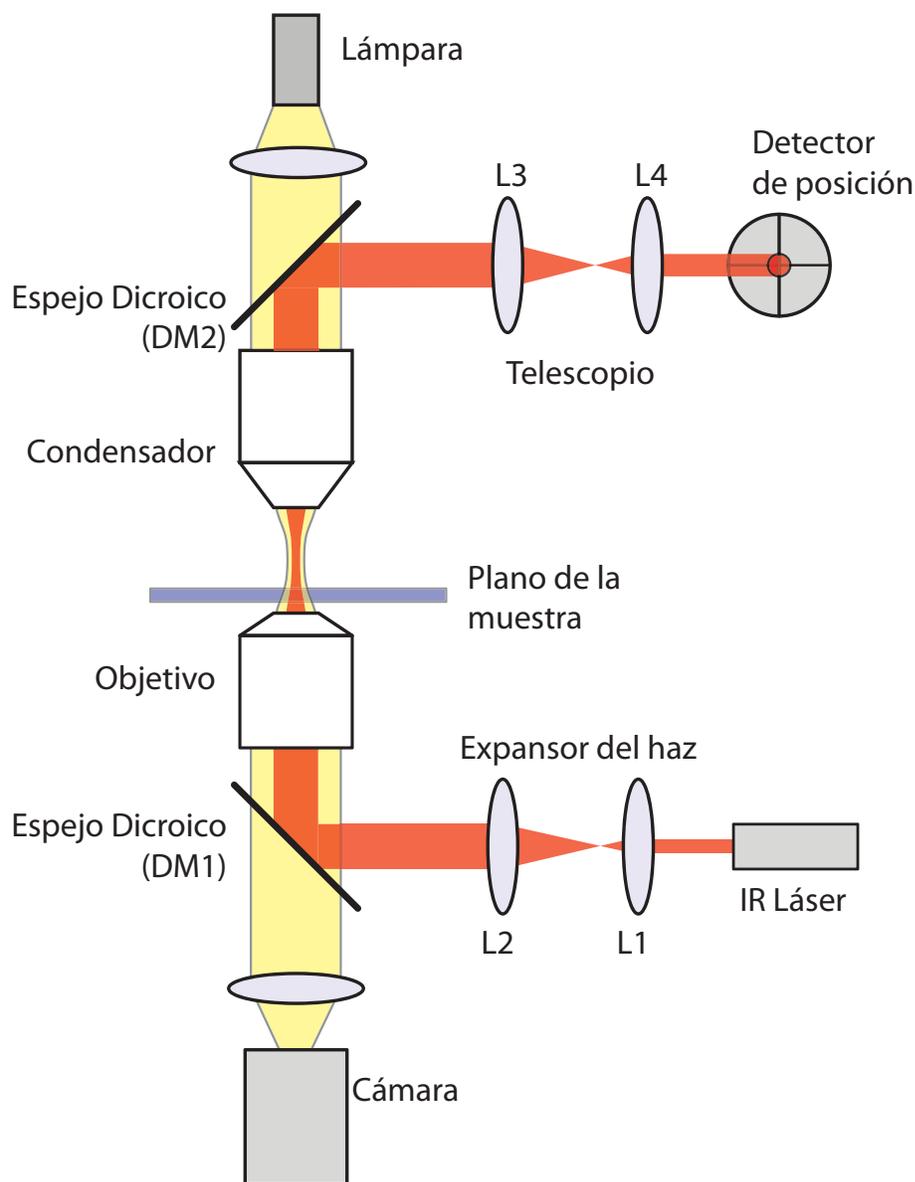


Figura 2.2: Diagrama de una pinza óptica simple. *DM1* y *DM2* son espejos dicroicos que reflejan el infrarrojo ($> 900\text{nm}$) y dejan pasar el visible. *L1* y *L2* son dos lentes que se utilizan para expandir el haz antes del objetivo de microscopio. El haz es altamente enfocado al atravesar el objetivo de microscopio de gran apertura numérica. El plano focal de la trampa óptica debe coincidir con la zona donde se encuentra la muestra. Los rayos que atraviesan la muestra y los que no, son colectados por el lente condensador, y posteriormente dirigidos al detector de posición (QPD). La luz blanca (Lámpara) permite iluminar la muestra, imagen registrada por la cámara CCD.

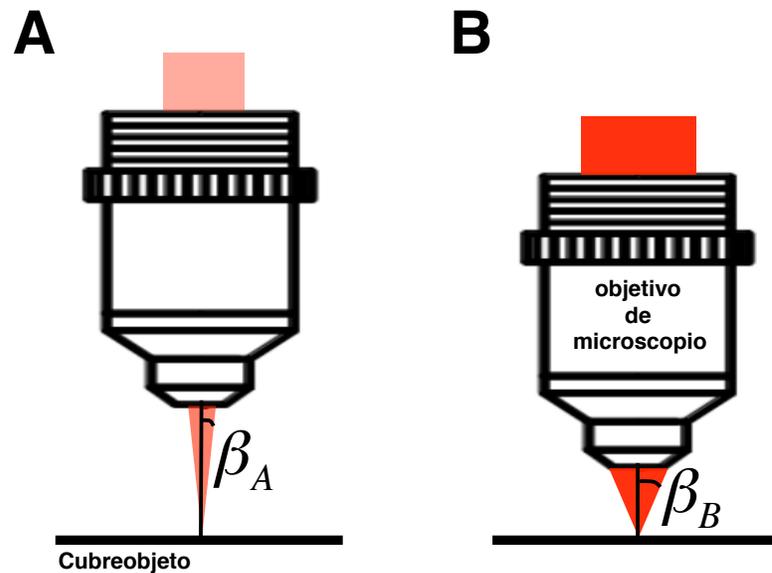


Figura 2.3: Imagen que muestra un corte longitudinal del cono de luz que se forma al atravesar un objetivo. El objetivo de la figura A tiene menor apertura numérica que el de la figura B, dado que la apertura angular es menor en A ($\beta_A < \beta_B$). Como muestra la imagen, el objetivo de mayor apertura numérica es capaz de coleccionar una mayor cantidad de rayos, hasta los más oblicuos.

La apertura numérica (ver figura 2.3) es una medida de la cantidad de rayos capturados por el objetivo luego de difractar la muestra. Mientras más grande el valor de NA , mayor será la cantidad de rayos oblicuos capturados por el objetivo, el resultado es una imagen de mejor resolución. La apertura numérica está relacionada con la apertura angular (2β) y el índice de refracción del medio entre el objetivo de microscopio y el cubreobjeto (n) de la siguiente manera:

$$NA = n \sin \beta \quad (2.5)$$

Donde β es el ángulo comprendido entre el rayo más oblicuo capturado por el objetivo y su eje óptico (ver figura 2.3). La apertura angular es el ángulo del cono de luz coleccionado por la lente, y es igual a dos veces β . En general, los objetivos de distancia focal corta tienen una mayor apertura angular. Para un mismo objetivo de apertura numérica fija, es posible aumentar este valor cambiando el medio entre objetivo del microscopio y el cubreobjeto, tal como muestra la figura 2.4.

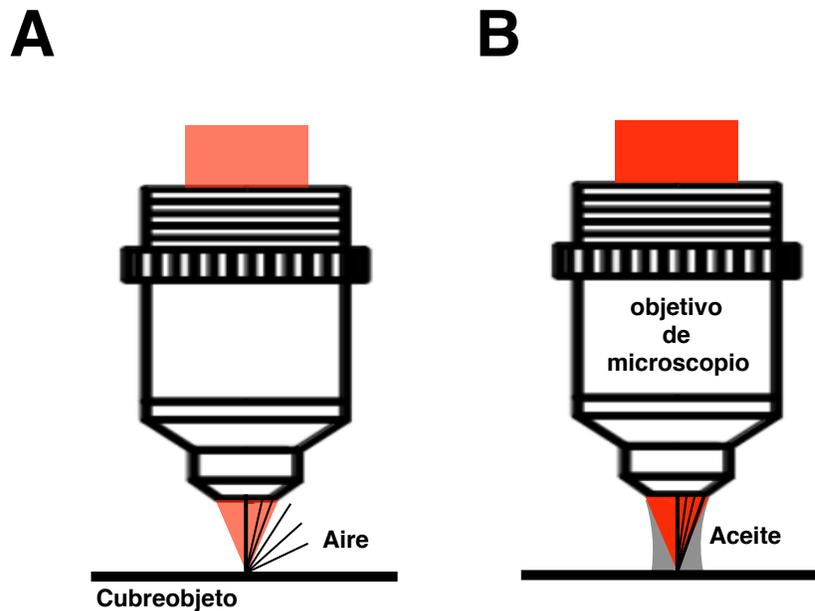


Figura 2.4: Esta figura muestra como el índice de refracción del medio de inmersión influye en la cantidad de rayos colectados por un objetivo de apertura numérica fija. A) muestra los rayos colectados por el objetivo en aire. B) muestra el mismo objetivo cubierto con aceite.

Para el caso del objetivo en aire de la figura 2.4, el índice de refracción del cubreobjeto ($\sim 1,52$) es mayor que el índice de refracción del medio (~ 1). Los rayos que provienen de la muestra, al cambiar de medio vidrio-aire, se alejan de la normal, por lo que sólo los rayos más centrales son colectados por el objetivo. Mientras más grande sea el índice de refracción del medio de inmersión mayor es la cantidad de rayos colectados por el objetivo. Cuando el objetivo es cubierto por aceite, cuyo índice de refracción ($\sim 1,51$) es muy cercano al índice del cubreobjeto, todos los rayos que provienen de la muestra son colectados por el objetivo.

La utilización de un objetivo de microscopio convencional también tiene relación con la visualización del objeto de la muestra debido al factor de amplificación del microscopio. Además su uso permite aplicar, de manera más fácil, otras modalidades de visualización como por ejemplo, la técnica de epifluorescencia [35].

Telescopio

La formación de una trampa óptica fuerte requiere el uso completo de la apertura numérica del objetivo que hace la trampa. Esto es logrado mediante la expansión del haz, de tal manera que

el diámetro del haz, antes de llegar al objetivo, debe ser del mismo tamaño que la apertura trasera de este. El haz es expandido mediante una configuración Kepleriana de dos lentes (L1 y L2), la magnificación final del haz es igual a la razón entre la distancia focal de L2 dividida por la de L1.

Sólo estos tres elementos son necesarios para generar la trampa óptica. El resto de los elementos que se observan en la figura 2.2 son parte del sistema de detección y medición.

2.3. Detección de fluctuaciones

El seguimiento de la posición de una partícula se puede realizar de varias maneras. Los esquemas presentados aquí han sido desarrolladas para medir las fluctuaciones de una microesfera de sílica o poliestireno. Sin embargo, estas mismas técnicas pueden ser aplicadas en objetos de forma irregular, como por ejemplo el seguimiento de la posición de una bacteria o, en nuestro caso particular, medir las fluctuaciones de una célula [35].

2.3.1. Video detección

En este método, la posición de la partícula confinada se determina a través de imágenes en el tiempo, capturadas por una cámara montada tal como se muestra en el arreglo óptico de la figura 2.2. Mediante el procesamiento digital de las imágenes adquiridas y conociendo el tamaño del pixel de la imagen (mediante una calibración previa), es posible determinar la posición, con una exactitud menor al tamaño del pixel (típicamente del orden de $\sim 5nm$) utilizando algoritmos que determinan el centroide de una esfera [35]. La técnica de video seguimiento ha sido implementada en tiempo real, sin embargo la resolución temporal está limitada por la tasa de adquisición de la cámara (típicamente entre $\sim 25 - 120Hz$). Si bien, podríamos mejorar la resolución utilizando cámaras de alta velocidad ($\sim 40kHz$), estas están limitadas por la velocidad del computador ($\sim 500Hz$) o su capacidad de memoria ($\sim 10^5$ cuadros de alta resolución, lo que equivale a un video de menos de 2 minutos a $1kHz$).

Por otra parte, este tipo de detección tiene otros obstáculos. Mientras menor sea el tiempo de exposición, mayor deberá ser la apertura del objetivo para aumentar el nivel de iluminación de las imágenes. La consecuencia de esto es que aumentan las aberraciones ópticas por lo que la resolución espacial disminuye.

2.3.2. Detección interferométrica

Esta modalidad, basada en la utilización de un láser para detectar posición, resulta muy atractiva debido a que un sólo láser puede ser utilizado para confinar y medir simultáneamente la posición de la partícula. La técnica consiste en detectar la interferencia que resulta entre la luz

dispersada y la no dispersada por la partícula atrapada. La señal de interferencia es monitoreada con un detector de cuatro cuadrantes (QPD) esquematizado en la figura 2.8a. Cada cuadrante (i) se comporta como un detector individual y proporciona un voltaje (V_i) proporcional al número de fotones que inciden en la superficie. El dispositivo genera tres señales diferentes, S_X , S_Y y S_Z , las cuales resultan de la combinación lineal de los voltajes (V_i) entregados por cada cuadrante (ver figura 2.8a).

$$S_X = \frac{(V_1 + V_3) - (V_2 + V_4)}{V_1 + V_2 + V_3 + V_4} \quad (2.6)$$

$$S_Y = \frac{(V_1 + V_2) - (V_3 + V_4)}{V_1 + V_2 + V_3 + V_4} \quad (2.7)$$

$$S_Z = V_1 + V_2 + V_3 + V_4 \quad (2.8)$$

Asumiendo que para pequeños desplazamientos de la microesfera respecto del centro de la trampa ($\Delta x < r$, ver figura 2.5B), el detector responde linealmente. Esto quiere decir que las señales S_X y S_Y tienen una relación lineal con la posición del haz que llega al detector (X, Y), la que a su vez es proporcional a la posición de la partícula (x, y) respecto del centro de la trampa. Por lo tanto, la posición de la partícula ($x(t)$, $y(t)$) relativa al centro de la trampa, a un tiempo t , en términos de las señales que entrega el detector queda determinada por: $\Delta x(t) = AS_X(t)$ y $\Delta y(t) = BS_Y(t)$, donde las constantes A y B son factores de conversión. Estos coeficientes convierten la señal de voltaje en unidades de longitud y son determinados a partir de la curva calibración (ver capítulo 3 sección 3.3.2). En cuanto a la señal S_Z es proporcional a la intensidad total del haz que incide en el detector y está relacionada con la posición axial. Sin embargo, en este proyecto se está interesado en las fluctuaciones laterales, por lo que no se entrará en detalle sobre la metodología de la detección fuera del plano.

Mediante el uso de este esquema, obtendremos información sobre la posición de la partícula relativa al centro de la trampa y no la posición absoluta.

2.3.3. Régimen de baja potencia

Una variante del método de detección interferométrica de fluctuaciones, es la técnica denominada pinzas ópticas de baja potencia [28]. Este método consiste en la utilización de un láser

ajustado a una potencia tal que la trampa no pueda ejercer una fuerza significativa sobre el sistema en estudio.

Es posible estimar el valor para la fuerza de confinamiento de la trampa sobre una microesfera dieléctrica de $1\mu\text{m}$ de radio. Escribiendo la fuerza gradiente (ver ecuación 2.3) en términos de la intensidad del láser tenemos que [36]:

$$F_{grad} = \frac{\pi n_b^2 r^3}{c} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \nabla I \quad (2.9)$$

Donde I , es la intensidad del láser, r es el radio de la partícula, c es la velocidad de la luz, n_b el índice de refracción del medio que rodea la partícula y m es el cociente entre el índice de refracción de la partícula y el medio que la rodea. El perfil de intensidad espacial para un láser gaussiano altamente enfocado puede ser escrito en coordenadas cilíndricas de la siguiente manera[37]:

$$I(\rho, z) = I_0 \exp \left(- \frac{\rho^2}{2\varpi_\rho^2} - \frac{z^2}{2\varpi_z^2} \right) \quad (2.10)$$

Donde ϖ_z y ϖ_ρ son las componentes radial y en el eje z para la cintura del haz y I_0 es la intensidad máxima. La magnitud para ∇I puede ser aproximada a $I_0 \rho / \varpi_\rho^2$ para la componente $\hat{\rho}$. La cintura lateral del haz tiene un diámetro establecido por la longitud de onda del haz y la apertura numérica del objetivo, dado por $\varpi = \lambda / NA\pi$. Para una apertura numérica típica de una pinza óptica igual a $NA = 1,25$ y un láser de longitud de onda igual a $\lambda = 975\text{nm}$ un valor estimado para la cintura del haz es $0,25\mu\text{m}$.

Como explicaremos en detalle más adelante, la trampa óptica puede ser pensada como una partícula confinada en un pozo de potencial V , fluctuando en torno a su posición de equilibrio. La fuerza que realiza la trampa se puede expresar como $F_T = -k_T \Delta \vec{r}$ donde $\Delta \vec{r}$ corresponde al desplazamiento de la partícula desde el centro de la trampa. Es posible determinar k_T a partir de la fuerza gradiente. Por lo tanto el trabajo que realiza la trampa ($k_T (\Delta \vec{r})^2 / 2$), con una potencia del láser del orden de los μW , sobre una partícula inmersa en agua, de $1\mu\text{m}$ de diámetro y suponiendo que tiene un índice de refracción igual a 1,5, con un desplazamiento típico desde el centro de la trampa igual a $0,1\mu\text{m}$ es del orden de $\sim 10^{-21}\text{N}\cdot\text{m}$. Por otro lado la energía térmica $E_T = k_B T / 2$ (donde k_B es la constante de Boltzmann y T la temperatura del sistema), es del orden de

$2 \times 10^{-21} \text{N}\cdot\text{m}$. Por lo tanto, el trabajo realizado por la trampa es del mismo orden que la energía térmica del sistema en que se encuentra inmersa la partícula, en el régimen de baja potencia. En contraste, el régimen normal de pinzas ópticas, para una potencia del láser de atrapamiento igual a 300mW genera una fuerza del orden de los *nanonewton*, o un trabajo del orden de $\sim 10^{-17} \text{N}\cdot\text{m}$, tres órdenes de magnitud mayor que la energía térmica del sistema, energía suficiente para lograr el confinamiento y suprimir las fluctuaciones térmicas de la partícula.

2.4. Densidad espectral de potencia (PSD)

Para entender el principio del análisis de las fluctuaciones de un sistema, comenzaremos por describir las fluctuaciones de una partícula inmersa en un fluido. Tales fluctuaciones tienen un espectro de frecuencias que caracteriza al sistema, en este caso una partícula confinada en un pozo armónico. Esta descripción nos servirá mas adelante para la etapa de calibración del instrumento.

2.4.1. Ecuación de Langevin

La ecuación de movimiento para una partícula libre es descrita por la siguiente ecuación:

$$m\ddot{x} = m \frac{d^2 x}{dt^2} = \mathbf{F} \quad (2.11)$$

Donde m es la masa, x es la posición, t es el tiempo y \mathbf{F} es la fuerza sobre la partícula. Expresando \mathbf{F} en términos de las fuerzas de arrastre y aleatoria, la ecuación de movimiento se puede reescribir como:

$$m\ddot{x} = -\gamma_d \dot{x} + F(t) \quad (2.12)$$

Donde γ_d es el coeficiente de arrastre, y $F(t)$ es la fuerza aleatoria. Algunas de las propiedades de esta fuerza aleatoria, también llamado Ruido Blanco ("White noise"), son:

$$\langle F(t) \rangle = 0 \quad (2.13)$$

$$R_F = \langle F(t)F(t') \rangle = \Gamma \delta(\tau) \quad (2.14)$$

Donde R_F es la función de autocorrelación para la fuerza F , Γ es una constante, $\delta(\tau)$ es la función delta y $\tau = t - t'$ es el tiempo relativo entre las dos señales [38]

La ecuación diferencial estocástica 2.12 es conocida como la ecuación de Langevin. Añadiendo una fuerza que proviene de un potencial V , la ecuación 2.12 queda:

$$m\ddot{x} = -\nabla \cdot V - \gamma_d \dot{x} + F(t) \quad (2.15)$$

2.4.2. PSD de una partícula confinada

La trampa óptica puede ser pensada como una partícula de radio r , confinada en un pozo de potencial V , fluctuando en torno a su posición de equilibrio. Cuando la partícula se aleja del centro de la trampa, debido a la fuerza térmica ejercida por el fluido que la rodea o alguna otra fuerza externa, existe una fuerza de restauración que la atrae nuevamente al centro de la trampa (ver figura 2.5A). Esta fuerza es proporcional a la constante de rigidez de la trampa k_T (análogo a la constante de rigidez del resorte) y al desplazamiento de la partícula respecto del centro de la trampa Δx . Mientras más se aleja la partícula, mayor es la fuerza de restauración. La fuerza que realiza la trampa está dada, en el regimen lineal, por la siguiente relación:

$$F_T = -k_T \Delta x \quad (2.16)$$

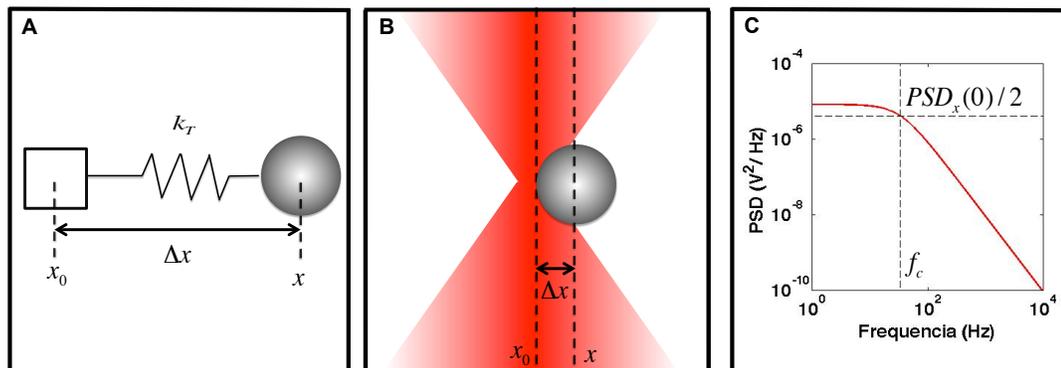


Figura 2.5: A) Analogía de un potencial armónico con una trampa óptica. El cuadrado representa el centro de la trampa y la esfera la partícula. B) Partícula de radio r y diámetros $d = 2r$, inmersa en un fluido de viscosidad η confinada en una trampa óptica. Δx es el desplazamiento de la partícula desde el centro de la trampa. C) Densidad espectral de potencia ideal (PSD) para un partícula de $1\mu\text{m}$ inmersa en agua y confinada con una potencia del láser igual a 75mW . La línea punteada negra muestra la posición de la frecuencia de corte igual a 33Hz .

Supongamos que tenemos una microesfera dieléctrica de radio r , inmersa en un fluido newtoniano de viscosidad η y confinada por un potencial armónico de una trampa óptica (ver figura 2.5B). Sin pérdida de generalidad y para simplificar el problema, analizaremos sólo la coordenada x de la posición de la partícula y que $x_0 = 0$. La dinámica de la partícula está dada por la

ecuación 2.15. Considerando las dimensiones de la microesfera, las fuerzas inerciales son despreciables en el problema. Por ejemplo, consideremos una partícula de radio $r = 1\mu\text{m}$ y de masa $m \sim 10^{-14}\text{kg}$ inmersa en un fluido a una temperatura de 300K , cuya velocidad se puede determinar a partir del teorema de equipartición $v \sim \sqrt{k_B T/m} \sim 600\mu\text{m s}^{-1}$. El número de Reynolds de esta partícula en un fluido de viscosidad $\eta \sim 10^{-3}\text{Pa}\cdot\text{s}$ y densidad $\rho \sim 1000\text{kg/m}^3$ es:

$$Re = \frac{F_{inercia}}{F_{viscosa}} = \frac{2r\rho v}{\eta} \sim 10^{-3} \quad (2.17)$$

Para $Re \ll 1$ las fuerzas viscosas dominan. Por lo tanto, despreciando el término inercial de la ecuación 2.15 la dinámica de la partícula para este problema está dada por:

$$\gamma_d \dot{x}(t) + k_T x(t) = F(t) \quad (2.18)$$

El primer término representa la fuerza de arrastre que genera el fluido en la esfera donde $\gamma_d = 6\pi\eta r$ es el coeficiente de arrastre para una partícula lejos de la superficie. La interacción entre una partícula y una capa de agua cerca de la superficie, conduce a un aumento en el coeficiente de arrastre hidrodinámico [35]. Por lo tanto, el valor del coeficiente de arrastre γ_d de una partícula que se encuentra a una distancia Z' de la superficie es:

$$\gamma_d = \frac{6\pi\eta r}{1 - \frac{9}{16}\left(\frac{r}{Z'}\right) + \frac{1}{8}\left(\frac{r}{Z'}\right)^3 - \frac{45}{256}\left(\frac{r}{Z'}\right)^4 - \frac{1}{16}\left(\frac{r}{Z'}\right)^5} \quad (2.19)$$

Regresando al análisis de la dinámica de la partícula, el segundo término representa la fuerza que ejerce la trampa sobre la partícula. El último término es una fuerza fluctuante, que representa las colisiones aleatorias de las moléculas que componen el medio que rodea a la microesfera, también conocida como fuerza térmica o ruido térmico. Esta última se caracteriza por tener una distribución constante en el espacio de Fourier, con un valor que depende de la disipación y de la temperatura. Aplicando a la coordenada x de la ecuación 2.18, la transformada de Fourier definida por:

$$\mathcal{X}(f) = \int_{-\infty}^{\infty} x(t) e^{-2\pi i f t} dt \quad (2.20)$$

Resulta:

$$2\pi\gamma_d(f_c - if) \mathcal{X}(f) = \mathcal{F}(f) \quad (2.21)$$

donde \mathcal{X} y \mathcal{F} son las transformadas de Fourier de la coordenada x y de la fuerza aleatoria $F(t)$ respectivamente y $f_c = k_t/2\pi\gamma_d$ es la frecuencia de corte, definida como $PSD(f_c) = PSD(0)/2$ (Ver figura 2.5C).

Podemos calcular la densidad espectral de potencia de la coordenada x definida como:

$$PSD_X(f) = |\mathcal{X}|^2 = \mathcal{X}\mathcal{X}^* \quad (2.22)$$

$$= \frac{|\mathcal{F}|^2}{4\pi^2\gamma_d^2 |f_c - if|^2} \quad (2.23)$$

El valor de $|\mathcal{F}|^2$ está dado por:

$$PSD_F = |\mathcal{F}|^2 = TF\{\langle F(t)F(t') \rangle\} = \int_{-\infty}^{\infty} \langle F(t)F(t') \rangle e^{-2\pi if\tau} d\tau \quad (2.24)$$

Donde TF denota la transformada de Fourier. Haciendo uso de la propiedad para la función de autocorrelación de una fuerza aleatoria definida en 2.14 la ecuación 2.24 queda:

$$PSD_F = |\mathcal{F}|^2 = \int_{-\infty}^{\infty} \Gamma\delta(\tau)e^{-2\pi if\tau} d\tau = \Gamma \quad (2.25)$$

Por lo tanto la fuerza aleatoria tiene una distribución constante en el espacio de Fourier. El valor de la constante Γ se determina a partir del teorema de Fluctuación - Disipación, el cual relaciona la amplitud de las fluctuaciones térmicas Γ , con los procesos disipativos γ_d , de la siguiente manera:

$$\frac{1}{2}m\langle \dot{x}^2 \rangle_{\infty} = \frac{\Gamma}{4\gamma_d} \quad (2.26)$$

Esta relación se puede obtener resolviendo la ecuación diferencial 2.12 para la velocidad. Por el teorema de la equipartición 2.26 queda:

$$\begin{aligned} \frac{\Gamma}{4\gamma_d} &= \frac{1}{2}k_B T \\ \Rightarrow \Gamma &= 2k_B T \gamma_d \end{aligned} \quad (2.27)$$

Donde k_B como la constante de Boltzman, T la temperatura del sistema en equilibrio térmico [38].

Reemplazando la expresión 2.27 en la ecuación 2.23, la densidad espectral de potencia para la coordenada x queda expresada como:

$$PSD_X(f) = \frac{D}{2\pi^2(f^2 + f_c^2)} \quad (2.28)$$

Donde $D = k_B T / \gamma_d$ es el coeficiente de difusión [39]. Esta es la expresión final para la densidad espectral de potencia de dos caras para la coordenada x de una partícula confinada en una trampa óptica, la cual fluctúa en torno a su posición de equilibrio debido a las colisiones con el fluido que la rodea.

2.5. Técnica híbrida

Un instrumento híbrido resulta de la combinación de diferentes técnicas con el propósito de obtener un instrumento mejorado que incorpore las ventajas y capacidades de los distintos métodos a combinar. Sin embargo, la construcción de este tipo de herramientas no es tarea fácil, debido a que las dificultades y complejidades de cada técnica también son incorporadas al nuevo instrumento. Existe una amplia variedad de instrumentos híbridos, la mayoría combina algún método de cuantificación con alguna técnica de visualización. Por ejemplo, la combinación de AFM con espectroscopía confocal RAMAN proporciona propiedades topográficas, mecánicas, térmicas, eléctricas y magnéticas con resolución molecular y a la vez información de la composición química específica, con una resolución espacial sub-micrométrica. Las técnicas a combinar pueden potenciar las condiciones experimentales y la cuantificación de las mediciones. Un ejemplo de este último, es la combinación de pinzas magnéticas con las técnicas de cantilever, la cual permite la exploración en una amplia gama de fuerzas, utilizando un método local con una mejor resolución temporal en comparación a las pinzas magnéticas simples [40]. Las pinzas ópticas también han sido ampliamente combinadas con distintas técnicas. Por ejemplo, trampas ópticas en combinación con la técnica de visualización fluorescente llamada “Transferencia de Energía de Resonancia de Fluorescencia (FRET)”, aplicada en el estudio de moléculas individuales y que correlaciona fuerzas con distancias entre proteínas[41]. Otro ejemplo, es la combinación de las pinzas con una técnica de microscopía de super resolución, llamada confocal multicolor y agotamiento de emisión estimulada (STED) [42].

En esta sección se presenta el instrumento óptico híbrido no invasivo construido en el presente trabajo, el cual combina las pinzas ópticas con la técnica de visualización de fluorescencia de campo abierto.

2.5.1. Microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia es una variante del microscopio óptico convencional. Su funcionamiento se basa en el fenómeno de fluorescencia que presentan ciertas moléculas denominadas fluoróforos. Este fenómeno ocurre debido a la estructura fina de los niveles energéticos de estas moléculas, como se muestra en la figura 2.6A, un fotón de energía $h\nu_{Ex}$ excita a la molécula desde el estado base g al nivel excitado e . Dentro del nivel excitado, la molécula decae por procesos vibracionales cuyo tiempo característico es del orden $10^{-12} - 10^{-10}$ s. Posteriormente

decae emitiendo un fotón de menor energía $h\nu_{Em}$. El proceso de emisión ocurre en un tiempo característico del orden de $10^{-9} - 10^{-7}$ s, denominado vida de fluorescencia.

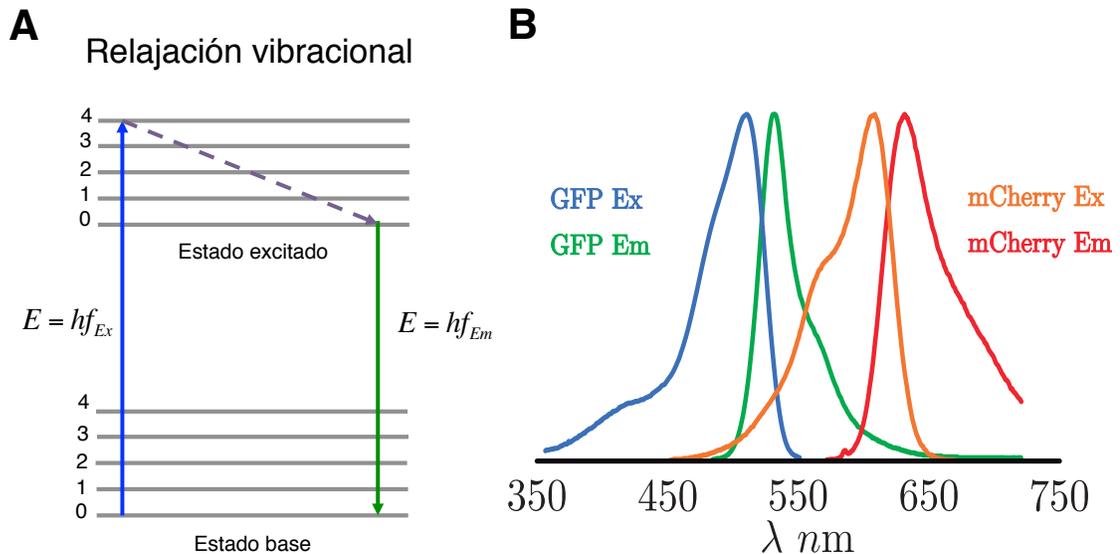


Figura 2.6: Microscopía de fluorescencia. A) Diagrama simplificado de energía de Jablonski. Donde h es la constante de Planck. f_{Ex} y f_{Em} son las frecuencias de excitación y emisión respectivamente. B) Espectros de excitación (azul y naranja) y emisión (verde y rojo) para los fluoróforos GFP y mCherry.

La longitud de onda para excitar a la molécula y posteriormente la longitud de onda de emisión, dependerá del tipo de fluoróforo a utilizar (figura 2.6B), por ejemplo proteínas fluorescentes verdes (Green Fluorescent Protein; GFP), proteínas fluorescentes rojas (Red Fluorescent Protein; RFP), entre otros. Los fotones emitidos por la muestra fluorescente son entonces colectados para formar una imagen de fluorescencia (figura 2.7). Estas moléculas pueden ser modificadas para marcar de forma selectiva distintas componentes intracelulares.

2.5.2. Diseño experimental del instrumento híbrido

La figura 2.7 muestra el diseño experimental desarrollado. Un diodo láser infrarrojo (LASER PL980P330J Thorlabs), de longitud de onda $\lambda = 975\text{nm}$ y potencia variable (hasta 300mW), se utiliza como láser de atrapamiento o sensor según corresponda. El haz es reflejado por un par de espejos galvanométricos (XY Galvo) y expandido al pasar a través de un arreglo óptico de dos lentes acromáticas fL1 y fL2 separados por una distancia equivalente a la suma de sus distancias focales iguales a 15mm y 15cm respectivamente, formando así un sistema de expansión

kepleriano. Luego, el haz es reflejado por un espejo dicróico (DM1 725nm) y dirigido al objetivo de microscopio de gran apertura numérica ($60\times$ /Oil, $NA = 1,25$). Al pasar por el objetivo, el láser es enfocado en el plano focal del objetivo. La muestra se encuentra en un soporte (porta muestra) cuyas posiciones x, y y z son controladas por un motor de micro-posicionamiento (motor x : z625B, motor y : MTS25/M-Z8, piezo z : PE4, con sus controladores TDC001, TDC001 y TPZ001, respectivamente, Thorlabs). La posición z de la muestra se hace coincidir con el plano focal. Luego de atravesar la muestra, la luz es colectada por un objetivo condensador $10\times$ ($NA = 0,3$) y dirigida a un espejo dicróico (DM3 725nm) el cual refleja los rayos a un arreglo óptico de dos lentes fL3 y fL4, de distancias focales $50mm$ y $35mm$ respectivamente. El haz colimado es dirigido al foto detector de cuatro cuadrantes QPD (PDQ80-A Thorlabs 400 – 1050 nm). La señal que entrega el detector QPD es amplificada por un factor 9 y posteriormente registrada con una tarjeta de adquisición (National Instruments NI USB-6211). Para la visualización de la muestra se utiliza una lámpara WL colimada mediante la lente fL7, cuya distancia focal es igual a $35mm$. La imagen de campo claro es capturada por una cámara CMOS (PixelINK PL-B778G).

Las imágenes de fluorescencia se realizan utilizando un diodo emisor de luz (GFP 470 nm) de $800mW$ de potencia. El haz es colimado por la lente acromática fL5, cuya distancia focal es igual a $35mm$, y posteriormente dirigido al objetivo de microscopio. El haz es enfocado en el plano focal, excitando los marcadores GFP ($\sim 488nm$) incorporados a la muestra. Los fotones emitidos por la muestra ($\sim 507nm$) son capturados por el objetivo de microscopio y dirigidos a un filtro de emisión (Em 525nm), el cual elimina la luz proveniente del láser infrarojo y de reflexiones de la fuente de excitación. Finalmente los haces que pasan el filtro son enfocados en el CCD de la cámara luego de atravesar la lente fL5, cuya distancia focal es igual a $100mm$. El control del instrumento, la grabación de datos y la adquisición de imágenes están sincronizadas mediante el programa LabVIEW (National Instruments).

En la figura 2.8a, se muestra un esquema del detector QPD, donde S_X , S_Y y S_Z son las señales que entrega el detector, las cuales están directamente relacionadas con Δx y Δy (ver figura 2.8c) tal como se indica en la sección 2.3.2).

La señal S_Z no está representada en el esquema. Esta señal se encuentra relacionada con el número total de fotones que incide sobre el detector y corresponde a la suma en voltaje de cada cuadrante (ver ecuación 2.8). Esta última es utilizada para normalizar S_X y S_Y (ver ecuaciones 2.6 y 2.7) las que se vuelven independientes de la potencia del láser.

Las señales S_X , S_Y y S_Z son una medida de la deflexión del haz respecto del centro del detec-

tor. Esta deflexión está ilustrada en la figura 2.8b y es provocada por la presencia de la partícula en el camino óptico del láser. En otras palabras, las fluctuaciones de una partícula respecto del centro de la trampa (Δx y Δy) provocan un cambio en el camino óptico del láser, lo que da como resultado una deflexión del haz respecto del centro del detector. En la figura 2.8c se presenta un esquema de la celda y la muestra que contiene una partícula de sílica en el centro de la trampa óptica. A la derecha de la imagen se observa una ampliación del interior de la muestra. Una partícula de sílica confinada por una trampa óptica a una distancia Z' del cubreobjeto. La partícula se encuentra fluctuando en torno al centro de la trampa debido a la presencia del baño térmico. Estas fluctuaciones se miden desde el centro de la partícula al centro de la trampa, y están representadas por las variables Δx y Δy . Recordemos de la sección 2.3.2 que $\Delta x(t) = AS_X(t)$ y $\Delta y(t) = BS_Y(t)$, donde las constantes A y B son factores de conversión. El parámetro ϖ corresponde a la cintura del haz y tiene componentes en los tres ejes, sin embargo sólo ha sido representada la componente del eje y (ver figura 2.8c ϖ_y).

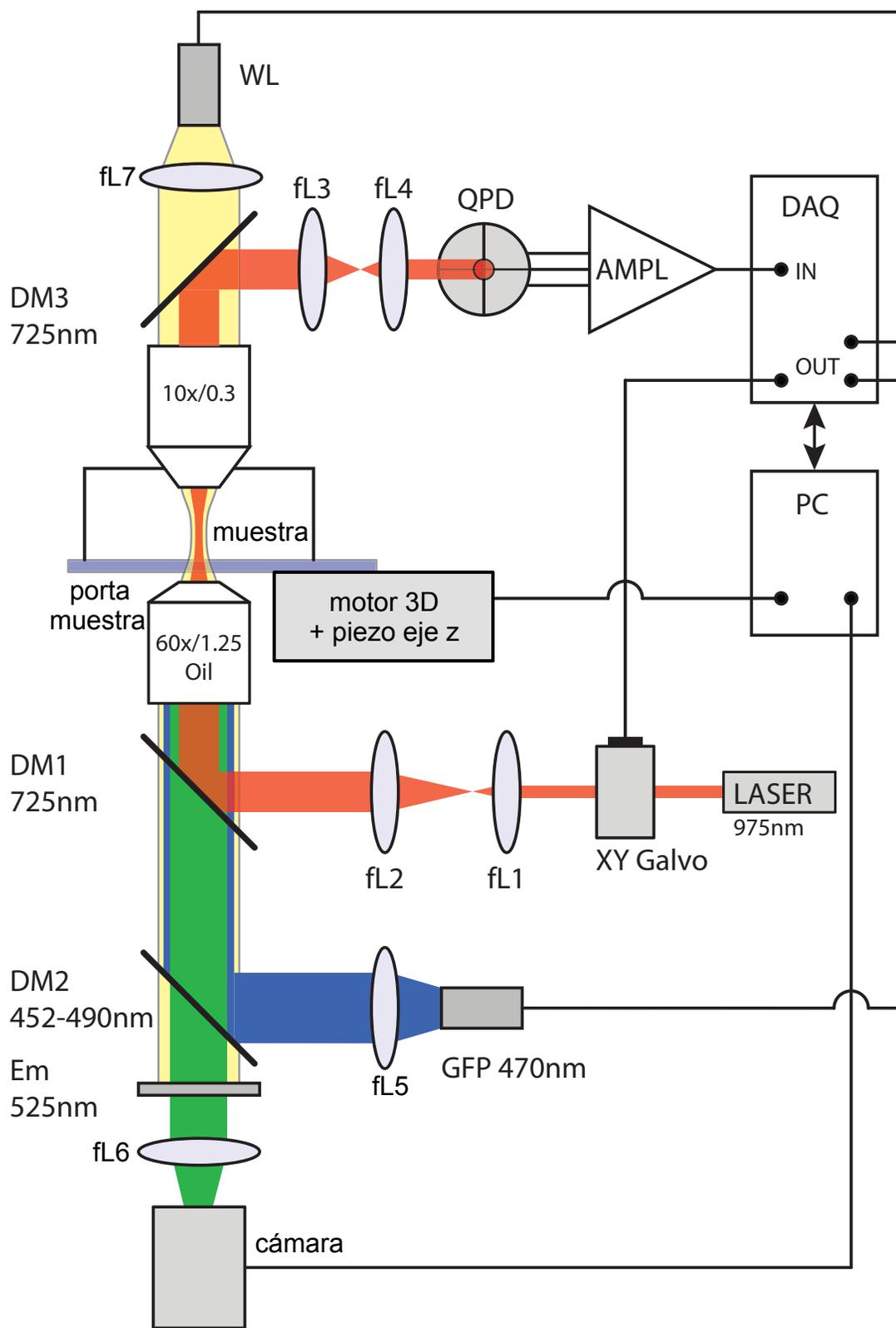
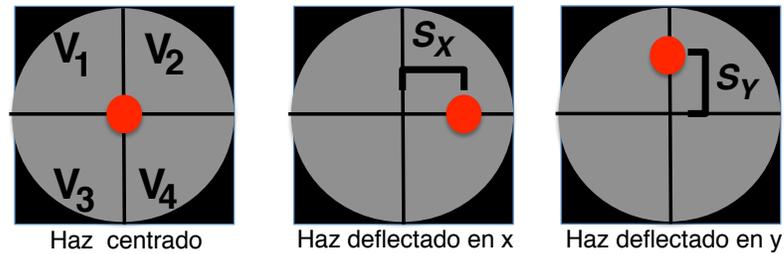
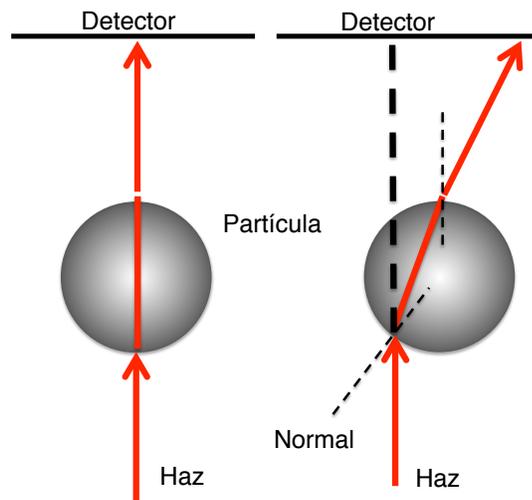


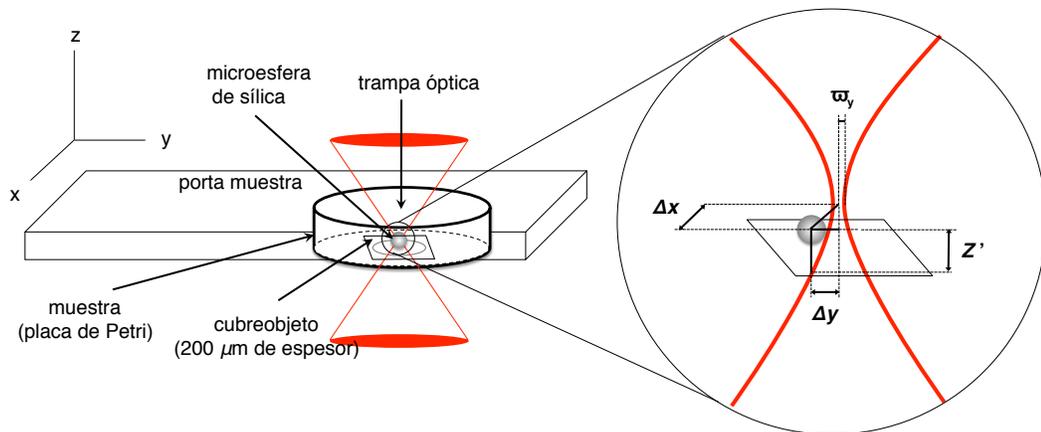
Figura 2.7: Diseño experimental de la técnica híbrida la cual combina pinzas ópticas con epifluorescencia.



(a) Esquema del detector QPD



(b) Diagrama de rayos para describir la deflexión del haz



(c) Porta muestra y cámara

Figura 2.8: a) Esquema de un detector fotodiodo de cuatro cuadrantes (QPD, figura 2.2). Cuando no hay objetos en la zona de la trampa/sensor, el haz colimado por el objetivo condensador es dirigido al centro del detector QPD, lo mismo ocurre cuando la partícula está centrada con respecto al haz. De lo contrario, el objeto cambia el camino óptico del haz. S_x y S_y son las señales que entrega el detector QPD (ver ecuaciones 2.6 y 2.7) y corresponden a las mediciones de las deflexiones del haz en el eje x e y respectivamente respecto del centro del detector. Los números 1, 2, 3 y 4 representan el número del cuadrante. b) Esquematiza la deflexión del haz debido a la presencia de una partícula en el camino óptico del láser. c) Esquema del porta muestra y cámara, se presentan las variables Δx , Δy , Z' y ϖ .

2.5.3. Limitaciones experimentales

Los modos experimentales accesibles están restringidos por el tamaño de la cintura del haz, $q_{Laser} = 1/\varpi$. Mientras en el dominio de frecuencias, el rango está limitado por el tiempo de adquisición, típicamente ajustado a 10s, dejando como límite inferior una frecuencia igual a 0,1Hz. Para escalas de tiempo más largas, la deriva térmica limita la detección de las fluctuaciones, las que son del orden de los nanómetros. Entonces para realizar mediciones a una escala de tiempo mayor, es necesario controlar las variaciones de temperatura. A altas frecuencias, las mediciones están limitadas por tres factores principales: la tasa de adquisición de la señal (ajustada a 80kHz), el ancho de banda del detector QPD (0 – 150kHz) y el ruido de fondo del instrumento (ver figura 3.6 curva roja). Esto da como resultado un límite del orden de 10kHz.

Las limitaciones del método de visualización están sujetas a la respuesta óptica del sistema de lentes que componen el objetivo, denominado límite de resolución o límite de difracción de Rayleigh. Este límite, determina la distancia mínima necesaria para resolver la posición de dos objetos. Los límites de resolución en el plano xy y axial z son $\delta r_{xy} \approx \lambda/2NA$ y $\delta r_z \approx \lambda/NA$ respectivamente. Utilizando como referencia una longitud de onda del orden de 525nm y un objetivo de apertura numérica $NA= 1,25$, resulta en límites de resolución del orden de $\delta r_{xy} = 210nm$ para el plano de observación xy y $\delta r_z = 420nm$ en el eje axial.

2.6. Conclusiones

En este capítulo hemos realizado una introducción sobre las pinzas ópticas, explicando en detalle el funcionamiento físico de las trampas ópticas y las características experimentales más importantes para la construcción de una pinza óptica simple estable. Finalmente presentamos la técnica híbrida que ha sido construída en el presente trabajo, la cual combina los principios de las trampas ópticas con epifluorescencia.

La utilización del instrumento híbrido en nuestro trabajo, y sobre todo la elección de combinar las pinzas ópticas, recae netamente en la ventaja respecto a la resolución temporal y espacial que tiene por sobre otras técnicas utilizadas previamente para obtener propiedades mecánicas o medir fluctuaciones térmicas. Además de ser una técnica no invasiva, permite realizar simultáneamente mediciones cuantitativas y cualitativas del sistema biológico de interés.

El próximo capítulo muestra en detalle una descripción completa de la caracterización de este instrumento. Un punto muy importante para la correcta interpretación de las mediciones y su significado físico.

Capítulo 3

Caracterización del instrumento

3.1. Introducción

La calibración de una pinza óptica consiste en la determinación del valor de la constante de rigidez de la trampa (k_T) y el factor de conversión (A). Se han desarrollado una gran cantidad de maneras para calibrar una trampa, sin embargo, el método a seleccionar depende de las características de la pinza óptica como por ejemplo, el esquema de detección, la habilidad del instrumento para mover la trampa, entre otros.

Nuestro diseño experimental posee la ventaja de tener una trampa móvil (ver figura 2.7 Galvo). Aún cuando el tener una trampa móvil, implica una mayor versatilidad del instrumento, se tiene el costo de que el sistema de posicionamiento introduce ruido mecánico que afectaba las mediciones basadas en la detección de las fluctuaciones del sistema en estudio. Dado que los experimentos planteados no requieren de una trampa móvil, hemos utilizado la plataforma para mover las muestras. Por otro lado, la ventaja de tener un láser de potencia variable nos da la posibilidad de variar la rigidez de la trampa, esto permite cambiar de manera fácil de un modo experimental a otro. Podemos pasar de una trampa óptica con una constante de fuerza grande, haciendo posible la manipulación de objetos, al régimen de baja potencia o trampa débil, dando acceso al movimiento libre del objeto. La caracterización de la influencia de la potencia del láser es necesaria para entender el comportamiento de la trampa frente a nuestro sistema de estudio.

En este capítulo presentamos la calibración y caracterización del instrumento, específicamente de la trampa óptica, para una microesfera de sílica bajo diversas condiciones experimentales.

3.2. Caracterización de la trampa óptica

3.2.1. Medición de la constante de atrapamiento k_T

Una manera de determinar la constante de fuerza de una pinza óptica, es medir la fuerza que ejerce la trampa sobre una partícula dieléctrica de diámetro d inmersa en un fluido de viscosidad η . Esto es posible moviendo la cámara en donde la partícula se encuentra suspendida, respecto del centro de la trampa, con una velocidad constante. Al mover la muestra, la partícula será empujada fuera de la trampa debido a la fuerza de arrastre del fluido que la rodea. Esta fuerza es igual a $F_{arrastre} = \gamma_d v_f$ donde v_f es la velocidad del fluido, equivalente a la velocidad impuesta a la muestra. Con previo conocimiento de γ_d uno puede calcular la fuerza de arrastre, la cual debe ser igual en módulo a la fuerza que ejerce la trampa para regresar la partícula al centro de la trampa. Como se dijo en la sección 2.1 la fuerza de confinamiento está dada por la ecuación 2.16. Igualando las fuerzas que actúan sobre la partícula y midiendo los cambios de posición que sufre al mover la cámara que contiene a las partículas, es posible despejar la constante de fuerza k_T .

Una forma más simple y precisa de determinar k_T , es el método desarrollado en este capítulo. Este consiste en medir las fluctuaciones de posición que sufre una microesfera de sílica de radio r inmersa en un fluido de viscosidad η , respecto del centro de la trampa óptica. Las fluctuaciones laterales son medidas utilizando la técnica de detección interferométrica. Como se dijo en la sección 2.3.2, la interacción entre una partícula confinada y la luz de atrapamiento provoca cambios en la intensidad de la luz dispersada por la esfera. Estos cambios son registrados por un fotodetector de cuatro cuadrantes (ver figura 2.7(QPD)). A partir de la señal que entrega el detector (S_X , S_Y y S_Z) es posible calcular la densidad espectral de potencia (PSD) utilizando la ecuación 2.22. El resultado es una curva en forma de Lorentziana, a la cual se ajusta la curva teórica 2.28 (one-sided power spectrum)[35], obteniendo de esta manera los parámetros de la trampa óptica:

$$PSD_X(f) = D/\pi^2(f^2 + f_c^2), \quad (3.1)$$

con la frecuencia de corte (f_c) y el coeficiente de difusión (D). Utilizando estos valores es posible determinar la rigidez de la trampa en el eje x y el coeficiente de arrastre del sistema. Dado que el detector QPD proporciona de manera individual las señales para las fluctuaciones de la partícula en x y en y , la trampa puede ser calibrada separadamente para cada eje (x e y).

Determinación con conocimiento previo de la viscosidad

Una vez realizado el ajuste de la PSD experimental con la ecuación 3.1, es posible obtener la frecuencia de corte f_c . De nuestra definición anterior $f_c = k_T / 2\pi\gamma_d$ es posible despejar k_T :

$$k'_T = 2\pi f_c \gamma_d \quad (3.2)$$

Donde llamamos k'_T a la rigidez de la trampa determinada asumiendo la viscosidad del medio conocida.

Determinación utilizando sólo la PSD

Alternativamente es posible encontrar la rigidez de la trampa utilizando solamente la densidad espectral de potencia. A frecuencia 0 la expresión para la PSD queda:

$$PSD_v(f=0) = \frac{k_B T}{\gamma_d \pi^2 f_c^2} = \frac{D}{\pi^2 f_c^2} \quad (3.3)$$

Expresando la fuerza de arrastre γ_d en términos de la rigidez de la trampa k_T la ecuación (3.3) queda:

$$PSD_v(f=0) = \frac{2k_B T f_c}{k_T \pi (f_c)^2} = \frac{D}{\pi^2 f_c^2}, \quad (3.4)$$

despejando k_T de esta ecuación:

$$\rightarrow k_T = 2\pi k_B T \frac{f_c}{D}, \quad (3.5)$$

en cuanto la viscosidad queda determinada por el parámetro D :

$$\rightarrow \eta = \frac{k_b T}{6\pi r D} \quad (3.6)$$

Dado que los parámetros D y f_c resultan del ajuste a una señal en unidades de voltaje, la rigidez de la trampa y la viscosidad del medio también quedan expresada en estas mismas unidades, es necesario determinar el factor de conversión que permite convertir las unidad de voltaje

a unidades de distancia. Este factor se determina experimentalmente a partir de la curva de calibración.

3.2.2. Curva de calibración

El factor de conversión A , se obtiene a partir de la curva de calibración (Ver figura 3.4B). La curva de calibración es la respuesta del detector cuando una partícula/neurita se mueve a través del láser mediante el desplazamiento de la partícula utilizando la plataforma del instrumento. Esta curva muestra una región lineal, lugar donde se encuentra la partícula, cuya pendiente (m), permite convertir la señal en voltaje entregada por el detector a la posición de la partícula/neurita en unidades de longitud. Por lo tanto A está dado por:

$$A = 1/m \quad (3.7)$$

donde m es la pendiente de la recta que se ajusta al régimen lineal central del barrido (Ver figura 3.4A zona indicada con el color rojo).

Para obtener la curva de calibración, se busca una partícula que se encuentre adherida al cubreobjeto. Luego se mueve el portamuestra en dirección del eje x en sentido positivo, mediante el sistema de posicionamiento de la plataforma (ver figura 2.7 Motor 3D).

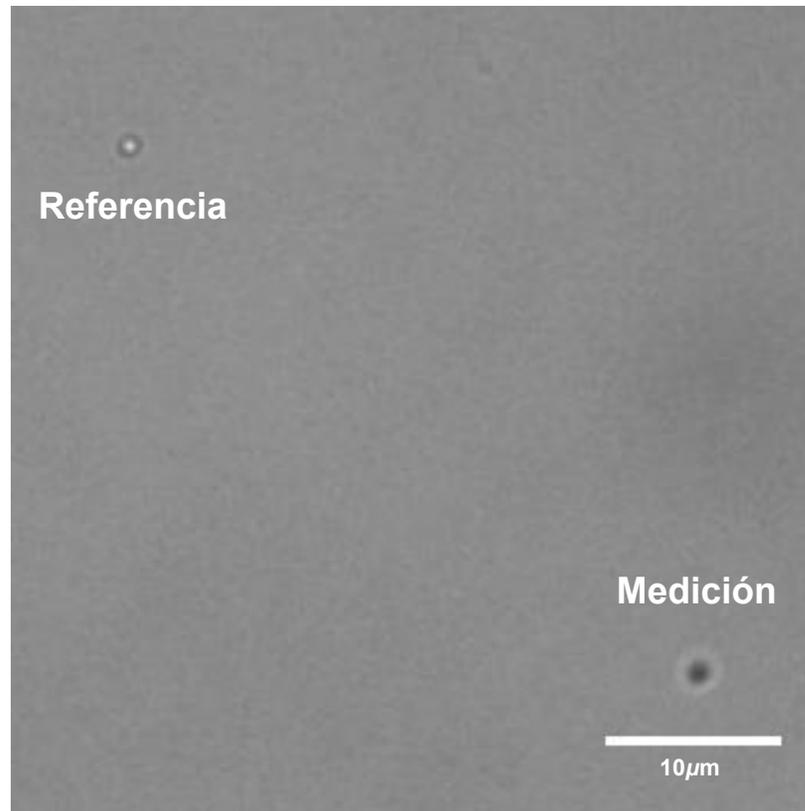


Figura 3.1: La referencia es la imagen de una partícula de $1\mu\text{m}$ de diámetro, confinada por la trampa óptica a una distancia aproximada de $11,2\mu\text{m}$ desde la superficie. La imagen de la medición es una partícula que se encuentra adherida a la superficie del vidrio.

Al momento de realizar el barrido, la partícula debe encontrarse en el centro de la trampa óptica. El posicionamiento lateral de la partícula es tarea fácil, ya que parte del láser es reflejado por el cubreobjeto y la reflexión es captada por la cámara (figuras 2.7(cámara), 3.1 y 3.3), por lo tanto resulta simple identificar la posición de la trampa en el plano. Para posicionar la partícula en la posición axial correcta, se realiza una comparación entre la imagen de una partícula confinada por la trampa (ver figura 3.1Referencia) con la imagen en vivo de la partícula adherida a la superficie (ver figura 3.1Medición). La posición axial de la partícula adherida al vidrio, se corrige moviendo el portamuestra en dirección z mediante el uso del piezo eléctrico en el eje Z (ver figura 2.7 Motor 3D), hasta que la imagen en vivo sea igual a la imagen de referencia. La figura 3.2 muestra tres imágenes de la partícula de sílica de $1\mu\text{m}$ de diámetro para diferentes distancias entre la superficie y el objetivo de microscopio.

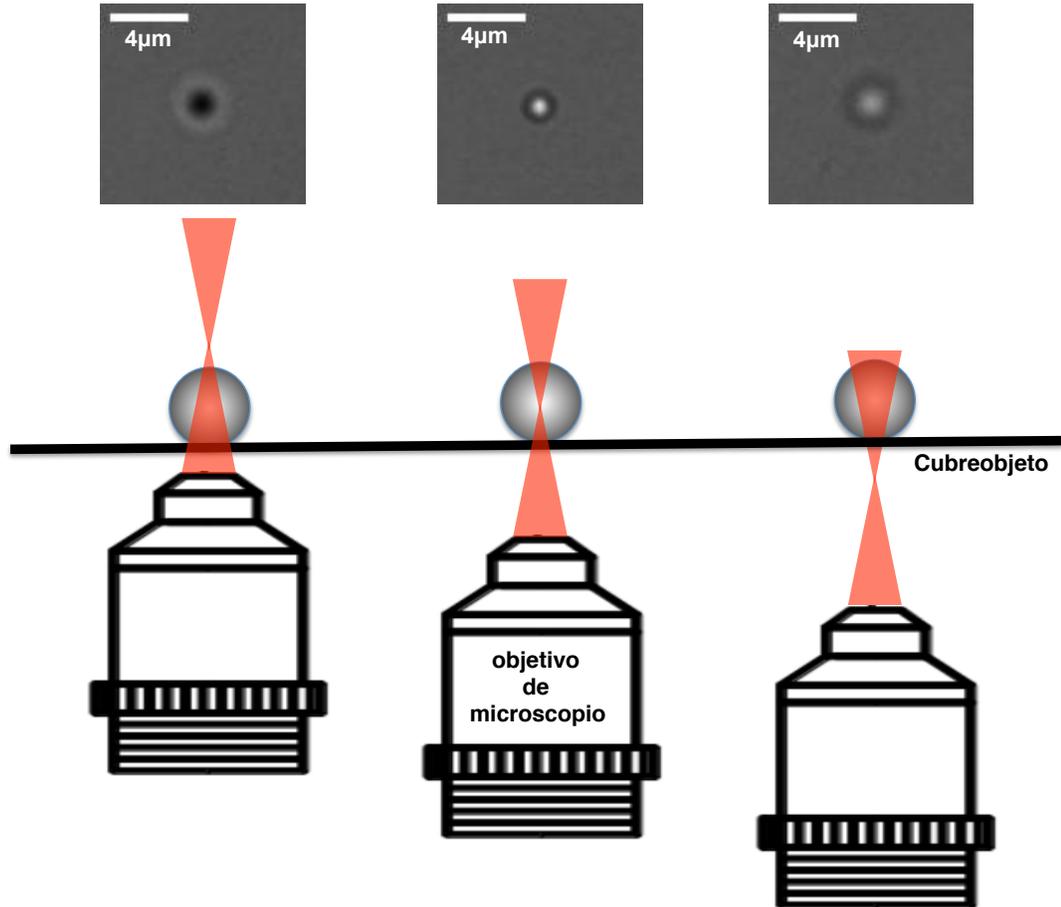


Figura 3.2: Representación esquemática del posicionamiento axial de la partícula relativo al centro de la trampa. Incluye tres imágenes de una partícula de sílica de $1\mu\text{m}$ de diámetro, adherida a la superficie del cubreobjeto, para tres distintas posiciones del portamuestra con respecto al objetivo de microscopio. La figura A) corresponde a la imagen de una partícula que se encuentra por debajo de la trampa óptica. B) Esta imagen coincide con la imagen de referencia (ver figura 3.1), es decir, la partícula se encuentra en el centro de la trampa. La figura C) corresponde a la imagen de la partícula cuando esta se encuentra por sobre la trampa óptica.

3.2.3. Cintura lateral del haz, ϖ

La cintura lateral del haz tiene un diámetro establecido por la longitud de onda del haz de luz y la apertura numérica del objetivo dada por $\varpi = \lambda/\pi NA$, con $NA = 1,25$ como la apertura numérica del objetivo y $\lambda = 975\text{nm}$ es la longitud de onda del láser. Para nuestro arreglo experimental el valor teórico aproximado para ϖ es igual a $0,25\mu\text{m}$.

En nuestro diseño experimental, la manera más simple de determinar el valor experimental lateral de ϖ es mediante el análisis de imagen de la trampa óptica. Producto de las reflexiones que sufre el haz por la presencia del cubreobjeto (ver figura 2.7), es posible capturar una imagen de la trampa mediante la cámara infraroja (ver figura 3.3A). La imagen debe ser capturada cuando la trampa se encuentra enfocada. Luego, al perfil de intensidad de la imagen se ajusta una curva gaussiana (perfil en x e y). El valor para ϖ corresponde a la desviación estandar del perfil gaussiano 3.3.

3.2.4. Preparación de las muestras y análisis de datos

Para llevar a cabo la calibración del instrumento hemos utilizado partículas de sílica, las cuales son diluidas en agua mili Q, en una concentración 1/10000, obteniendo una concentración aproximada de 5 microesferas en el campo de visión. Un volumen de $20\mu\text{l}$ de esta preparación, es depositado en el cubreobjeto de la placa petri (ver figura A.1) y recubierto con un cubreobjeto cuadrado de $12 \times 12 \text{ mm}^2$ y de $200\mu\text{m}$ de espesor.

El análisis de los datos se realiza utilizando el programa Matlab (The MathWorks, Natick, MA), que permite calcular los valores medios, las desviaciones estandar y determinar el valor de la PSD (Usando la función FFT). Para obtener información sobre las propiedades mecánicas a partir de las mediciones experimentales, la PSD es presentada de forma logarítmica. Esta transformación nos permite determinar el valor para f_c y D usando el ajuste lineal $\log_{10} PSD = \log_{10}(D/fc^2) - \log_{10}[1 + (x/fc)^2]$.

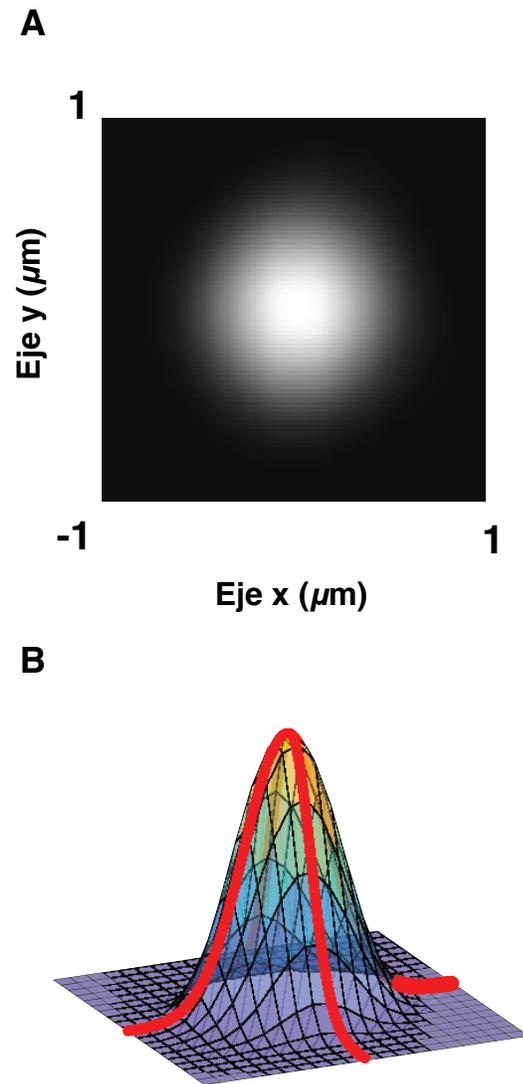


Figura 3.3: A) Promedio de 100 imágenes de la reflexión del haz en la superficie del cubreobjeto. B) Perfil de intensidad experimental de la figura mostrada en A. Las líneas rojas corresponden a la curva del perfil gaussiano en los ejes x e y .

3.3. Resultados y discusión

El instrumento a caracterizar es el presentado en la sección 2.5.2. Para llevar a cabo la calibración del instrumento hemos utilizado partículas de sílica preparadas como se explica en la subsección 3.2.4 y un láser diodo de potencia variable, cuya longitud de onda (λ) es igual a 975nm . Para todos los casos hemos considerado el parámetro T como la temperatura ambiente medida en el laboratorio en cada medición.

3.3.1. Tamaño de la cintura del haz (ϖ)

En la figura 3.3 se muestra la imagen de la trampa óptica. Del análisis de imágenes se obtiene que ϖ tiene un valor aproximado de $0,35 \pm 0,01\mu\text{m}$ para los ejes x e y .

3.3.2. Curva de calibración experimental

La figura 3.4A muestra una curva de calibración típica para una partícula de sílica de $1\mu\text{m}$ de diámetro, inmersa en agua y adherida al cubreobjeto (ver figura 3.4B). El escaneo se realiza con un láser de longitud de onda $\lambda = 975\text{nm}$ y una potencia ¹ igual a $11,3\text{mW}$.

La curva en negro es la respuesta experimental del detector (S_x) a medida que la partícula se desplaza a través del foco de la trampa en dirección del eje x en sentido positivo con un paso de 100nm . La línea segmentada roja es la recta que se ajusta a la curva de calibración en la región lineal central (sombreada en rojo). A partir de este ajuste se determina el valor para el coeficiente de conversión. El valor m es igual a $3,2 \pm 0,3\text{V}/\mu\text{m}$ por lo tanto para este caso $A = 0,3 \pm 0,1\mu\text{m}/\text{V}$. La línea punteada en azul es la señal de fondo que se obtiene al realizar un barrido sin partícula. La señal es registrada con un detector QPD.

¹potencia del láser indicada por el controlador

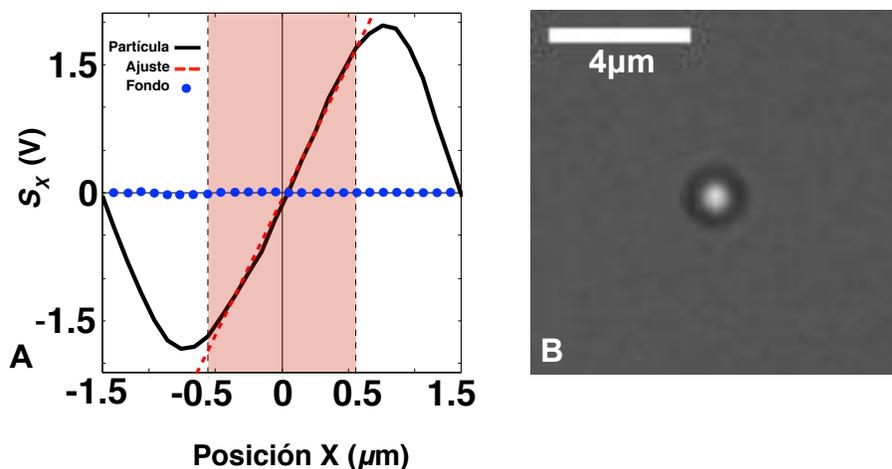


Figura 3.4: A) Curva de calibración para una partícula de sílica de $1\mu m$ de diámetro, inmersa en agua y adherida a la superficie. El barrimiento se realiza con un láser de $\lambda = 975nm$ y una potencia igual a $11,3mW$. B) Imagen de una partícula de sílica de $1\mu m$ de diámetro, inmersa en agua, adherida al cubreobjeto y posicionada en el centro de la trampa.

3.3.3. Determinación de la constante de atrapamiento k_T y viscosidad del medio η .

La figura 3.5A muestra la señal, ya calibrada, de las fluctuaciones en x respecto el centro de la trampa, de una microesfera de $1\mu m$ de diámetro, inmersa en agua, confinada por la trampa óptica. La señal de color plomo es la respuesta de la partícula confinada con una potencia del láser igual a $37,5mW$ y la señal de color negro es la respuesta para una potencia del láser de $131,3mW$. A partir de Δx , es posible determinar la PSD_X . La figura 3.5B muestra la densidad espectral de potencia para la coordenada x (PSD_X), calculada a partir de las señales que se muestran en la figura 3.5A. Para una potencia del láser de $37,5mW$ la frecuencia de corte es igual a $f_c = 13,8 \pm 0,8Hz$ (ver línea segmentada vertical gris), $D = (2,2 \pm 0,1) \times 10^5 nm^2/s$ y $PSD(f_c) = 64,2 \pm 3,7 nm^2/s$ (ver línea segmentada horizontal gris). Al aumentar la potencia del láser a $131,3mW$ la frecuencia de corte también aumenta a $f_c = 54,8 \pm 1,0Hz$ (ver línea segmentada vertical negra), $D = (2,1 \pm 0,1) \times 10^5 nm^2/s$ y el valor de $PSD(f_c)$ disminuye a $3,6 \pm 0,1 nm^2/s$ (ver línea segmentada horizontal negra). Para ambos casos los parámetros son obtenidos del ajuste de la ecuación 3.1 a la curva experimental PSD_X . En la figura 3.5C se observan los histogramas para las fluctuaciones de la partícula confinada con diferentes potencias. Para una potencia del láser de $37,5mW$ la amplitud de las fluctuaciones es igual a $\sqrt{\langle x^2 \rangle} = 51,8nm$, para el caso de una potencia del láser mayor, la amplitud de las fluctuaciones disminuye a $24,7nm$.

El valor de la constante de atrapamiento ha sido determinado de dos maneras. la primera asumiendo el valor de la viscosidad del medio conocida e igual a $\eta = 1 \times 10^{-3} \text{Pa}\cdot\text{s}$ y la segunda, utilizando sólo la PSD y el factor de conversión obtenido a partir de la curva de calibración (ver figura 3.4A).

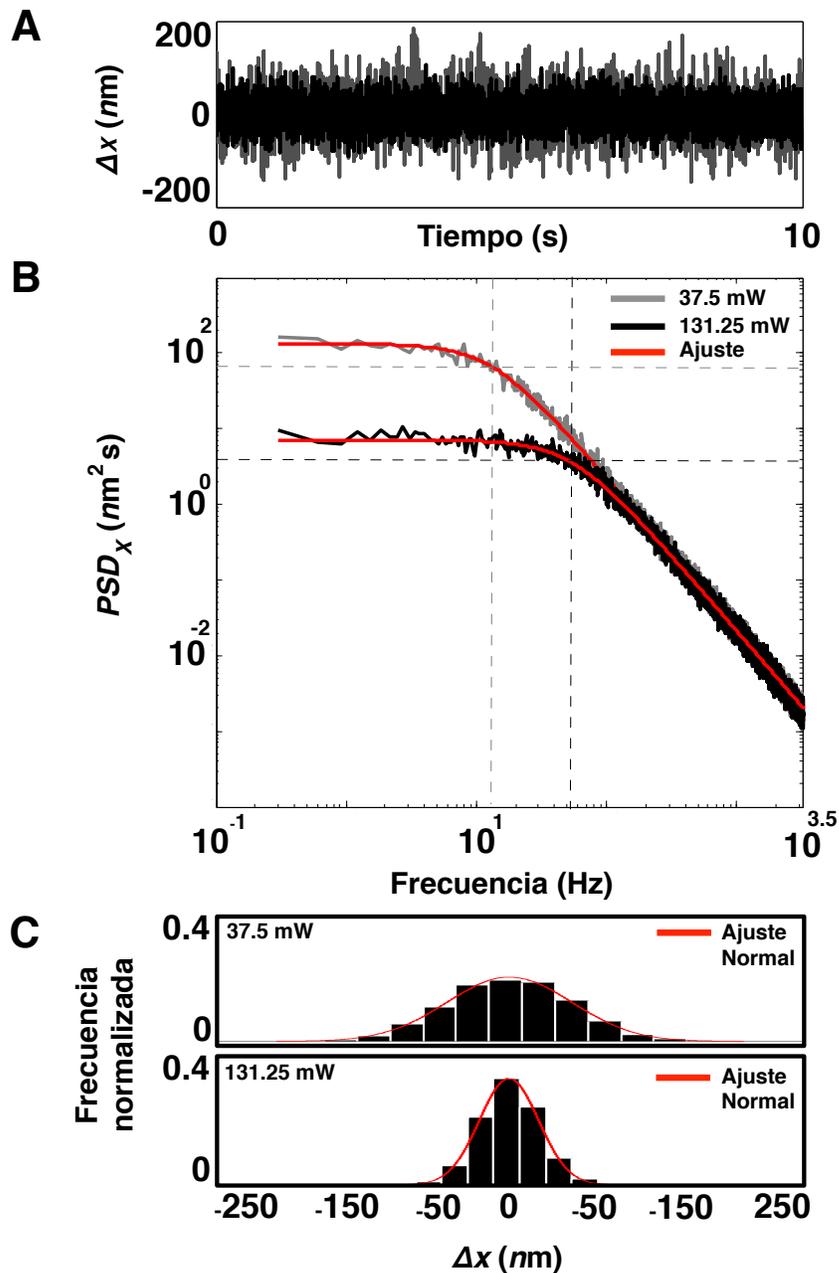


Figura 3.5: Influencia de la intensidad del láser en la respuesta de una partícula de sílica de $1\mu\text{m}$ de diámetro (ver figura 3.4B), inmersa en agua, a una temperatura ambiente de 300K, la cual se encuentra confinada por una trampa óptica a una distancia aproximada de $11,2\mu\text{m}$ desde la superficie. A) Fluctuaciones en x de la partícula para dos potencias del láser diferentes. Los datos fueron adquiridos a 80kHz durante un tiempo de 10s. B) Densidad espectral de potencia de la coordenada x de la partícula para dos potencias del láser diferentes. Cada curva representa el promedio de 10 PSD . Las líneas segmentadas verticales y horizontales representan la f_c y $PSD(f_c)$ respectivamente. C) Histograma de Δx para dos potencias del láser diferente.

Asumiendo que la viscosidad del agua es igual a $\eta = 1 \times 10^{-3} \text{Pa}\cdot\text{s}$ el valor para la rigidez de la trampa determinado a partir de la ecuación 3.2 es igual a $1,6 \pm 0,1$ y $6,5 \pm 0,01 \text{ pN}/\mu\text{m}$ para $37,5$ y $131,3 \text{ mW}$ respectivamente. Por otro lado, sin ninguna suposición, es posible obtener el valor de la rigidez una vez conocido los parámetros f_c y D . De la ecuación 3.5 los valores para k_T obtenidos para dos diferentes potencias del láser son $1,8 \pm 0,1$ y $7,6 \pm 0,2 \text{ pN}/\mu\text{m}$ para $37,5$ y $131,3 \text{ mW}$ respectivamente. Además, el valor de la viscosidad del medio, calculado utilizando la ecuación 3.6 es igual a $1 \times 10^{-3} \pm 7 \times 10^{-6}$ y $1 \times 10^{-3} \pm 6 \times 10^{-6} \text{ Pa}\cdot\text{s}$ para $37,5$ y $131,3 \text{ mW}$ respectivamente.

3.3.4. Ruido de fondo de la trampa óptica

En la figura 3.6 podemos ver la comparación entre la *PSD* de una partícula de sílica confinada por la trampa óptica (curva negra) y la *PSD* sin partícula en la zona de trampa (curva roja).

El ruido de fondo del instrumento se encuentra caracterizado por dos factores. A bajas frecuencias, hasta los 10Hz aproximadamente, el ruido se encuentra dominado por las variaciones mecánicas del sistema experimental. Por lo que es posible disminuir este factor minimizando tales vibraciones. Por otro lado, a altas frecuencias, el ruido de fondo se encuentra dominado por el ruido electrónico denominado *Shot-noise*, el cual puede ser disminuido aumentando la potencia del láser. Sin embargo, para nuestros intereses, la intensidad del láser se debe mantener baja. Con esta limitación, el ruido de fondo electrónico limita la detección de las fluctuaciones hasta los 10kHz aproximadamente.

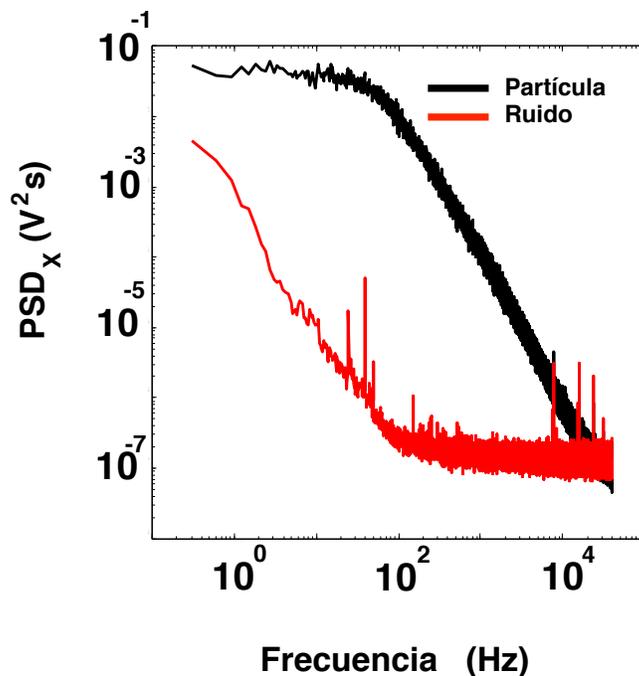


Figura 3.6: Comparación de la PSD que se obtiene para una partícula con la PSD de la señal de fondo, es decir, sin partícula en la zona de trampa. la partícula es de sílica y se encuentra confinada a $11,2\mu\text{m}$ de la superficie. Ambas mediciones se realizan para una potencia del láser igual a $131,3\text{mW}$, con el mismo medio (agua) a la misma temperatura $T = 300\text{K}$. Cada curva representa el promedio de 10 PSD .

3.3.5. Simetría de la trampa óptica

Otro punto importante a considerar es la alineación de todo el sistema óptico, dado que desajustes en la alineación se verán reflejados en la calidad de la simetría de la trampa óptica. Como se muestra en la figura 3.7A, se muestra el registro de las señales S_X y S_Y para una partícula de $1\mu\text{m}$ de diámetro, con una distribución de puntos aparentemente simétrica. Sin embargo, los histogramas de las fluctuaciones experimentadas por la partícula muestran que la desviación estándar para S_X y S_Y son de $0,06\text{V}$ y $0,07\text{V}$ respectivamente (figura 3.7B), por lo tanto la partícula es levemente más libre de fluctuar en el eje y .

Este aspecto es de vital importancia para el caso clásico de trampas ópticas, dado que en ese esquema el uso de la trampa es utilizado para cuantificar las fuerzas ejercidas por la pinza en el sistema en estudio. En el caso de baja potencia, si bien se desea una trampa simétrica, este punto no es crítico en la calidad de las mediciones, siempre que la trampa no simétrica presente distribuciones de fluctuaciones gaussianas.

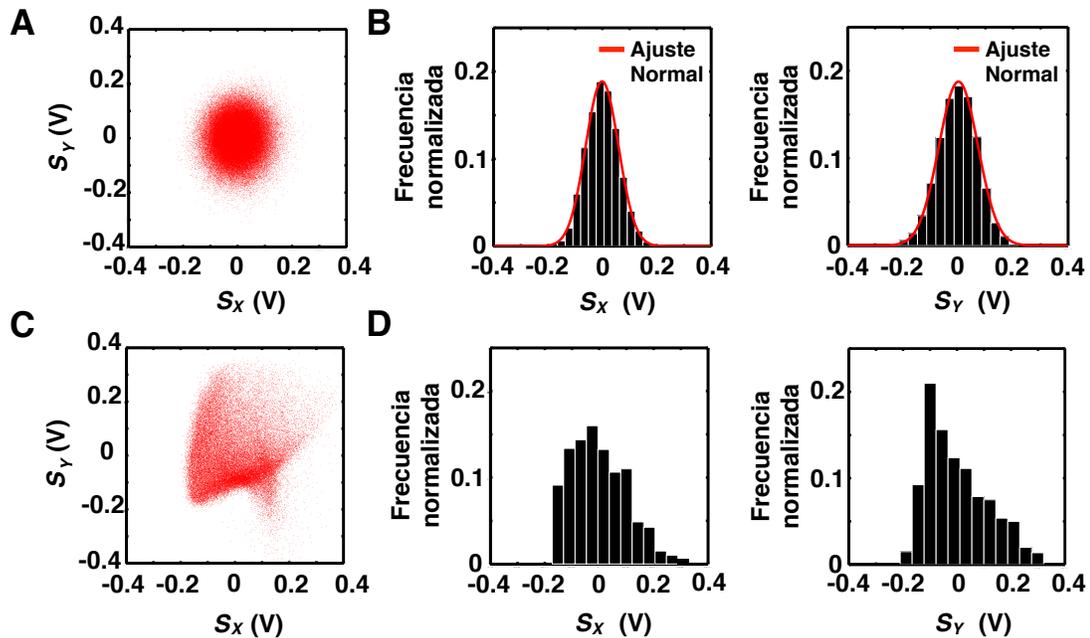


Figura 3.7: Simetría de la trampa óptica para una partícula de sílica de $1\ \mu\text{m}$ de diámetro, inmersa en agua, a una temperatura de 300 K. A) Gráfica que muestra S_Y versus S_X , señales adquiridas a una frecuencia de 80 Hz durante 100s, para una partícula confinada con una potencia del láser igual a $131,3\text{mW}$ a una distancia aproximada de $11,2\ \mu\text{m}$ de la superficie. B) Histogramas para S_X y S_Y . Las figuras C y D muestran la asimetría de la trampa óptica y la distribución no gaussianas de las fluctuaciones para una trampa no alineada correctamente.

3.3.6. Influencia de la potencia del láser en la trampa óptica

Dependencia de los parámetros f_c y D con la potencia del láser

Como se ha discutido en el punto 3.3.3, la potencia del láser modifica la constante de atrapamiento de la pinza óptica y la frecuencia de corte de la PSD . Sin embargo, la constante de difusión D es un parámetro intrínseco al fluido y al tamaño de la partícula, por lo que no debe depender de la potencia aplicada.

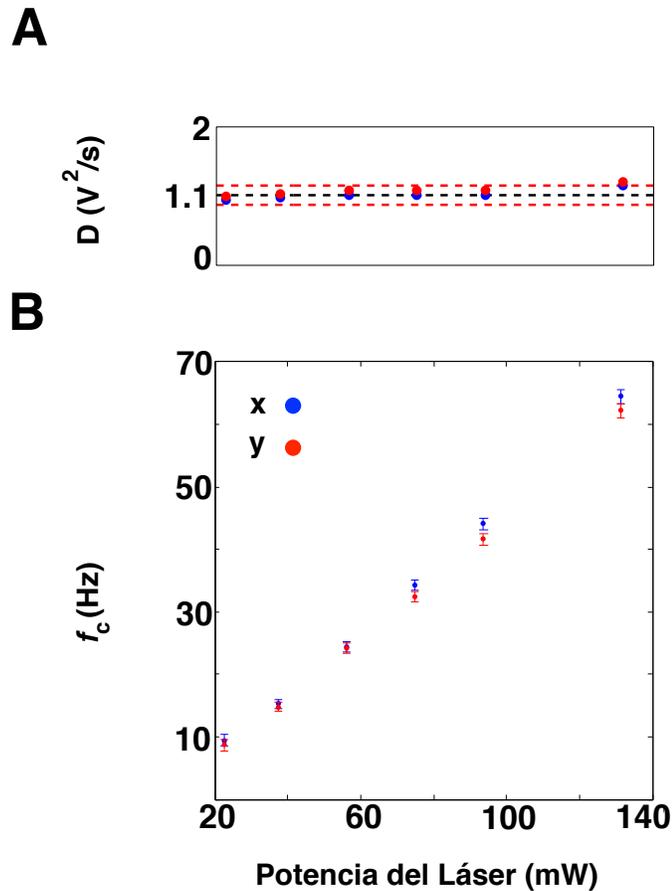


Figura 3.8: A) y B) Muestran la dependencia del coeficiente de difusión (D) y la frecuencia de corte (f_c) con la potencia del Láser respectivamente, para una partícula de $1\mu\text{m}$ de diámetro inmersa en agua a una temperatura de 300K , confinada a una distancia aproximada de $11,2\mu\text{m}$ de la superficie. Para ambas figuras, cada punto resulta del promedio de 10 mediciones.

Como se muestra en la figura 3.8A se observa que D no depende de la potencia del láser, con un valor promedio igual a $1,1V^2\text{Hz}$ (recta segmentada negra) y una desviación estandar igual a $0,1V^2\text{Hz}$. Las líneas segmentadas rojas representan el intervalo de confianza, con un 95% de las mediciones en su interior. Mientras que en la figura 3.8B se observa que f_c depende linealmente de la potencia del láser. Las frecuencias de corte para las mediciones en x son levemente mayores que para y , lo que nos indica que la trampa óptica tiene un comportamiento más rígido en uno de los dos ejes. Esta diferencia se puede cuantificar a través de los histogramas para S_X y S_Y (ver figura 3.7).

Dependencia entre k_T y la potencia del láser

De manera análoga, hemos realizado el mismo análisis para la constante de atrapamiento k_T . Como se observa en la figura 3.9A, a medida que aumenta la potencia del láser, la trampa se vuelve más rígida debido a que el gradiente de campo eléctrico se vuelve más intenso. Podemos notar que los valores de k_T en x son siempre mayores que en y , por lo tanto los movimientos de la partícula están levemente más confinadas en x . De la figura 3.9B observamos que no hay diferencia para los valores de la rigidez de la trampa determinados de las dos maneras descritas en la metodología (ver sección 3.2). El valor de k_T se ha determinado a partir de la ecuación 3.5, utilizando los parámetros experimentales f_c , D y A . En cambio el valor de k'_T se ha obtenido utilizando la ecuación 3.2 asumiendo la viscosidad del agua igual a 1×10^{-3} Pa.s. Por lo tanto el método para hallar el valor del factor de conversión es confiable.

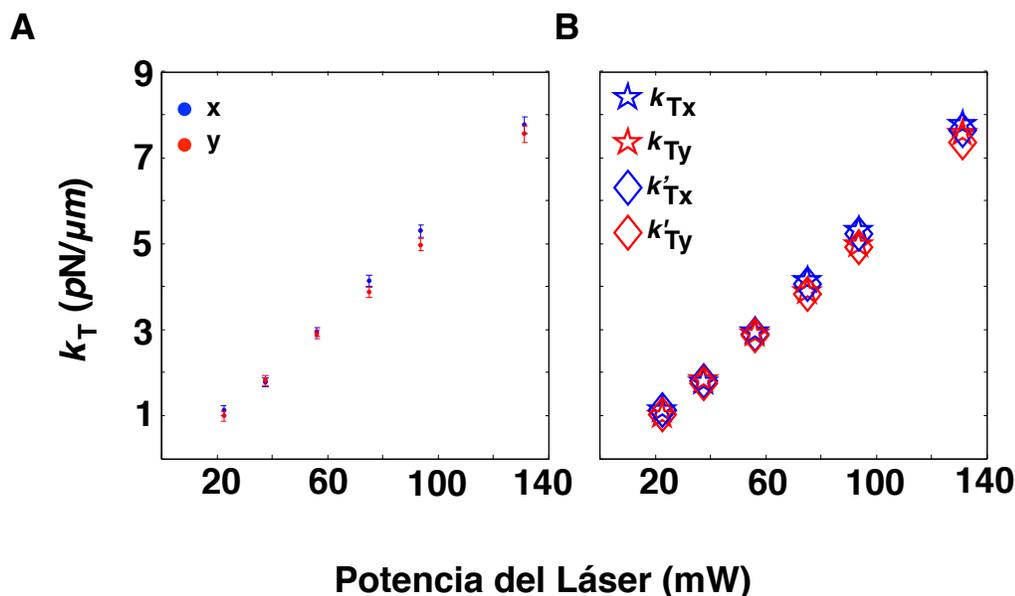


Figura 3.9: A) Dependencia entre k_T y la potencia del láser. B) Esta figura muestra la rigidez de la trampa k'_T y k_T calculados a partir de las ecuaciones 3.2 y 3.5 respectivamente, utilizando los parámetros que se muestran en la figura 3.8. Para ambas figuras, cada punto representa el promedio de 10 mediciones

Viscosidad del agua determinada a partir de los parámetros obtenidos experimentalmente en función de la potencia del láser

Este análisis también fue realizado para la medición de la viscosidad dinámica del agua. Como se ve en la figura 3.10A y 3.10B, la viscosidad del medio (η) obtenida a partir de la ecuación 3.6

y utilizando los parámetros experimentales D y A (figura 3.8A y 3.4A). Se observa que la metodología para determinar el valor para la viscosidad del medio es robusta, con un valor promedio igual $1 \times 10^{-3} \text{Pa}\cdot\text{s}$ (ver línea segmentada negra) y una desviación estándar igual a $2 \times 10^{-5} \text{Pa}\cdot\text{s}$. Las rectas segmentadas color rojo representan el intervalo de confianza, el cual incluye el 95 % de los datos.

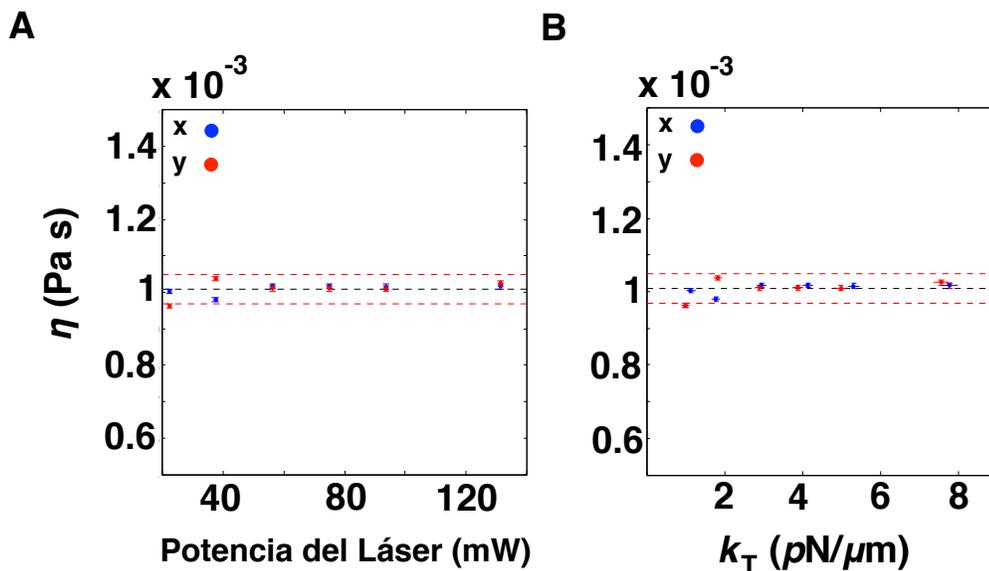


Figura 3.10: A) y B) Viscosidad del medio determinada a partir de la ecuación 3.5 para cada caso. En ambas figuras, cada punto resulta del promedio de 10 mediciones. La recta segmentada en color negro representa el promedio de η y las rectas en rojo representan dos veces la desviación estándar.

Amplitud de las fluctuaciones en función de la potencia del láser

Como se dijo anteriormente, a medida que la potencia del láser aumenta la amplitud de las fluctuaciones de una partícula disminuye (ver figura 3.5C). Dado que la relación entre la potencia del láser y la rigidez de la trampa es lineal (ver figura 3.9), podemos inferir que la amplitud de las fluctuaciones disminuye a medida que la trampa se vuelve más rígida. Este comportamiento es lo que se observa experimentalmente y se muestra en la figura 3.11. Del teorema de equipartición, el valor medio de las fluctuaciones térmicas indica que $\sqrt{\langle(\Delta x)^2\rangle} = \sqrt{k_B T/k_T}$. En la figura 3.11B podemos notar la concordancia entre los datos experimentales y la teoría (curva color gris).

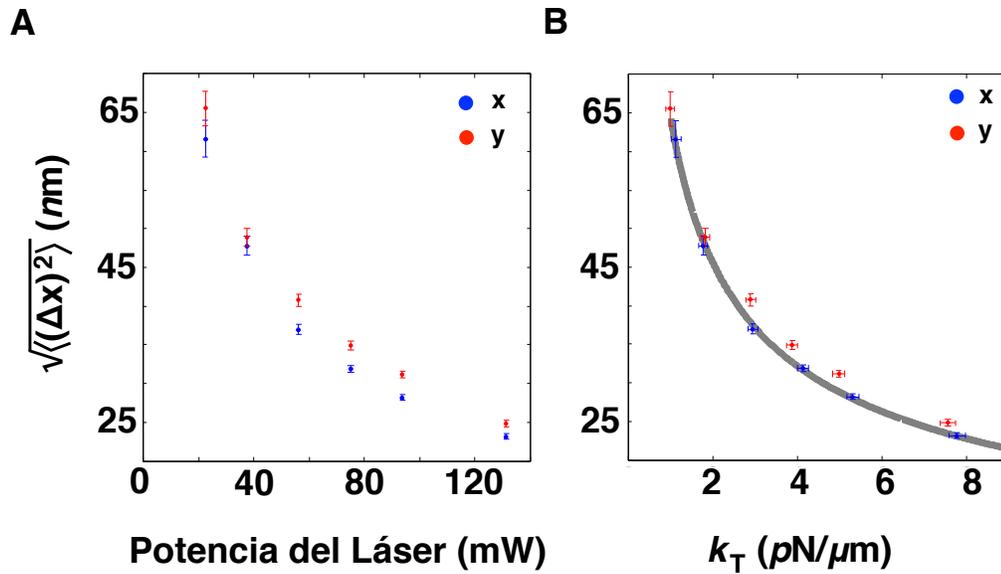


Figura 3.11: A) y B) amplitud de las fluctuaciones en función de la potencia del láser y k_T respectivamente, para una partícula de $1\mu\text{m}$ de diámetro inmersa en agua, confinada a una distancia aproximada de $11,2\mu\text{m}$ desde la superficie. En B) se muestra la concordancia entre la curva teórica y las mediciones experimentales de $\sqrt{\langle(\Delta x)^2\rangle}$ y k_T . La línea sólida gris representa la curva teórica sin parámetros ajustables, para una temperatura de 300K. Para ambas figuras, cada punto representa el promedio de 10 mediciones

Fuerza ejercida por la trampa (F_T)

La magnitud de la fuerza que ejerce la trampa sobre una partícula confinada crece linealmente con la potencia del láser. Tal como se muestra en la figura 3.12. La magnitud de la fuerza ha sido determinada utilizando al ecuación 2.16 y los valores k_T y $\sqrt{\langle(\Delta x)^2\rangle}$ que se muestran en las figuras 3.9A y 3.11A respectivamente. La magnitud máxima de la fuerza que ejerce la trampa es igual $0,2 \pm 0,1\text{pN}$ para una potencia del láser igual a 120mW

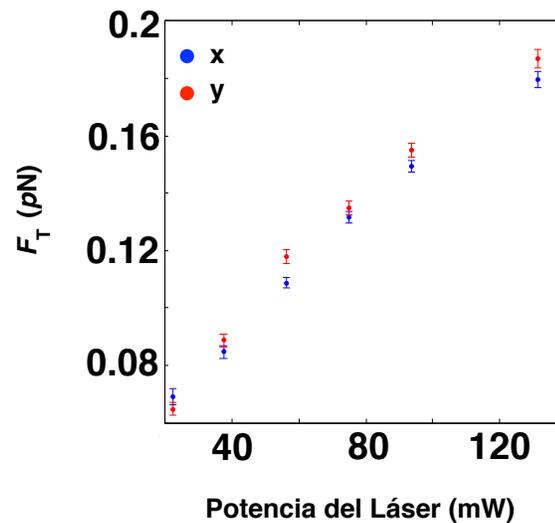


Figura 3.12: Componente x e y de la fuerza que ejerce la trampa sobre una partícula de sílica de $1\mu\text{m}$ de diámetro inmersa en agua, a $T = 300\text{K}$ confinada aproximadamente a $11,2\mu\text{m}$ de la superficie, en función de la potencia del láser. Cada punto representa el promedio de 10 mediciones. Las rectas segmentadas color rojo representan el intervalo de confianza el cual incluye el 95 % de los datos.

3.3.7. Estabilidad temporal de la trampa

Debido a que los experimentos que se desarrollaran más adelante se realizarán en periodos de más de una hora, un aspecto fundamental a considerar, en el desarrollo del instrumento, es su estabilidad temporal. Dado que nuestro diseño experimental incluye un controlador de temperatura y corriente, la longitud de onda, temperatura y potencia del láser deben ser estables en el tiempo. La estabilidad del instrumento se muestra en la figura 3.13, en la que se observan los parámetros experimentales f_c y D del espectro de una partícula de sílica de $1\mu\text{m}$ de diámetro confinada por la pinza óptica. Podemos notar que los parámetros varían en el tiempo, con un valor promedio igual a $1,1\text{V}^2/\text{s}$ y una desviación estándar igual a $0,1\text{V}^2/\text{s}$ para el caso del parámetro D . Mientras que la frecuencia de corte f_c tiene un valor promedio de $50,8\text{Hz}$ y una desviación estándar de $0,8\text{Hz}$ en 120 minutos de funcionamiento continuo del instrumento. Lo que evidencia entonces la estabilidad temporal de la pinza óptica.

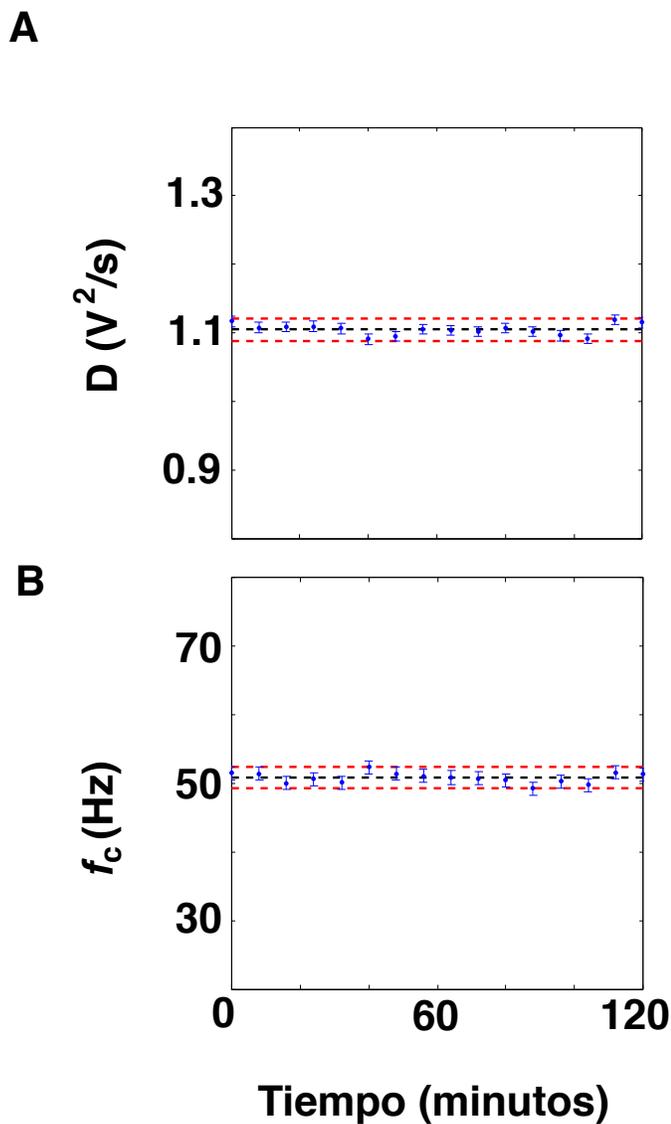


Figura 3.13: Figura que muestra la estabilidad temporal de la trampa óptica. A y B muestran las estabilidad temporal de los parámetros D y f_c respectivamente.

3.3.8. Comportamiento de la trampa óptica en función de la cercanía de la superficie (Z').

Dependencia f_c y D para distintos Z'

Para llevar a cabo este experimento, una partícula de sílica de $1\mu\text{m}$ de diámetro es posicionada, mediante la trampa óptica, lo más cercana a la superficie del cubreobjeto. La distancia

más pequeña que puede haber entre la superficie y el centro de la partícula, es el radio (r) de la partícula. Por lo tanto para una partícula de $1\mu\text{m}$ de diámetro esta distancia es igual a $0,5\mu\text{m}$. Luego, la plataforma es movida en el eje z en sentido negativo, utilizando el control piezo eléctrico de este eje (ver figura 2.7), esto es equivalente a mover la partícula en el eje z sentido positivo.

En la figura 3.14A y 3.14B se observa como la frecuencia de corte (f_c) y la constante de difusión (D) de la partícula atrapada aumenta a medida que desplazamos la partícula a lo largo del eje Z' (ver figura 2.8c). Dado que la potencia del láser no cambia, las variaciones en f_c y en D se deben a la dependencia que tiene el coeficiente de arrastre (γ_d) con la distancia relativa de la partícula a la superficie del sustrato de vidrio (Z') [43]. La interacción entre una partícula y la capa de agua cerca de la superficie del sustrato, conduce a un aumento en el coeficiente de arrastre hidrodinámico [35]. Este efecto conlleva a una disminución en f_c y D , dado que $f_c = k_T/2\pi\gamma_d$ y $D = k_B T/\gamma_d$. De la figura podemos observar que el cambio en la frecuencia de corte f_c es importante para pequeñas distancias sobre la superficie, del orden del diámetro de la partícula, para distancias grandes ($Z' > 4r$), f_c y D permanece constante, con un promedio para f_c igual a $36,9\text{Hz}$ y su desviación estándar $0,7\text{Hz}$ y para D un valor medio igual a $1,1\text{V}^2/\text{s}$ y una desviación estándar de $0,1\text{V}^2/\text{s}$.

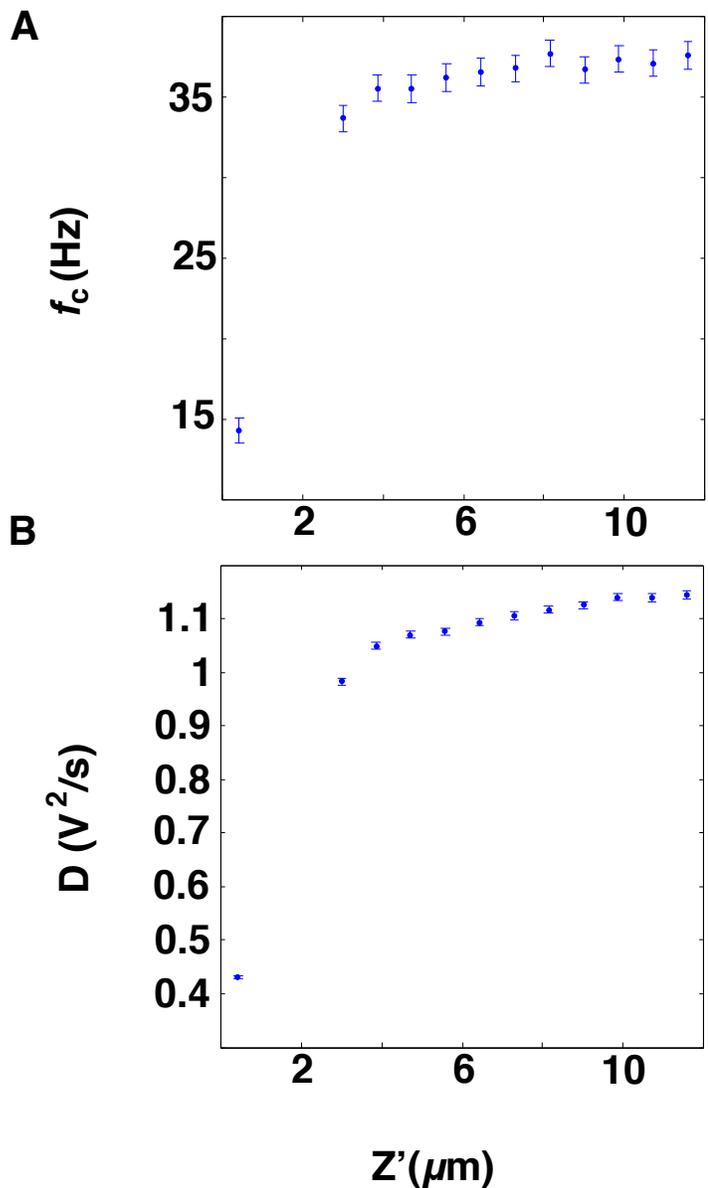


Figura 3.14: Comportamiento de la trampa para distintas distancias entre el centro de la partícula y la superficie del sustrato (cubreobjeto). Cada punto representa un promedio de 10 mediciones sobre una partícula de sílica de $1\mu\text{m}$ de diámetro, inmersa en agua, a una temperatura ambiente de 300K, confinada por la trampa óptica a una potencia del láser igual a $93,8\text{mW}$.

Dependencia k_T y γ_d para distintos Z'

Teniendo en cuenta la cercanía del sustrato, podemos corregir el coeficiente de arrastre de la partícula utilizando la expresión aproximada para γ_d de una partícula de radio r cerca de la superficie, corrección que se encuentra dada por la ecuación 2.19.

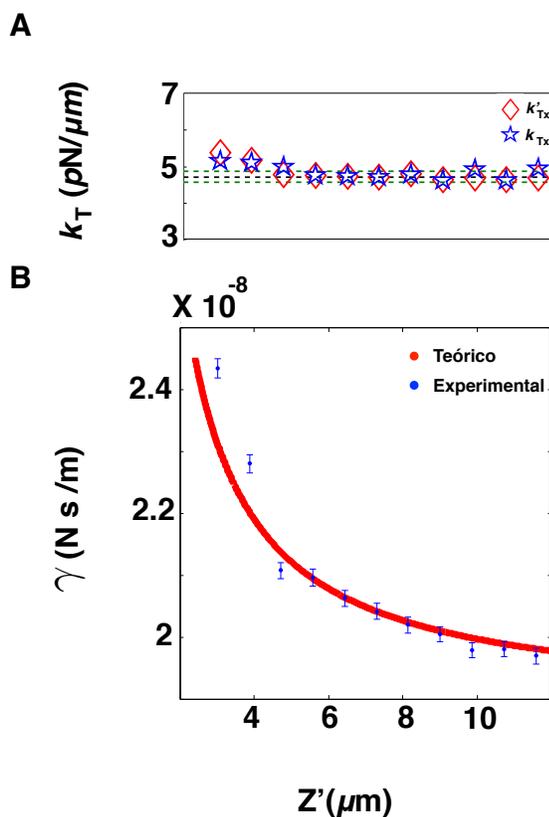


Figura 3.15: Comportamiento de la trampa para distintas distancia desde el centro de la partícula a la superficie (cubreobjeto). Cada punto respresenta un promedio de 10 mediciones sobre una partícula de $1\mu\text{m}$ de diámetro, inmersa en agua, a una temperatura ambiente de 300K, confinada por una trampa óptica a una potencia del láser igual a $93,8\text{mW}$. A) Constante k'_T y k_T calculados a partir de las ecuaciones 3.2 y 3.5 respectivamente. La figura B) muestra la concordancia entre las mediciones experimentales y la teoría para el coeficiente de arrastre γ_d . La línea roja es la curva teórica de la ecuación 2.19 sin parámetros ajustables.

En la figura 3.15B, notamos la concordancia entre los valores de γ_d experimentales y la teoría (curva roja). El valor experimental se obtiene despejando γ_d de la ecuación $D = k_B T / \gamma_d$, para una temperatura ambiente de 300K. Es claro que a medida que la partícula se acerca a la superficie, el coeficiente de arrastre aumenta. Sin embargo, la rigidez de la trampa se mantiene constante con un promedio para k_T igual a $4,7\text{pN}/\mu\text{m}$ (ver figura 3.15A línea segmentada color negro) con una desviación estándar igual a $0,1\text{pN}/\mu\text{m}$. Las líneas segmentadas color verde de la figura 3.15A, representan el intervalo de confianza, el cual incluye el 95% de los datos. El valor de k_T se determina reemplazando los parámetros experimentales f_c y D que se muestran en la figura 3.14 y el valor de A obtenido a partir de la curva de calibración (ver figura 3.4A) en la ecuación 3.5. El valor de k'_T se obtiene sustituyendo los valores teóricos de γ_d que se muestran en la figura 3.15B curva roja, en la ecuación 3.2.

Fuerza máxima F_T y amplitud de las fluctuaciones $\sqrt{\langle(\Delta x)^2\rangle}$ para distintos Z'

En la figura 3.16 podemos ver que, para distancias mayores que el radio de la partícula, la amplitud de las fluctuaciones térmicas que experimenta una partícula en x y la magnitud de la componente x de la fuerza que ejerce la trampa sobre ella, no dependen de Z' . Las rectas segmentadas negras es el promedio, con un valor igual a $32,9nm$ para las fluctuaciones y una fuerza promedio igual a $0,13pN$. La desviación estándar asociada para $\sqrt{\langle(\Delta x)^2\rangle}$ y F_T son iguales a $5,2nm$ y $0,02pN$ respectivamente. Las rectas segmentadas de color rojo representan el intervalo de confianza, el cual incluye el 95% de los datos.

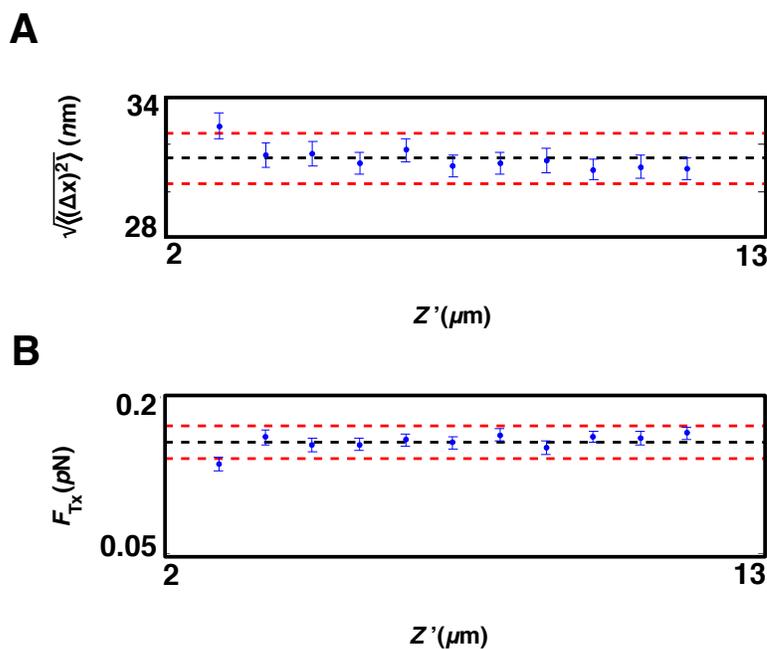


Figura 3.16: Comportamiento de la trampa para distintas distancias desde el centro de la partícula a la superficie (cubreobjeto). Cada punto respresenta un promedio de 10 mediciones sobre una partícula de $1\mu m$ de diámetro, inmersa en agua, a una temperatura ambiente de $300K$, confinada por una trampa óptica a una potencia del láser igual a $93,8mW$. A) y B) Amplitud de las fluctuaciones térmicas en x y fuerza que ejerce la trampa en el eje x respectivamente, para distintas distancias entre el centro de la partícula y la superficie.

3.3.9. Dependencia de la constante de atrapamiento en función del tamaño de la partícula.

Factor de conversión en función de d

La fuerza óptica ejercida sobre una partícula no sólo depende de su índice de refracción, si no que además del tamaño de esta (ver ecuación 2.1). Como consecuencia, a pesar de ser del mismo material, la trampa óptica no actúa de la misma manera para partículas de distinto tamaño.

En la figura 3.17A se observa la curva de calibración típica para una partícula de sílica de $2\mu\text{m}$ de diámetro (ver figura 3.17B). La curva experimental (en negro) obtenida por el detector QPD (S_x) se realiza a medida que la partícula se desplaza a través del láser en dirección del eje x en sentido positivo, con un paso de $0,1\mu\text{m}$. La línea punteada roja es la recta que se ajusta a la curva de calibración en la región lineal central (sombreada en rojo). A partir de este ajuste se obtiene el valor del coeficiente de conversión de la señal registrada en volts a desplazamiento en micrómetros. Este valor de m es igual a $4,2 \pm 0,1\text{V}/\mu\text{m}$, por lo tanto el factor de conversión para este caso es igual a $A = 0,2 \pm 0,1\mu\text{m}/\text{V}$. El valor de m que resulta del barrido sobre la partícula de $d = 2\mu\text{m}$ es mayor que para el caso de la partícula de $d = 1\mu\text{m}$, lo que concuerda con la literatura [44].

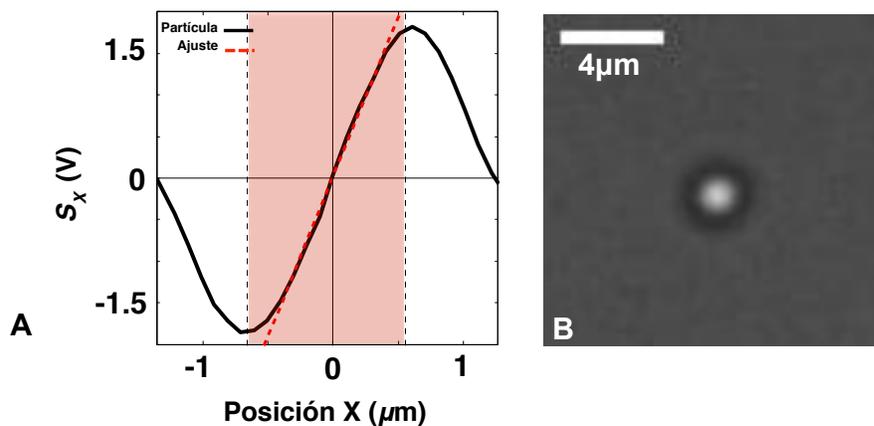


Figura 3.17: A) Curva de calibración para una partícula de sílica de $2\mu\text{m}$ de diámetro. El barrido se realiza con un láser de $\lambda = 975\text{nm}$ y una potencia igual a $11,3\text{mW}$ con un paso de $0,1\mu\text{m}$. B) Imagen de una partícula de sílica de $2\mu\text{m}$ de diámetro, inmersa en agua, posicionada en el centro de la trampa.

Dependencia f_c y D para distintos d .

Aunque la relación entre la frecuencia y la potencia del láser sigue siendo lineal, los valores de f_c son menores si los comparamos con una partícula de radio menor (ver figura 3.18A). Lo mismo ocurre para la determinación del coeficiente de difusión D . Recordemos que D está dado por la ecuación $D = k_B T / \gamma_d$ donde $\gamma_d = 6\pi r \eta$. Por lo tanto, el coeficiente de arrastre es inversamente proporcional al tamaño de la partícula, lo que implica que el coeficiente de difusión es menor para una partícula de mayor tamaño. La figura 3.18B muestra este comportamiento. El valor medio de D para la partícula de $d = 2\mu\text{m}$ es igual a $0,1\mu\text{m}^2/\text{s}$ con una desviación estándar igual a $4 \times 10^{-3}\mu\text{m}^2/\text{s}$ (línea segmentada color negro). Para el caso de la partícula de $d = 1\mu\text{m}$, el promedio del coeficiente de difusión D es igual a $0,2\mu\text{m}^2/\text{s}$ y una desviación estándar de $4 \times 10^{-3}\mu\text{m}^2/\text{s}$ (línea segmentada color negro). Las líneas segmentadas color verde representan el intervalo de confianza, el cual incluye el 95% de los datos. En esta figura podemos notar la concordancia entre la teoría y los datos experimentales (líneas sólidas color gris). El valor teórico de D para una partícula de $1\mu\text{m}$ de diámetro es igual a $0,2\mu\text{m}^2/\text{s}$, y para una partícula del doble de diámetro, el valor teórico de D disminuye a $0,1\mu\text{m}^2/\text{s}$.

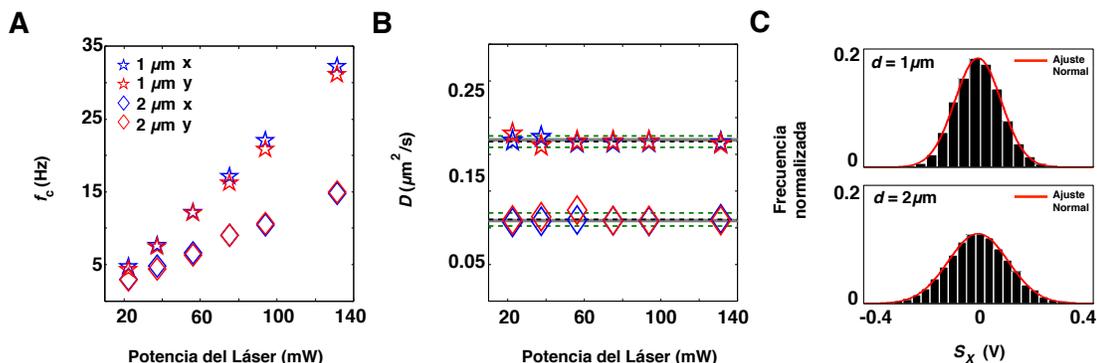


Figura 3.18: Comportamiento de la trampa para partículas de sílica de distinto tamaño. A) y B) comparación de la frecuencia de corte y el coeficiente de difusión respectivamente, para partículas de 1 y $2\mu\text{m}$ de diámetro. En la figura B, la línea sólida gris representa la curva teórica sin parámetros ajustables, para una temperatura de 300K y una viscosidad del agua igual a $1 \times 10^{-3}\text{Pa}\cdot\text{s}$. Las líneas segmentadas negras representan el valor experimental promedio de D y las líneas segmentadas verdes representan el intervalo de confianza (Incluye el 95% de los datos). Para ambas figuras, cada punto representa un promedio de 10 mediciones sobre la partículas, la cual se encuentra inmersa en agua, a una temperatura ambiente de 300K, confinada a una distancia de $11,2\mu\text{m}$ de la superficie. C) Histogramas de S_x para las dos partículas, confinadas con una potencia del láser igual a $131,3\text{mW}$.

Valor de k_T para distintos d

En la figura 3.19A se muestra la dependencia de la rigidez de la trampa con la potencia del láser para una partícula de sílica de $2\mu\text{m}$ de diámetro. Nuevamente notamos que la diferencia al determinar k_T asumiendo la viscosidad del agua conocida o utilizando sólo la PSD y el factor de conversión A , no es significativa. En la figura 3.19B, se muestran los valores de la viscosidad dinámica del agua, η , determinados a partir de la ecuación 3.6, considerando $T = 300\text{K}$ y utilizando los valores de D que se muestran en la figura 3.18A obtenidos para una partícula de $d = 2\mu\text{m}$. La recta segmentada color negro representa el valor medio igual a $0,998 \times 10^{-3}\text{Pa}\cdot\text{s}$ y su incertidumbre igual a $1,9 \times 10^{-5}\text{Pa}\cdot\text{s}$. Las rectas segmentadas verdes representan el intervalo de confianza, el cual incluye el 95 % de los datos.

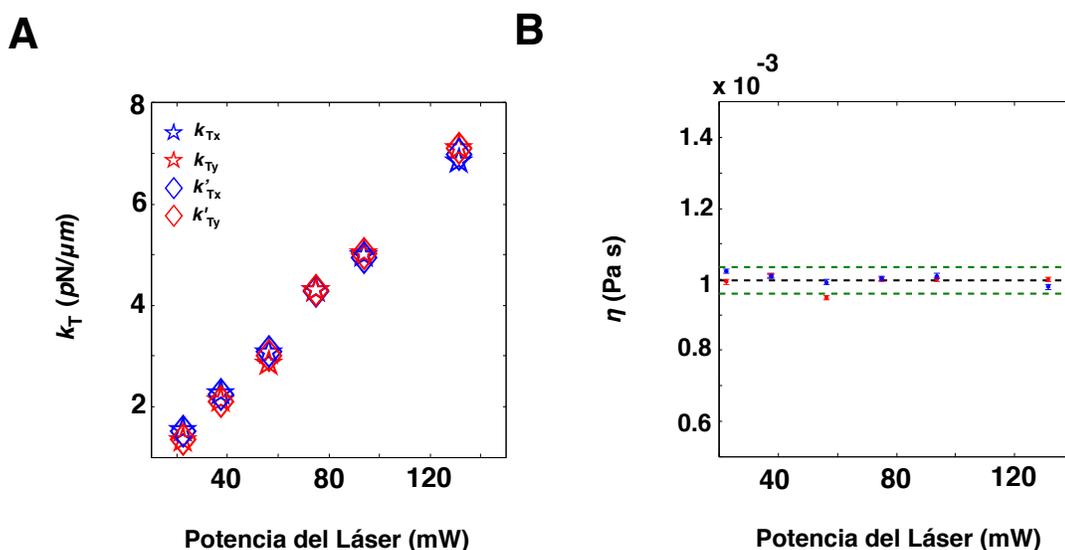


Figura 3.19: Comportamiento de la trampa para una partícula de sílica de $2\mu\text{m}$ de diámetro, inmersa en agua, a una temperatura ambiente de 300K y confinada a una distancia aproximada de $11,2\mu\text{m}$ de la superficie. A) Comparación entre la rigidez de la trampa k'_T y k_T determinadas a partir de las ecuaciones 3.2 y 3.5 respectivamente, utilizando los parámetros que se muestran en la figura 3.18. B) Valor de la viscosidad del medio determinado a partir de los parámetros que se muestran en la figura 3.18

Amplitud de las fluctuaciones en función del tamaño de la partícula

Una manera de entender el efecto de d , tamaño de la partícula, en la fuerza de confinamiento de la trampa, es analizar las fluctuaciones de las partículas. La figura 3.20A muestra el histograma de fluctuaciones Δx para dos partículas de distinto tamaño, confinadas con la misma potencia del láser (igual a $131,3\text{mW}$). La desviación estandar o en otras palabras, la amplitud de las fluctuacio-

nes ($\sqrt{\langle(\Delta x)^2\rangle}$) para $d = 1\mu\text{m}$ es igual a $24,7\text{nm}$ y aumenta a $27,8\text{nm}$ en el caso de $d = 2\mu\text{m}$, es decir, la trampa se comporta de manera menos rígida. Esto concuerda con el valor de la constante de atrapamiento k_T medida experimentalmente. La rigidez de la trampa para una partícula de $2\mu\text{m}$ de diámetro, confinada con $131,3\text{mW}$ es igual a $6,8 \pm 0,2\text{pN}/\mu\text{m}$ (ver figura 3.19), la que es menor que para una partícula de $1\mu\text{m}$ de diámetro, donde el valor de k_T láser es igual a $7,8 \pm 0,2\text{pN}/\mu\text{m}$ (ver figura 3.9A). Como se observa en la figura 3.20B, la amplitud de las fluctuaciones de una partícula de sílica disminuyen cuando la potencia del láser aumenta, sin importar el tamaño de esta (puntualmente los casos $d = 1$ y $d = 2\mu\text{m}$). Cabe señalar que para potencias sobre los 60mW las fluctuaciones para la partícula de mayor tamaño son más grandes en comparación a las fluctuaciones de la partícula de $1\mu\text{m}$ de diámetro. En la figura 3.20C se compara la dependencia entre la amplitud de las fluctuaciones con la rigidez de la trampa para las dos partículas. Si comparamos la figura 3.20B y 3.20C notamos que para una misma potencia del láser ($\approx 130\text{mW}$) la rigidez de la trampa para la partícula de mayor tamaño es menor por lo tanto la amplitud de las fluctuaciones son mayores. Esto concuerda con lo que se observa en la figura 3.20A. Por lo tanto que tan rígida es una trampa óptica, no sólo depende del índice de refracción del objeto a atrapar, si no también de su tamaño.

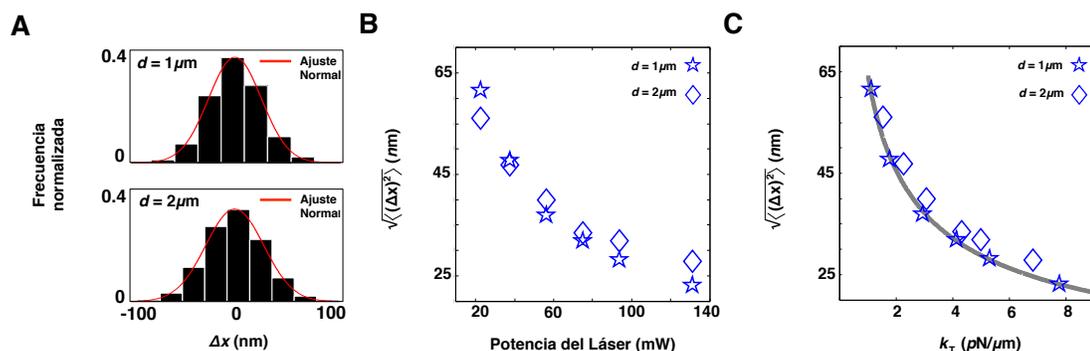


Figura 3.20: A) Histogramas de Δx para las partículas de sílica de distinto tamaño, confinadas con una potencia del láser igual a $131,3\text{ mW}$. B) Comparación de la amplitud de fluctuaciones para una partícula de $d = 1\mu\text{m}$ y $d = 2\mu\text{m}$ en función de la potencia del láser. C) Comparación de la amplitud de fluctuaciones para una partícula de $d = 1\mu\text{m}$ y $d = 2\mu\text{m}$ en función de la constante k_T determinada experimentalmente (ver figura 3.19A). La línea gris es la curva teórica sin parámetros de ajuste, para $T = 300\text{K}$.

Fuerza que ejerce la trampa (F_T) en función del tamaño de la partícula

En este punto, es importante mencionar que la rigidez de la trampa para una partícula de sílica no está relacionado directamente con la fuerza total máxima que ejerce la trampa, de hecho tal como se menciona al principio de esta sección, la fuerza de presión radiación ejercida sobre una partícula está relacionada con la cantidad de luz del láser que incide sobre la superficie de la

partícula (ver ecuación 2.1), mientras más grande sea la superficie, mayor será la fuerza aplicada. Esto también se puede entender de la ecuación 2.16.

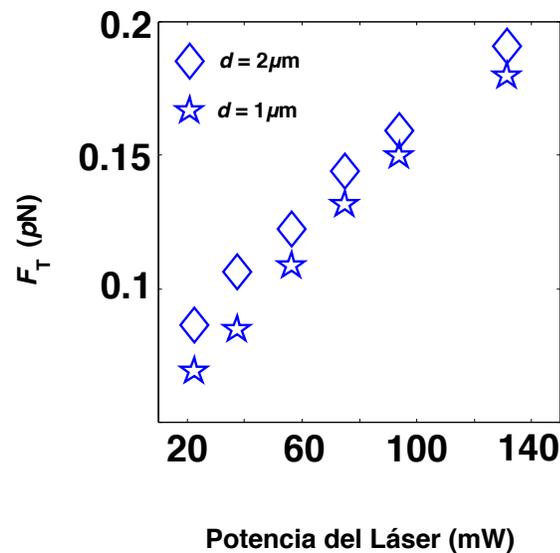


Figura 3.21: Componente x e y de la fuerza que ejerce la trampa sobre una partícula de sílica de $1 \mu\text{m}$ de diámetro inmersa en agua, a $T = 300 \text{ K}$ confinada aproximadamente a $11,2 \mu\text{m}$ de la superficie, en función de la potencia del láser. Cada punto representa el promedio de 10 mediciones.

Tal como nuestros resultados indican, para partículas de mayor tamaño ($r > \varpi$) la constante de rigidez k_T disminuye [37], sin embargo, las fluctuaciones aumentan, por lo tanto la fuerza de confinamiento no es necesariamente menor. En la figura 3.21 se puede observar que la fuerza que ejerce la trampa sobre una partícula de $2 \mu\text{m}$ de diámetro siempre es mayor que para la partícula de $1 \mu\text{m}$. Como la trampa se comporta menos rígida para la partícula de mayor tamaño, la amplitud de sus fluctuaciones son más grandes, es por eso que la pinza debe realizar una fuerza mayor para lograr confinarla. A pesar de esto, si observamos las ecuaciones 2.2 y 2.3, para una partícula de $1 \mu\text{m}$ de diámetro la fuerza requerida para escapar es menor que la fuerza de gradiente, sin embargo, para la partícula $d = 2 \mu\text{m}$ la fuerza de escape es tres órdenes de magnitud mayor que la fuerza gradiente.

3.4. Conclusiones

En este capítulo se ha mostrado una metodología para la caracterización y calibración del instrumento desarrollado en este trabajo de tesis.

A partir del proceso de calibración, se ha obtenido el valor de la rigidez de la trampa k_T y el factor de conversión A . De la caracterización del instrumento concluimos que la rigidez de la trampa, no es una constante, ni una característica intrínseca del instrumento, sino más bien, depende del sistema completo el cual incluye el objeto de estudio. Esto resulta ser una ventaja, ya que, es posible manipular el comportamiento de la trampa adecuándola a los requerimientos del experimento, tan sólo con escoger el tamaño de partícula correcto para el sistema a estudiar. Por ejemplo, para medir fuerzas mediante la utilización de pinzas ópticas, el tamaño óptimo de la partícula a escoger, para minimizar el error, debe cumplir que $r \approx \varpi$ [45]. Por otro lado, la fuerza de escape de la trampa aumenta con el tamaño de la partícula, por lo tanto para realizar experimentos que involucren tirar de algún objeto, el tamaño de la partícula debe ser escogido lo más grande posible. El factor de conversión A también depende del tamaño del objeto, por lo que la curva de calibración debe ser realizada antes de llevar a cabo cualquier medición. Hemos demostrado que las dos metodologías aplicadas para determinar el valor de la rigidez de la trampa; la primera, asumiendo la viscosidad del medio conocida y la segunda, utilizando sólo los parámetros obtenidos experimentalmente (f_c , D y A), son concordantes. Por lo tanto el método para hallar el factor de conversión es altamente confiable.

Un punto importante a destacar es la influencia de la potencia del láser sobre la amplitud de las fluctuaciones. Hemos visto que a medida que aumenta la potencia del láser la amplitud de fluctuaciones de una partícula de sílica disminuye. Por lo tanto, un láser de potencia variable permite cambiar de manera fácil de un modo experimental a otro. Es decir, podemos pasar de una trampa óptica con un gran poder de confinamiento, haciendo posible la manipulación de objetos, al régimen de baja potencia o trampa débil, dando acceso a la medición de las fluctuaciones térmicas que experimenta el sistema a estudiar.

Respecto la influencia del cubreobjeto en el comportamiento de la trampa, observamos que la frecuencia de corte y la constante de difusión se ven afectadas para distancias cercanas al radio de la partícula, es decir, el objeto debe encontrarse a una distancia $Z' > 4r$ de la superficie para que este efecto no sea un factor importante en las mediciones. Sin embargo, la constante de rigidez no se ve afectada. Para el caso de la fuerza de arrastre, se observó que su valor, para

distancias muy pequeñas respecto del cubreobjeto aumenta, no obstante sigue siendo del mismo orden.

Para finalizar, hemos determinado el valor experimental del coeficiente de difusión y la viscosidad del agua para partículas de distinto tamaño, valores que concuerdan con la literatura. Dado esto, podemos concluir que el instrumento ha sido correctamente alineado y que los resultados obtenidos tienen significado físico.

Capítulo 4

Propiedades mecánicas de neuritas

4.1. Introducción

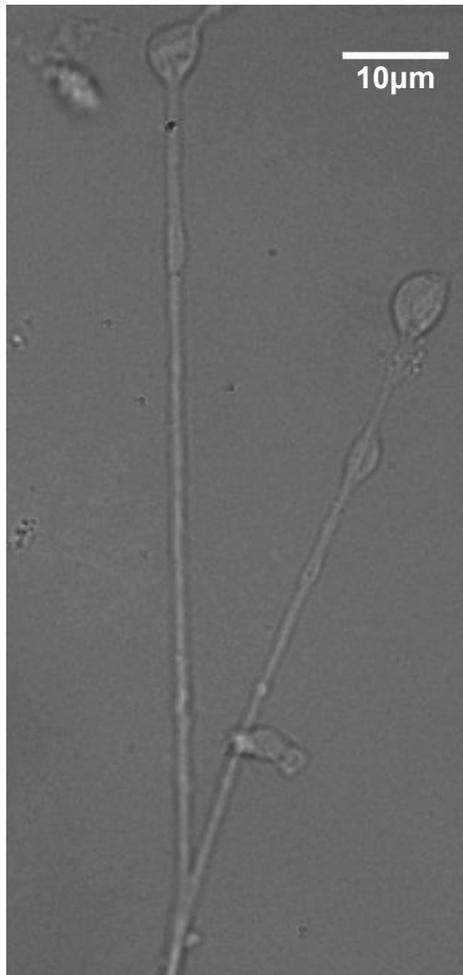
Como se mencionó al inicio de este trabajo, nuestro interés se centra en el desarrollo de nuevas metodologías que nos permitan medir, de manera no invasiva, las propiedades mecánicas relevantes de sistemas biológicos y más específicamente de neuritas. Hasta ahora, hemos descrito de manera general el problema de interés, y hemos desarrollado un instrumento capaz de proporcionar información cualitativa y cuantitativa por medio de las fluctuaciones del sistema. En este capítulo construiremos un modelo para describir las fluctuaciones de las neuritas, presentaremos los resultados experimentales obtenidos con nuestro instrumento y utilizaremos el modelo desarrollado para extraer información mecánica de las neuritas de células PC12 .

4.2. Células PC12, un modelo biológico simplificado de neuronas

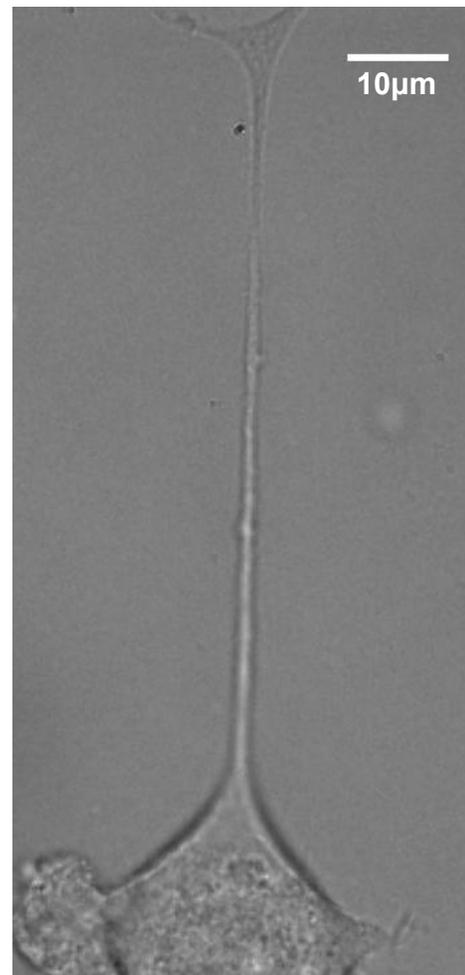
La línea celular PC12, fue obtenida originalmente del feocromocitoma, un tumor de la médula adrenal de ratas[46], por lo tanto no son neuronas propiamente tal. Sin embargo, luego de que estas células son expuestas a factores de crecimiento neuronal (NGF), adquieren un fenotipo muy parecido al de las neuronas del sistema nervioso simpático.

Las células PC12 expuestas a NGF detienen su división celular y se vuelven eléctricamente excitables, desarrollando procesos similares a los de una neurita [47]. Por esta razón las células PC12 han sido ampliamente utilizadas como un modelo biológico simplificado de neuronas. Esta línea celular, ha sido utilizada para el estudio de propiedades mecánicas y su respuesta frente a estímulos mecánicos externos [15–17]. De hecho, las prolongaciones de PC12 bajo fuerzas externas, responden de manera similar que las neuronas DRG (ver figura 4.1a). De estudios similares, se ha derivado el módulo de Young promedio de neuronas corticales de rata, módulo que es muy cercano al valor reportado para extensiones de células PC12 [16, 48].

Además, por ser una línea celular estable, las células PC12 son relativamente fáciles de mantener, su población es uniforme, en contraste con las neuronas de cultivos primarios, donde otros tipos de células pueden ser encontradas. Por estos motivos, hemos enfocado nuestro trabajo en el estudio mecánico de extensiones/protrusiones de células PC12. De las cuales, nos referiremos a neuritas.



(a) Imagen campo claro de una célula DRG



(b) Imagen campo claro de una célula PC12

Figura 4.1: Imágenes de campo claro, capturada con las pinzas ópticas. a) Cultivo de células DRG de dos días. b) Cultivo de células PC12 de dos días, expuestas a NGF.

4.3. Modelo físico: La neurita como una cuerda ideal

Como metáfora, protrusiones, neuritas e incluso axones, son geoméricamente similares a una cuerda de guitarra. El sonido que produce una cuerda depende de las características geométricas (radio y largo), tensión axial, rigidez de flexión (bending) y de las propiedades del medio que la rodea. Conocido estos parámetros, podemos predecir el sonido que una cuerda producirá [49]. A la inversa, si registramos el sonido generado por las vibraciones de la cuerda, podremos estimar sus propiedades mecánicas.

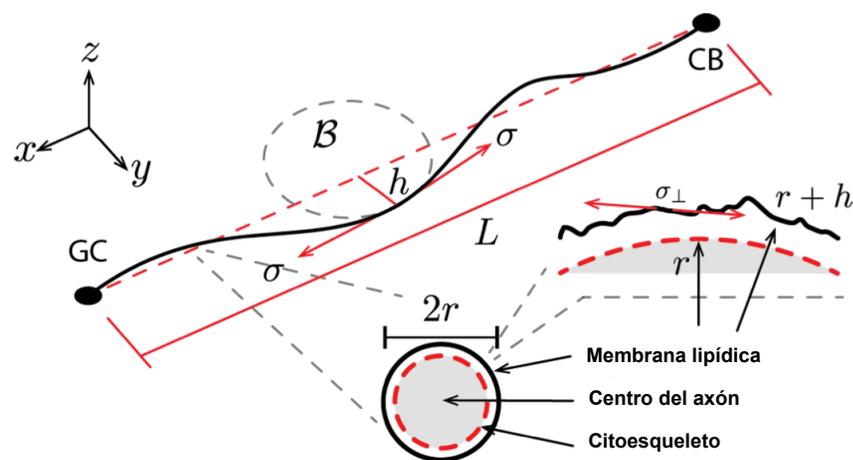


Figura 4.2: Vista esquemática de la cuerda de largo L y radio r , adherida al sustrato en sus extremos y fluctuando en torno a su posición de equilibrio. La amplitud de la fluctuaciones de la cuerda, en una posición determinada, está dada por $h(x, t)$. Análogamente para la neurita, los extremos fijos corresponden al cuerpo celular (CB) y el cono de crecimiento (GC). Los parámetros σ y B son la tensión axial y la rigidez de flexión respectivamente. La sección transversal muestra de manera simplificada las distintas partes que conforman un axón; el centro del axón, el citoesqueleto y la membrana lipídica de tensión σ_{\perp} y bending B_{\perp} (no representado en el esquema), la cual también contribuye a las fluctuaciones de la neurita.

Tomando esta idea como base, hemos desarrollado un modelo que describe el sistema biológico en estudio, el que nos servirá para interpretar y analizar cuantitativamente las fluctuaciones de las neuritas de células PC12. Nuestro modelo considera a la neurita como una cuerda que fluctúa en torno a su posición de equilibrio con extremos fijos. Análogo a la cuerda, los extremos fijos corresponden a los puntos de adhesión con el sustrato. Como primera aproximación consideramos que sólo hay dos puntos de adhesión: el cuerpo celular (CB) y el cono de crecimiento (GC) (ver figura 4.2).

En la figura 4.2 se muestra un esquema simplificado de una neurita de largo L y radio r , sometida a fluctuaciones térmicas. La amplitud de las fluctuaciones $h(x, t)$ depende de la tensión de la neurita, la rigidez de flexión, la tensión y bending de la membrana plasmática. Además, las fluctuaciones son amortiguadas por el fluido que la rodea y la disipación interna que resulta de la fricción entre los distintos componentes que conforman el citoesqueleto de la neurita [23].

Realizando el balance de fuerzas de los términos considerados en el modelo, se describe la dinámica de una cuerda de densidad lineal ρ_l , tensión axial σ , rigidez de flexión \mathcal{B} y fricción interna β , inmersa en un fluido con viscosidad dinámica η :

$$\rho_l \partial_t^2 h + \eta_e \partial_t h = \sigma \partial_x^2 h - \mathcal{B} \partial_x^4 h, \quad (4.1)$$

donde $\eta_e = 1/2(\eta/\sqrt{2\pi} + \beta)$ es la viscosidad efectiva [28]. Esta ecuación representa el balance de fuerzas sobre una cuerda, el cual considera la inercia, la disipación (interna y externa), el estiramiento y el doblamiento que experimenta.

Descomponiendo la amplitud $h(x, t)$ en q_j modos de Fourier, con amplitud h_{q_j} , vector de onda q_j y frecuencia angular Ω_j tenemos que: $h(x, t) = \sum_{q_j} h_{q_j} e^{i(q_j x - \Omega_j t)}$. Calculando todas las derivadas parciales y reemplazando en la ecuación 4.1 obtenemos que: $\sum_{q_j} | -\rho_l \Omega_j^2 - i\eta_e \Omega_j + \sigma q_j^2 + \mathcal{B} q_j^4 |^2 |h_{q_j}|^2 = 0$. De esta última expresión podemos determinar que, para satisfacer la ecuación diferencial, se debe cumplir que la relación de dispersión sea igual a cero, es decir $| -\rho_l \Omega_j^2 - i\eta_e \Omega_j + \sigma q_j^2 + \mathcal{B} q_j^4 |^2 = 0$.

Para el caso de número de Reynolds pequeño, podemos despreciar el término inercial $\rho_l \Omega_j^2$. Por otro lado, también podemos aproximar la contribución de la viscosidad η y la disipación interna β de la siguiente manera: La disipación del fluido que rodea la neurita por unidad de longitud es del orden de $\eta \approx 10^{-3}$ Pa·s, mientras que la viscosidad interna es significativamente mayor $\beta \approx 1,1$ Pa·s. Este último valor fue determinado a partir del seguimiento de vesículas individuales a lo largo de neuritas de células PC12 [18]. Dado que β es tres órdenes de magnitud mayor que η , este último puede ser despreciado. Por lo tanto, la viscosidad efectiva queda $\eta_e \sim \beta/2 \approx 0,55$ Pa·s. La expresión final para la relación de dispersión se reduce entonces a:

$$\Omega_j = \frac{\sigma q_j^2 + \mathcal{B} q_j^4}{i\eta_e} = \frac{\sigma q_j^2 + \mathcal{B} q_j^4}{i\beta/2} = -i\omega_j \quad (4.2)$$

Donde ω_j es la parte compleja de Ω_j . Por otro lado, en el límite de pequeños desplazamientos,

la energía elástica para estirar y/o doblar una neurita, en términos de la amplitud h , está descrito por el Hamiltoniano clásico de una cuerda elástica $E = \int (\frac{1}{2}\mathcal{B}(\nabla^2 h)^2 + \frac{1}{2}\sigma(\nabla h)^2) dl$. De manera análoga, descomponiendo $h(x)$ en modos de Fourier obtenemos que en el espacio de Fourier, en términos de los vectores de onda q_j , la energía asociada a cada modo de vibración, por el teorema de equipartición, debe ser igual a $k_B T/2$:

$$E_j = \frac{1}{2}|h_{q_j}|^2(\mathcal{B}q_j^4 + \sigma q_j^2)L = \frac{1}{2}k_B T \quad (4.3)$$

Debido al baño térmico todos los modos son excitados y cada modo q_j contribuye con una energía térmica igual a $k_B T/2$, donde k_B es la constante de Boltzmann ($k_B = 1,38065 \times 10^{-23}$ J/K) y T es la temperatura del medio. Luego la amplitud cuadrática de las fluctuaciones se escribe como:

$$|h_{q_j}|^2 = k_B T / (\mathcal{B}q_j^4 + \sigma q_j^2)L. \quad (4.4)$$

Así como los modos son excitados por el medio que rodea la neurita, también son amortiguados por este mismo. Por tanto, utilizando la función de autocorrelación del modo j se establece que, a tiempo t es: $\langle h_{q_j}(t)h_{q_j}(0) \rangle = |h_{q_j}|^2 e^{-\omega_j(q)t}$, donde $\omega(q)$ es la parte compleja de la relación de dispersión.

En el espacio de Fourier, la función de autocorrelación es igual a la densidad espectral de potencia (PSD). Por lo tanto, integrando todas las contribuciones de los modos j y utilizando la relación de dispersión 4.2, obtenemos una expresión teórica para la densidad espectral de potencia PSD :

$$PSD = \frac{L}{2\pi} \int_0^\infty \int_{-\infty}^\infty \left(\langle h_{q_j}(t)h_{q_j}(0) \rangle e^{i\omega t} dt \right) dq = \frac{L}{2\pi} \int_0^\infty |h_{q_j}|^2 \frac{2\omega(q)}{\omega(q)^2 + \omega^2} dq$$

$$PSD = \frac{\eta_e k_B T}{\pi} \int_0^\infty \frac{dq}{(\mathcal{B}q^4 + \sigma q^2)^2 + (\eta_e \omega)^2} \quad (4.5)$$

Sin embargo, este resultado está incompleto. El citoesqueleto de toda célula se encuentra cubierto por una membrana plasmática, la que también experimenta fluctuaciones térmicas. Por lo tanto, la amplitud de las fluctuaciones, $h(x, t)$, es una contribución de las fluctuaciones de la neurita ($h_a(t)$) y de la membrana ($h_s(t)$). Afortunadamente, estas dos cantidades no tienen correlación, por lo tanto los términos cruzados son iguales a cero.

Esto significa que sólo las correlaciones, de manera separada, contribuyen a la PSD total.

$$\begin{aligned}
 h(t) &= h_a(t) + h_\delta(t) \\
 \langle h(t)h(0) \rangle &= \langle (h_a(t) + h_\delta(t))(h_a(0) + h_\delta(0)) \rangle \\
 \langle h(t)h(0) \rangle &= \langle h_a(t)h_a(0) \rangle + \langle h_\delta(t)h_\delta(0) \rangle + \underbrace{\langle h_a(t)h_\delta(0) \rangle}_0 + \underbrace{\langle h_\delta(t)h_a(0) \rangle}_0 \\
 \langle h(t)h(0) \rangle &= \langle h_a(t)h_a(0) \rangle + \langle h_\delta(t)h_\delta(0) \rangle
 \end{aligned} \tag{4.6}$$

Entonces, una expresión más completa para la PSD , que toma en cuenta también las fluctuaciones de la membrana plasmática [28] de espesor δ , con tensión cortical σ_\perp y bending de membrana \mathcal{B}_\perp , se escribe como:

$$\begin{aligned}
 PSD^* &= PSD + PSD_\perp \\
 &= \frac{\eta_e k_B T}{\pi} \int_0^\infty \frac{dq}{(\mathcal{B}q^4 + \sigma q^2)^2 + (\eta_e \omega)^2} + \frac{4\eta_e^c k_B T}{\pi} \int_0^\infty \frac{dq}{(\mathcal{B}_\perp q^3 + \sigma_\perp q)^2 + (4\eta_e^c \omega)^2},
 \end{aligned} \tag{4.7}$$

donde PSD^* representa la densidad espectral de potencia total compuesta por PSD y PSD_\perp , que representan las potencias espectrales de las fluctuaciones de la neurita y de la membrana respectivamente [28]. El parámetro $n_e^c = 1/2(\eta + \eta_c)$ da cuenta de la viscosidad efectiva que amortigua las fluctuaciones de la membrana, la que esta compuesta por la viscosidad del medio externo η y la viscosidad interna del citosol η_c [28, 50].

La ecuación 4.7 representa las fluctuaciones laterales de la neurita, que en principio tiene una componente en x y en z . Debido al diseño del instrumento, sólo tenemos acceso a la componente x . Por otra parte, dada la geometría axial del problema, x y z son componentes ortogonales que, en principio, contienen la misma información para el análisis de fluctuaciones. Sin embargo, las fluctuaciones en z son suprimidas por la presencia del cubreobjeto.

La contribución de cada término de la PSD^* está limitada por las características biomecánicas y geométricas de la neurita. De hecho, el rango de vectores de onda (o modos q) se encuentra determinado por el largo L y radio r de la neurita. Así, el valor para q mínimo, que contribuye a la PSD^* , es del orden de $q_{min} \sim 1/L$. Por otro lado, el radio de la neurita fija el máximo valor para q del orden de $q_{max} \sim 1/r$. Estos dos límites están relacionados sólo con la tensión axial y la rigidez de flexión de la neurita. Para el caso de la membrana plasmática, el modo más bajo que contribuye, está relacionado con el perímetro de la membrana, esto es $q_{\perp min} \sim 1/r$ y el modo

más alto se encuentra asociado al el espesor de la membrana plasmática $q_{\perp max} \sim 1/\delta$.

4.3.1. Fluctuaciones térmicas de una neurita

Como se ha introducido en la sección 1.4, una neurita inmersa en un baño térmico se encuentra sometida a fuerzas térmicas por la presencia del fluido que la rodea. Su nombre se debe al hecho de que la amplitud de la fuerza es proporcional a la temperatura del fluido. El movimiento resultante de la neurita, producto de las colisiones con las moléculas del fluido que la rodea, es lo que llamamos movimiento térmico o fluctuaciones térmicas.

Para tener una idea clara del orden de magnitud de estas fluctuaciones, consideremos lo siguiente. La neurita puede ser idealizada como un material elástico, cuya constante elástica es k_a , la que se encuentra relacionada con la tensión axial y su largo de la siguiente manera: $k_a = \sigma/L$. Utilizando el teorema de equipartición, es posible estimar la amplitud de las fluctuaciones térmicas que sufre una neurita. La energía de un material elástico está dada por $k_a \Delta x^2/2$ que debe ser igual a $k_B T/2$, entonces deducimos que:

$$\langle h^2 \rangle = \frac{k_B T}{k_a} = \frac{k_B T}{\sigma} L, \quad (4.8)$$

considerando el largo característico para neuritas de células PC12 ($L = 100 \mu\text{m}$), la tensión promedio reportada en la literatura ($\sigma = 1 \text{ nN}$) [16], y utilizando la ecuación 4.8, observamos que el valor teórico estimado para la amplitud de las fluctuaciones, que debiese experimentar una neurita, es del orden de $\sqrt{\langle h^2 \rangle} \sim 20 \text{ nm}$. Dado que métodos convencionales de microscopía como campo claro, contraste de fase o microscopía de desenfoque, en combinación con técnicas de análisis de imágenes, pueden detectar fluctuaciones sobre los 10 nm , estas carecen de la resolución espacial necesaria para acceder al espectro de fluctuaciones. Por lo tanto, para medir fluctuaciones por debajo de los 10 nm se requiere de una técnica con alta resolución espacial y temporal, característica que presentan las pinzas ópticas desarrolladas en este trabajo.

4.4. Materiales y métodos

4.4.1. Aplicación de las pinzas ópticas en su régimen de baja potencia

La metodología utilizada para medir las fluctuaciones transversales de una neurita, presentada previamente en la sección 2.3.3, es el régimen de baja potencia de nuestro instrumento. En pocas palabras, la amplitud de las fluctuaciones de la neurita, h , cambian el camino óptico del haz refractado a través de ella, estos cambios de posición son registrados por el detector QPD el cual entrega la señal S_Y . La variable de interés es h , representa la amplitud de las fluctuaciones de la neurita, medida desde el centro de la trampa al borde de la neurita, esta variable se encuentra representada en las figuras 4.2, y 4.4. Sin embargo, lo que el detector mide directamente es S_Y . La señal S_Y y la variable h están relacionadas mediante la ecuación $h(t) = AS_Y(t)$, donde A es el factor de conversión que se obtiene de forma previa, a partir de la curva de calibración para una neurita (ver figura 4.5A). De los experimentos observamos que, incluso en su potencia máxima, la fuerza que realiza la trampa es incapaz de confinar la neurita, por lo tanto la pinza se comporta como sensor y no como trampa. De esta manera el instrumento da acceso a las fluctuaciones naturales experimentadas por una neurita inmersa en un baño térmico.

Sin embargo, a pesar de que la trampa es incapaz de atrapar la neurita, para evitar cualquier perturbación al sistema de estudio, el láser se utiliza a la potencia más baja que logre ser detectada por el QPD. Esta potencia es igual a $37mW$. Recordemos que esta es la potencia que indica el controlador y no la potencia en la zona de la muestra. Un cálculo aproximado para estimar la potencia que llega a la neurita, es considerar todos los elementos ópticos que intervienen en el camino óptico del láser y el porcentaje de transmisión de cada uno de ellos. Para un total de 8 elementos, cada uno con un 90% de transmisión, el porcentaje final de luz que llega a la zona de trampa es aproximadamente el 43% de la potencia inicial, esto es $\approx 16mW$.

4.4.2. Montaje experimental para medir la amplitud de las fluctuaciones

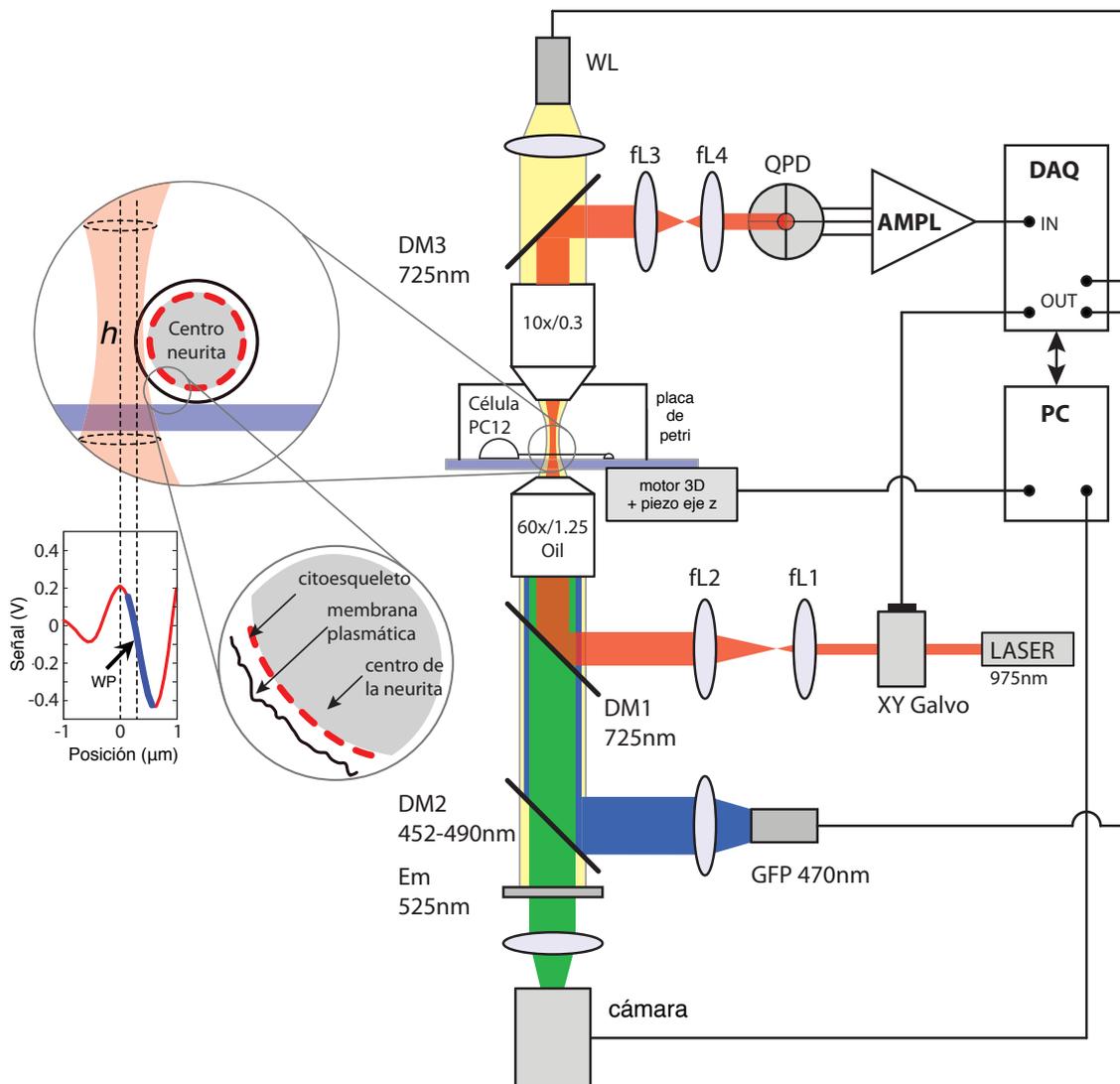


Figura 4.3: Diseño del arreglo experimental. Las neuritas de PC12 son visualizadas con una lámpara de luz blanca (WL) ubicada en la parte superior del arreglo óptico, obteniendo una imagen de transmisión de campo claro. El láser infrarrojo altamente enfocado es ubicado cerca del borde de la neurita. La luz deflectada por el borde es detectada por el sensor QPD. Posteriormente la señal es amplificada y registrada por la tarjeta de adquisición DAQ. La imagen insertada muestra la curva de calibración de la neurita (curva roja), el factor de conversión es la pendiente de la recta azul. La *PSD* es calculada en tiempo real para descartar errores experimentales. Adicionalmente, se utiliza la lámpara ubicada en la parte inferior del arreglo óptico, con la que podemos obtener imágenes de fluorescencia de las muestras.

Para realizar las mediciones, utilizamos las pinzas ópticas desarrolladas en el laboratorio. La figura 4.3 muestra el diseño experimental aplicado a una neurita. Un diodo láser infrarrojo (PL980P330J Thorlabs), de longitud de onda $\lambda = 975\text{nm}$ y potencia variable (potencia máxima

330mW), se utiliza como sensor y se fija a una potencia muy baja (37mW). El haz es reflejado por un par de espejos galvanométricos (XY Galvo) y expandido al pasar a través de un arreglo óptico de dos lentes acromáticos fL1 y fL2 separados por una distancia equivalente a la suma de sus distancias focales iguales a 15mm y 150mm respectivamente, formando así un sistema de expansión kepleriano. Luego, el haz es reflejado por un espejo dicroico (DM1 725nm) y dirigido al objetivo de microscopio de gran apertura numérica $60\times / \text{Oil}(NA = 1,25)$. Al pasar por el objetivo, el láser es enfocado en el plano focal. La muestra, que contiene las células PC12, se encuentra en un soporte (porta muestra) cuyas posiciones x, y y z son controladas por la plataforma de posicionamiento (Thorlabs motor x : z625B, motor y : MTS25/M-Z8, piezo z : PE4, con sus controladores TDC001, TDC001 y TPZ001 respectivamente). La posición z de la muestra se hace coincidir con el plano focal. Luego de interactuar con la neurita, la luz es colectada por un objetivo condensador $10\times / (NA = 0,3)$ y dirigida a un espejo dicroico (DM3 725nm) el cual refleja los rayos del láser a un arreglo óptico de dos lentes fL3 y fL4, de distancias focales 50mm y 35mm respectivamente. El haz colimado es dirigido al foto detector de cuatro cuadrantes QPD (PDQ80-A Thorlabs 400 – 1050nm). La señal que entrega el detector QPD es amplificada por un factor 9, por un amplificador de bajo ruido y posteriormente la señal es registrada con una tarjeta de adquisición (National Instruments NI USB-6211). Para la visualización de las neuritas se utiliza una lámpara WL colimada mediante la lente fL7, cuya distancia focal es igual a 35mm. El resultado es una imagen de campo claro la cual es capturada por una cámara CCD (PixeLINK PL-B778G).

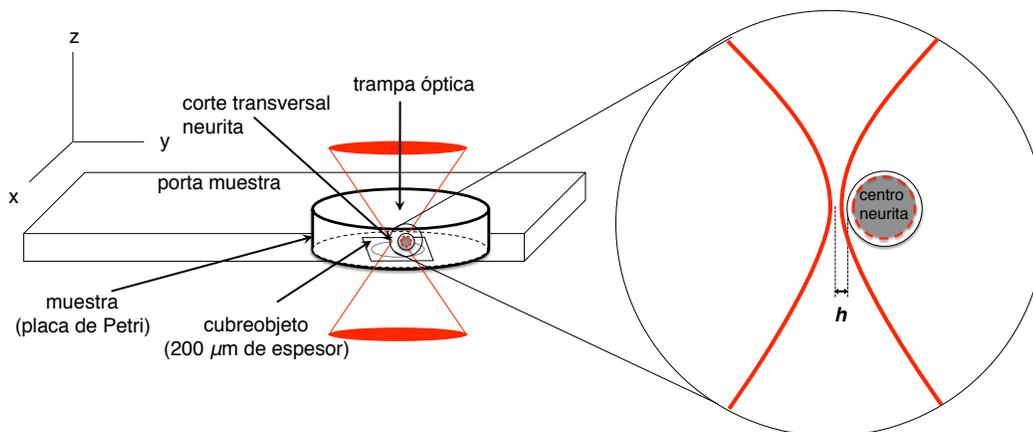


Figura 4.4: Esquema del porta muestra y cámara (placa de petri) que contiene las preparación de neuritas. Se presenta la variable h .

4.4.3. Medición de la amplitud de fluctuaciones de una neurita

Para llevar a cabo las mediciones de la amplitud de fluctuación de una neurita, se utiliza el montaje experimental descrito en la sección 4.4.2. Antes de iniciar el experimento, lo primero es alinear la neurita seleccionada con el eje x , de esta manera nos aseguramos que sólo se miden las contribuciones de las fluctuaciones en y y no una proyección de este eje. De hecho en esta configuración la neurita no experimenta fluctuaciones a lo largo del eje x (ver esquema 4.2). El siguiente paso es encender el láser, y fijarlo a una potencia baja, pero que logre ser detectado por la cámara removiendo el filtro infrarrojo ($\approx 37mW$). Luego se debe posicionar el láser al borde de la neurita. En realidad, el láser no se mueve, es la neurita la que se posiciona cerca del láser utilizando el control sobre la plataforma del instrumento (ver figura 4.3 motor 3D). Como primera aproximación, la neurita es trasladada hasta que se visualiza el haz al borde de la neurita. Para el posicionamiento preciso del haz es necesario realizar una curva de calibración o barrido con el láser.

El borde de la neurita es posicionado finalmente en el centro del régimen lineal, llamado punto de trabajo (WP, figura 4.3). La señal que entrega el detector QPD es procesada para calcular la PSD experimental en tiempo real (el registro final de la señal es el promedio de 10 mediciones consecutivas sobre la misma neurita, de 10s cada una, a una frecuencia de muestreo de 80kHz). La señal es convertida a unidades de longitud, mediante el factor de conversión que se obtiene previamente de la curva de calibración.

Para asegurarnos que las mediciones se realizan siempre al borde de la neurita durante todo el experimento, es necesario realizar un barrido antes de cada medición. Para garantizar que el láser no introduce artefactos en las mediciones, se registra la PSD para distintas potencias del láser. Sin embargo, como mostraremos más adelante, no se encontró ninguna dependencia de la potencia aplicada en la amplitud de las fluctuaciones. Por lo tanto la potencia del láser utilizada no influye las mediciones.

4.4.4. Curva de calibración para la neurita

El factor de conversión A se obtiene a partir de la curva de calibración (Ver figura 4.5A). La curva de calibración es la respuesta del detector cuando una neurita se mueve a través del láser mediante el uso de la plataforma. Esta curva muestra un régimen lineal, cuya pendiente (m),

permite convertir la señal entregada por el detector en unidades de voltaje a la posición de la neurita en unidades de longitud. Por lo tanto A está dado por:

$$A = 1/m, \quad (4.9)$$

donde m es la pendiente de la recta que se ajusta al régimen lineal central del barrido (línea segmentada color rojo de la figura 4.5). La posición del haz enfocado al momento de realizar el barrido debe ser la misma que al momento de medir las fluctuaciones transversales de la neurita.

La curva de calibración es utilizada también para posicionar el haz al borde de la neurita. El haz es posicionado en el punto de trabajo (WP), el centro del régimen lineal.

4.4.5. Cultivo celular y preparación de muestras

Los protocolos para el cultivo celular de neuritas y la preparación de las muestras se explican detalladamente en el anexo A sección A.1.2 y en la sección A.1.3 respectivamente. En pocas palabras, las células PC12 son cultivadas usando medio DMEM (gibco ref. 12430), 6% de suero de caballo (gibco ref. 16050), 6% de suero fetal bovino (gibco ref. 10437) y 1% de antibiótico antimicótico (gibco ref. 15240). Las neuritas son obtenidas resemebrando las células, a una concentración de 10000 células/mL, en un cubreobjetos recubierto por colágeno ($50\mu\text{g/mL}$, gibco ref. A10644) y cultivándolas en su medio de diferenciación. Después de tres días de cultivo bajo estas condiciones, las neuritas de PC12 alcanzan longitudes entre los 100 a $200\mu\text{m}$ de largo.

4.4.6. Colección y análisis de datos

El cultivo y crecimiento de neuritas es realizado cada semana. Los datos experimentales son colectados de dos a tres neuritas por semana, durante un tiempo de seis meses, lo que lleva a un total de cuarenta neuritas para el análisis de datos. La razón principal para este procedimiento, es para asegurar que las condiciones experimentales sean equivalentes para todas las neuritas. Cada experimento, desde la preparación inicial, incluyendo el posicionamiento de la muestra en el arreglo experimental, toma aproximadamente dos horas. Con la finalidad de asegurarnos de la reproducibilidad de la PSD , cada medición es realizada diez veces por cada neurita, obteniendo un tiempo típico de 100s de adquisición de datos.

El análisis de los datos se realiza utilizando el programa Matlab (The MathWorks, Natick, MA), que permite calcular los valores medios, las desviaciones estándar y determinar el valor de la PSD (usando la función FFT). Para obtener información sobre las propiedades mecánicas a partir de las mediciones experimentales, la PSD es presentada de forma logarítmica. Esta transformación nos permite determinar la ley de potencia (a) y el valor para la amplitud (10^m) usando el ajuste lineal, $\log_{10} PSD = a \log_{10} f + m$, esto reduce el error computacional para determinar el exponente de cada régimen de fluctuaciones de las neuritas (ver figura 4.6).

4.5. Resultados

4.5.1. Curva de calibración

La figura 4.5 muestra la curva de calibración típica para una neurita de $2,4 \pm 0,1 \mu\text{m}$ de diámetro, inmersa en su medio de cultivo que se encuentra posicionada al borde del haz. El barrido es realizado con el láser de longitud de onda $\lambda = 975 \text{nm}$ y una potencia de $37,5 \text{mW}$.

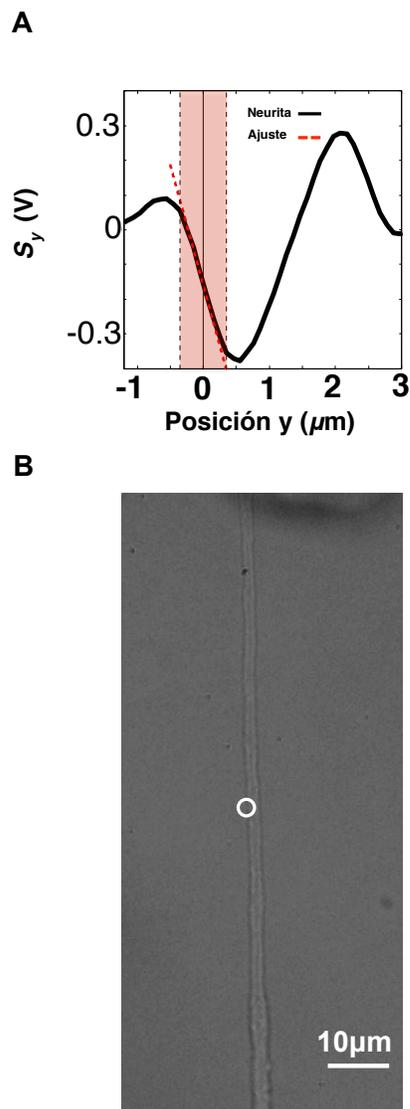


Figura 4.5: A) Curva de calibración para la neurita mostrada en la figura 4.5(B), la cual se encuentra al borde del haz. La curva negra es la señal S_y entregada por el detector QPD y la línea segmentada roja, es la recta que se ajusta al régimen lineal (sombreado en rojo). B) Imagen de una neurita de $2,4 \pm 0,1 \mu\text{m}$ de diámetro, inmersa en su medio de cultivo y adherida en dos puntos (CB y GC) a la superficie del cubreobjeto. El círculo blanco representa la posición del haz, la cual coincide con el borde de la neurita.

La curva en negro es la respuesta del detector (S_Y) a medida que la partícula se desplaza a través del foco en dirección del eje y en sentido positivo con un paso de $0.1\mu\text{m}$. La línea segmentada roja es la recta que se ajusta a la región lineal central (sombreada en rojo). A partir de este ajuste se determina el valor para el coeficiente de conversión. El valor m , para este caso en particular, es igual a $-0,7 \pm 0,1\text{V}/\mu\text{m}$ por lo tanto, para este caso, el valor del factor es igual a $1,5 \pm 0,1\mu\text{m}/\text{V}$. Entre las posiciones $0,5\mu\text{m}$ y $2\mu\text{m}$ se observa un segundo régimen lineal, cuyo punto central corresponde al centro de la neurita.

4.5.2. Espectro de fluctuaciones de neuritas

La amplitud de las fluctuaciones transversales que experimenta una neurita de una célula PC12, inmersa en su medio de cultivo, a una temperatura ambiente de 300K , son del orden de $\sqrt{\langle h^2 \rangle} = 10\text{nm}$ para neuritas con baja tensión axial. Para neuritas más tensas, la amplitud promedio se reduce hasta los $\sqrt{\langle h^2 \rangle} = 1\text{nm}$.

La figura 4.6A muestra las fluctuaciones transversales h , que experimenta la neurita en el tiempo, con un valor promedio de la amplitud de fluctuaciones de $\sqrt{\langle h^2 \rangle} = 9,5\text{nm}$ y una desviación estándar de $0,2\text{nm}$ (con un factor de conversión $A = 1,5 \pm 0,1\mu\text{m}/\text{V}$).

En la figura 4.6B se observa la PSD experimental, determinada a partir de la señal h mostrada en 4.6A. Del espectro de fluctuaciones podemos distinguir cuatro regímenes o leyes de potencia en rangos de frecuencia bien determinados. Para calcular la ley de potencia de exponente α , y el valor de la amplitud de un régimen en particular, 10^m , se ajusta la ecuación $\log_{10} PSD = \alpha \log_{10} f + m$ en cada rango de frecuencia en la PSD_h experimental.

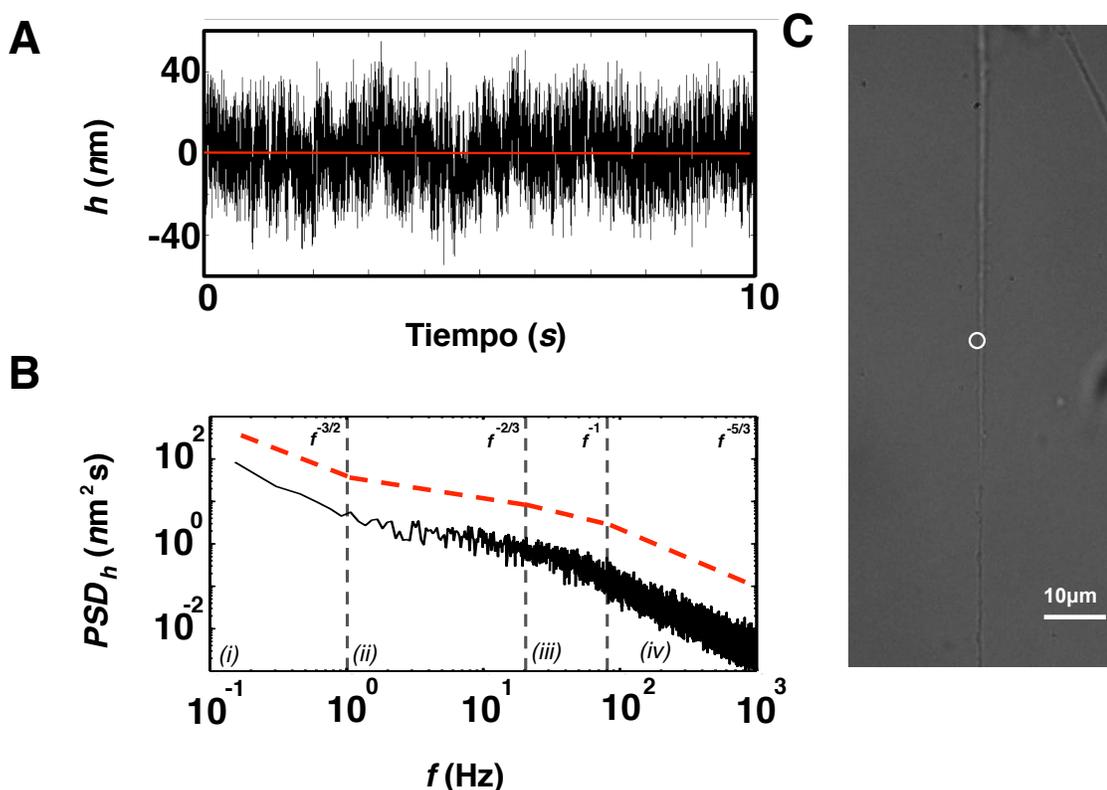


Figura 4.6: A) Señal ya calibrada que entrega el detector, representa la amplitud de las fluctuaciones que experimenta la neurita mostrada en C. La señal es medida en la posición marcada por el círculo blanco, con una frecuencia de adquisición de 80kHz, durante un tiempo de 10s, con un láser de $\lambda = 975nm$ y a una potencia igual a $37,5mW$. B) Densidad espectral de potencia para la neurita mostrada en C, determinada a partir de la señal h que se muestra en A. La PSD_h es el promedio de 10 mediciones consecutivas, durante un tiempo de 10s cada una. Las líneas segmentadas rojas muestran los cuatro regímenes que se identifican, con frecuencias de corte a los 1, 20 y 90Hz aproximadamente. C) Imagen de una neurita de una célula PC12, de $1,5\mu m$ de diámetro, inmersa en su medio de cultivo, a una temperatura ambiente de 300K. El círculo blanco representa la posición del láser.

Para obtener el exponente de la ley de potencia para el régimen a bajas frecuencias, se debe ajustar la ecuación en la PSD_h entre 0 y 1Hz, para el segundo régimen el rango de ajuste es entre 1 y 20Hz, para el tercer régimen, ajustamos los 20 y 70Hz y finalmente para altas frecuencias el rango va desde los 70 hasta los 1000Hz. Estas frecuencias de corte no son fijas, por lo que son analizadas para cada una de las neuritas. Los valores experimentales obtenidos se muestran en la tabla 4.1, donde el rango presenta las frecuencias de corte experimentales, mínima y máxima, para cada régimen. Las frecuencias de corte experimentales se obtienen a partir de la intersección entre las rectas de ajuste.

Régimen	Rango (Hz)	Ley de potencia, a	Amplitud, 10^m
(i)	{0,1, 1}	$-1,5 \pm 0,3$	$10^{m_\sigma} = 4,8 \pm 0,2$
(ii)	{1, 20}	$-0,7 \pm 0,3$	$10^{m_\sigma} = 4,5 \pm 0,3$
(iii)	{20, 70}	$-1,0 \pm 0,6$	$10^{m_{\sigma_\perp}} = 13,2 \pm 0,2$
(iv)	{70, 10^3 }	$-1,7 \pm 0,1$	$10^{m_{\mathcal{E}_\perp}} = 220,8 \pm 0,5$

Cuadro 4.1: Resumen de los parámetros experimentales obtenidos a partir del ajuste de la ecuación $\log_{10} PSD = a \log_{10} f + m$ en la PSD_h experimental para la neurita mostrada en la figura 4.6.

Comparación del espectro de fluctuaciones: Neurita vs. partícula de sílica vs. ruido de fondo

En la figura 4.7 se compara la respuesta espectral de una partícula de sílica de $1\mu\text{m}$ de diámetro, inmersa en agua a una temperatura de 300K (curva roja). La densidad espectral de potencia para este caso se encuentra descrita por la ecuación 2.28, la que describe un espectro proporcional a $1/f^2$ a altas frecuencias. Sin embargo, para el caso de las neuritas, mostrada en la figura 4.7 se observa un comportamiento totalmente distinto (curva negra). Al mismo tiempo, la señal del ruido de fondo es aproximadamente 20 veces menor que las fluctuaciones de las neuritas a baja frecuencia.

Esta comparación nos sirve de referencia para establecer dos puntos. El espectro de fluctuaciones de las neuritas difiere de estos dos casos (partícula y ruido de fondo). Y, aún cuando las fluctuaciones de las neuritas son pequeñas, comparativamente hablando, el instrumento es lo suficientemente sensible para diferenciarlas del ruido de fondo.

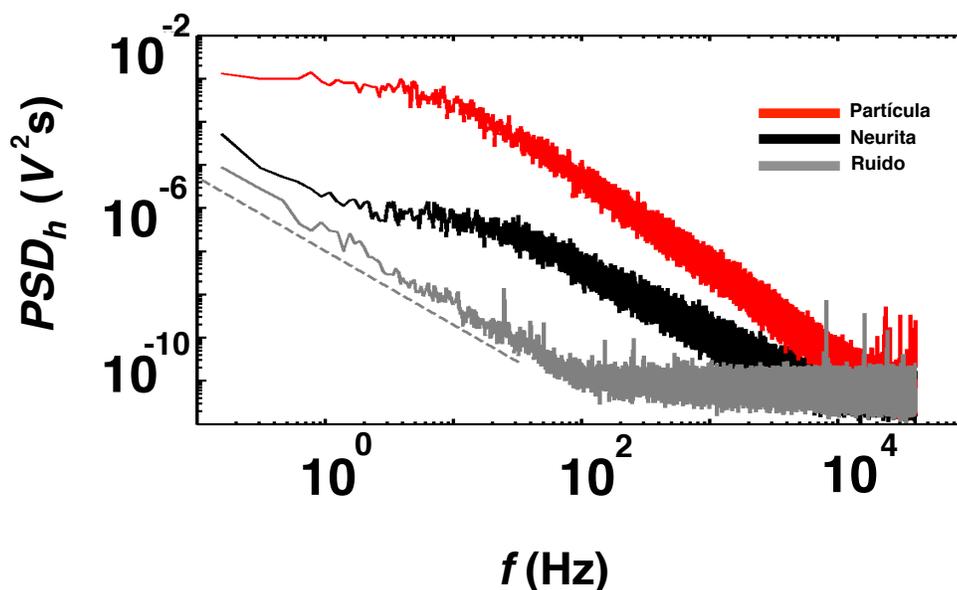


Figura 4.7: Comparación experimental de la respuesta espectral de una partícula de sílica de $1\mu\text{m}$ de diámetro (color roja) versus la PSD de la neurita mostrada en la figura 4.6C (color negra), con el ruido de fondo (color gris). La línea segmentada color gris, es una recta cuya ley de potencia es igual a $-1,7 \pm 0,1$. Las tres curvas corresponden a las señales de la coordenada x , que fueron obtenidas con un láser de $\lambda = 974\text{ nm}$ a una potencia igual a $37,5\text{ mW}$.

4.5.3. Influencia de la potencia del láser

Como se mencionó anteriormente (ver 4.4.1), las mediciones son realizadas en el régimen de baja potencia para no influir en la medición de las fluctuaciones que experimenta la neurita. Es decir, se debe mantener una potencia baja para no suprimir los modos de fluctuación de las neuritas.

En la figura 4.8A se muestra la dependencia que existe entre la amplitud de las fluctuaciones y la potencia del láser para partículas de sílica de 1 y $2\mu\text{m}$ de diámetro, inmersas en agua a una temperatura de 300K . Del capítulo 3, vimos que las fluctuaciones de las partículas dependen de la potencia del láser y su amplitud disminuye considerablemente a medida que la potencia aumenta. Para el caso de las neuritas, vemos que el promedio de la amplitud de las fluctuaciones no varía significativamente y tampoco presenta una tendencia en el rango de potencia explorado. El valor promedio de las fluctuaciones de las neuritas es igual a $10,3\text{nm}$ y una desviación estandar $0,6\text{nm}$. La línea segmentada color gris representa el promedio y las de color rojo el intervalo de confianza

de las mediciones.

En la figura 4.8B se muestra el espectro de fluctuaciones de una neurita de aproximadamente $2\mu\text{m}$ de diámetro, para dos potencias del láser diferentes. Se observa que la *PSD* tampoco tiene variaciones significativas. Sin embargo, lo que si cambia es el ruido de fondo del instrumento a altas frecuencias ($f > 10^4\text{Hz}$). En efecto, dado que la detección de las fluctuaciones es realizada por un fotodiodo, el ruido electrónico se encuentra determinado por el ruido de disparo (Shot-noise), cuya amplitud es inversamente proporcional a la intensidad de luz detectada por el sensor.

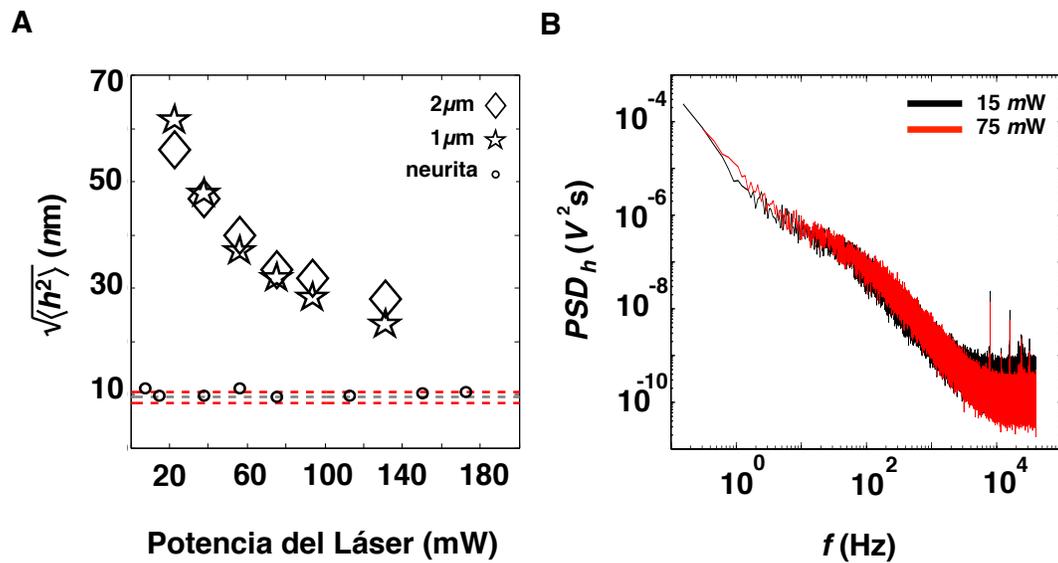


Figura 4.8: A) Comparación de la amplitud de las fluctuaciones de una neurita y partículas de sílica en función de la potencia del láser. B) Espectro de fluctuaciones de una neurita para dos potencias del láser distintas.

4.6. Discusión

Para entender el significado físico de las leyes de potencia que se observan experimentalmente en la densidad espectral de potencia, analizaremos el modelo teórico desarrollado al inicio de este capítulo, el cual describe la mecánica de las neuritas.

4.6.1. Bajas frecuencias, tensión axial σ

A bajas frecuencias, la tensión axial domina sobre cualquier otro efecto. Si asumimos que la relación de dispersión (ecuación 4.2) sólo depende de σ , entonces la parte compleja de la relación de dispersión queda reducida a $\omega \approx (\sigma/\eta_e)q^2$. Dado que las características geométricas (largo L y radio r) de la neurita determinan las frecuencias de corte. Podemos entonces aproximarlas a $f_{\sigma}^{min} \approx (\sigma/2\pi\eta_e)q_{min}^2 \sim 10^{-3}\text{Hz}$ y $f_{\sigma}^{max} \approx (\sigma/2\pi\eta_e)q_{max}^2 \sim 10\text{Hz}$ (con $q_{min} \sim 1/L$ y $q_{max} \sim 1/r$). En este límite la expresión de la potencia espectral (ecuación 4.7) puede ser resuelta analíticamente:

$$PSD_{\sigma}^{teo} \approx \frac{k_B T}{\sqrt{8\eta_e\sigma}\omega^{3/2}} = \frac{k_B T}{\sqrt{2^6\pi^3\eta_e\sigma}} \frac{1}{f^{3/2}} \quad (4.10)$$

Esta predicción es comparable con la ley de potencia experimental encontrada para las neuritas a bajas frecuencias (ver tabla 4.1 y figura 4.10). Comparando la ecuación de ajuste $\log_{10} PSD = a \log_{10} f + m_{\sigma}$ con la expresión teórica 4.10, vemos que el coeficiente $10^{m_{\sigma}}$ es igual a $k_B T / \sqrt{2^6\pi^3\eta_e\sigma}$. Por ejemplo, para la neurita mostrada en 4.6C, $10^{m_{\sigma}} = 4,8 \pm 0,2 \text{nm}^2 \text{Hz}^{1/2}$ (ver tabla 4.1). Asumiendo que la disipación interna es del orden de $\eta_e \approx \beta/2 = 0,55 \text{Pa}\cdot\text{s}$ [15,24], es posible obtener σ . El valor experimental encontrado para la tensión de la neurita mostrada en la figura 4.6C, es igual a $\sigma = 0,7 \pm 0,1 \text{nN}$ que es coherente con lo reportado en las referencias [14, 16].

4.6.2. Segundo régimen, rigidez de flexión \mathcal{B}

Si ahora asumimos que el efecto dominante es la constante de rigidez de flexión de la neurita, la parte compleja de la relación de dispersión (ecuación 4.2) queda reducida a $\omega \approx (\mathcal{B}/\eta_e)q^4$.

Para tener un valor estimado de la constante de flexión, \mathcal{B} , consideremos lo siguiente. Para

una barra de radio r , su constante longitudinal elástica está descrita por $\kappa = ES_n/L$ y la rigidez de flexión $\kappa LS_n/2\pi$, donde E es el módulo de Young, S_n es el área transversal y L es el largo de la neurita. Usando valores reportados de la elasticidad de neuritas $E \approx 10\text{kPa}$ [11, 19], un área típica de $S \approx 1\mu\text{m}^2$ y un largo promedio igual a $L \approx 100\mu\text{m}$, el valor estimado para la constante de doblamiento es $\mathcal{B} \approx 10^{-20}\text{Nm}^2 \approx 10n\text{N}\mu\text{m}^2$. Como comparación, la rigidez de flexión para los microtúbulos se encuentra entre los $0,2 - 2 \times 10^{-23} \text{Nm}^2$ [30,31] y $7 \times 10^{-26} \text{Nm}^2$ para los filamentos de actina [31]. Por lo tanto la constante de doblamiento efectiva para la neurita proviene del ordenamiento entre las distintas componentes que conforman el citoesqueleto.

Utilizando esta estimación, las frecuencias de corte teóricas asociadas a este régimen son $f_B^{min} \approx (\mathcal{B}/2\pi\eta_e)q_{min}^4 \sim 10^{-5} \text{Hz}$ y $f_B^{max} \approx (\mathcal{B}/2\pi\eta_e)q_{max}^4 \sim 10^3 \text{Hz}$ (ver figura 4.6B(ii)). Sin embargo, experimentalmente, en el régimen de bajas frecuencias $\{10^{-4}, 1\}\text{Hz}$, la contribución de \mathcal{B} es apantallada por la tensión de la neurita. A partir de la ecuación 4.7 es posible obtener una expresión teórica para éste régimen:

$$PSD_B^{teo} \approx \frac{\text{csc}(\pi/8)k_B T}{16 \times 2^{3/4} \mathcal{B}^{1/4} \eta_e^{3/4} \pi^{7/4}} \frac{1}{f^{7/4}} \quad (4.11)$$

A pesar de que en la figura 4.6B(ii) un segundo régimen es observado, la ley de potencia experimental difiere de la que predice la ecuación 4.11 (ver tabla 4.1), por lo que requeriremos de un análisis más detallado para describir este régimen.

4.6.3. Régimen dominado por la tensión de membrana σ_{\perp}

Entre 10 y 50Hz un tercer régimen es identificado, este efecto adicional puede ser explicado por las fluctuaciones de la membrana plasmática de la neurita, las cuales también contribuyen a la PSD , tal como predice nuestro modelo (ver ecuación 4.7). De la figura 4.6 se observa experimentalmente que el régimen asociado a la rigidez de flexión se encuentra apantallado por este tercer régimen para frecuencias mayores que 100Hz.

Se debe mencionar que este régimen no comparte los mismos vectores de onda (q_{min} y q_{max}) que en los dos casos anteriores. Para la membrana plasmática, el vector de onda mínimo está asociado con el perímetro de la neurita de la forma $q_{min} = 1/2\pi r$ y el vector de onda máximo está asociado con el espesor de la membrana $q_{max} = 1/\delta$. La relación de dispersión para una

membrana está dada por [28]:

$$\omega = \frac{\mathcal{B}_\perp q^3 + \sigma_\perp q}{4\eta_e^c} \quad (4.12)$$

Realizando de forma análoga el análisis anterior, supondremos que en el tercer régimen domina la tensión de membrana σ_\perp . Por lo tanto la relación de dispersión de la membrana (ecuación 4.12) puede ser aproximada a $\omega = (\sigma_\perp/4\eta_e^c)q$, donde $\eta_e^c = (\eta_c + \eta)/2 \approx 8 \times 10^{-2} \text{Pa}\cdot\text{s}$. Utilizando valores típicos para la tensión de membrana $\sigma_\perp \approx 30 \text{ pN}/\mu\text{m}$, obtenidos mediante microaspiración de glóbulos rojos [51, 52], las frecuencias de corte estimadas para este régimen son $f_\perp^{min} \approx (\sigma_\perp)/8\pi\eta_e^c q_{min} \sim 20 \text{ Hz}$ y $f_\perp^{max} \approx (\sigma_\perp)/8\pi\eta_e^c q_{max} \sim 10^3 \text{ Hz}$. Dado las frecuencias de corte para cada régimen, podemos predecir que existe un apantallamiento de las fluctuaciones de flexión de la neurita por parte de las fluctuaciones membrana. Luego, suponiendo que sólo contribuye la membrana, y que el efecto dominante es la tensión de esta, σ_\perp , la expresión teórica para la *PSD* (ecuación 4.7) queda reducida a:

$$PSD_{\sigma_\perp}^{teo} \approx \frac{k_B T}{2\sigma_\perp \omega} = \frac{k_B T}{4\pi\sigma_\perp f} \quad (4.13)$$

cuyo coeficiente sólo depende de la tensión de la membrana plasmática. Podemos ver que la ley de potencia teórica coincide con la obtenida experimentalmente para el tercer régimen (ver tabla 4.1 Tercer régimen). Por lo tanto, podemos decir que el tercer régimen se encuentra dominado por la tensión de membrana. Comparando la ecuación de ajuste, $\log_{10} PSD = a \log_{10} f + m_\sigma$, con la expresión teórica 4.13 vemos que 10^{m_σ} corresponde a $k_B T/(4\pi\sigma_\perp)$, con un valor de $10^{m_\sigma} = 13,2 \pm 0,2 \text{ nN}^2$ para la neurita de la figura 4.6 (ver tabla 4.1). Despejando σ_\perp de esta última expresión, el valor experimental encontrado para la tensión de membrana de la neurita mostrada en 4.6 es igual a $\sigma_\perp \approx 25,0 \pm 3,1 \text{ pN}/\mu\text{m}$.

4.6.4. Altas frecuencias, bending de membrana \mathcal{B}_\perp

A altas frecuencias, de la figura 4.6B un cuarto régimen es identificado. Siguiendo el mismo procedimiento que para el régimen anterior, vamos a suponer que ahora el término dominante es el bending de la membrana \mathcal{B}_\perp . Por lo tanto la relación de dispersión (ecuación 4.12) puede ser aproximada a $\omega = (\mathcal{B}_\perp/4\eta_e^c)q^3$. Utilizando valores típicos del bending de membrana [28], $\mathcal{B}_\perp \approx 2,8 \times 10^{-19} \text{ J}$, determinados a partir de pinzas ópticas, las frecuencias de corte estimadas para este régimen son $f_\perp^{min} \approx (\mathcal{B}_\perp/8\pi\eta_e^c)q_{min}^3 \sim 0,1 \text{ Hz}$ y $f_\perp^{max} \approx (\mathcal{B}_\perp/8\pi\eta_e^c)q_{max}^3 \sim 10^{11} \text{ Hz}$. Dada las frecuencias de corte, podemos predecir que existe una constante competencia entre este

efecto y los efectos anteriores. Luego, suponiendo que sólo contribuye el bending de membrana, la expresión teórica para la PSD (4.7) queda reducida a:

$$PSD_{\mathcal{B}_{\perp}}^{teo} \approx \frac{k_B T}{3(\mathcal{B}_{\perp}(4\eta_e^c)^2)^{1/3}\omega^{5/3}} = \frac{k_B T}{3(\mathcal{B}_{\perp}(4\eta_e^c)^2)^{1/3}(2\pi)^{5/3}} \frac{1}{f^{5/3}} \quad (4.14)$$

con un coeficiente que sólo depende de la flexión de membrana. Podemos ver que la ley de potencia teórica coincide con la obtenida experimentalmente para el cuarto régimen (ver tabla 4.1 Altas frecuencias). Por lo tanto, podemos decir, que el cuarto régimen está dominado por el bending de membrana. Comparando la ecuación que se ajusta $\log_{10} PSD = a \log_{10} f + m_{\sigma}$ con la expresión teórica 4.14 vemos que $10^{m_{\mathcal{B}_{\perp}}} = k_B T / 3(\mathcal{B}_{\perp}(4\eta_e^c)^2)^{1/3}(2\pi)^{5/3}$. Para la neurita de la figura 4.6C, $10^{m_{\mathcal{B}_{\perp}}} = 220,8 \pm 0,5 \text{ nm}^2 \text{ Hz}^{2/3}$ (ver tabla 4.1). Despejando \mathcal{B}_{\perp} de esta última expresión, el valor experimental encontrado para el bending de membrana de la neurita mostrada en 4.6 es igual a $\mathcal{B}_{\perp} \approx (2,4 \pm 0,7 \times 10^{-2}) \times 10^{-19} \text{ J}$.

4.6.5. Comparación propiedades mecánicas entre neuritas

La tabla 4.2 resume las propiedades mecánicas de dos neuritas diferentes. En relación a la geometría, la neurita A tiene un radio menor que la neurita B, y cualitativamente, más larga que la neurita B. De los resultados se observa que existe una anticorrelación entre las fluctuaciones y las propiedades mecánicas. Por ejemplo, la neurita A experimenta fluctuaciones mayores que la neurita B, esto concuerda con los valores obtenidos para la tensión de axón. Una mayor tensión en la “cuerda” conlleva a una cuerda que fluctúa menos. Además, la rigidez de flexión es mayor para la neurita B, esto resulta lógico, ya que tiene un diámetro mayor. Recordemos que el área transversal de las neuritas está relacionado con la cantidad de neurofilamentos en su interior, por lo tanto un radio mayor significa un mayor número de filamentos intermedios, lo que da como resultado una neurita más rígida [53],[54]. Respecto a la tensión de membrana, sabemos que está relacionada con el acoplamiento entre el citoesqueleto y la membrana mediante las proteínas motoras o de entrecruzamiento. Una neurita con mayor tensión de membrana es el reflejo de que presenta un mayor acoplamiento [28]. Las frecuencias de corte también son diferentes para cada neurita, ya que dependen de su geometría, pero también de la mecánica y aspectos biológicos de la neurita. Por ejemplo, el largo de la neurita es controlado por el balance de fuerza generado en el citoesqueleto y el cono de crecimiento. Los filamentos intermedios son responsable del diámetros y la viscosidad interna de la neurita, mientras los microtúbulos, filamentos de actina y motores

moleculares controlan la elasticidad, la flexión y la tensión de la neurita. Por lo tanto la PSD para una neurita individual depende de cada uno de estos factores.

	neurita A	neurita B
$d \mu\text{m}$	1,5	2,3
$\sqrt{\langle h^2 \rangle} \text{ nm}$	$9,5 \pm 0,2$	$7,4 \pm 0,2$
Rango (i) Hz	{0, 1}	{0, 4}
Rango (ii) Hz	{1, 10}	{4, 50}
Rango (iii) Hz	{10, 70}	{50, 160}
Rango (iv) Hz	{70, 10^3 }	{160, 10^3 }
$\sigma \text{ nN}$	$\approx 0,7 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,2$
$\sigma_{\perp} \text{ pN}/\mu\text{m}$	$\approx 25,0 \pm 3,1$	$96,7 \pm 26,2$
$\mathcal{B}_{\perp} \times 10^{-19} \text{ J}$	$\approx 2,4 \pm 0,7 \times 10^{-2}$	$94,4 \pm 0,5 \times 10^{-2}$

Cuadro 4.2: Resumen comparativo para las neuritas de la figura 4.9

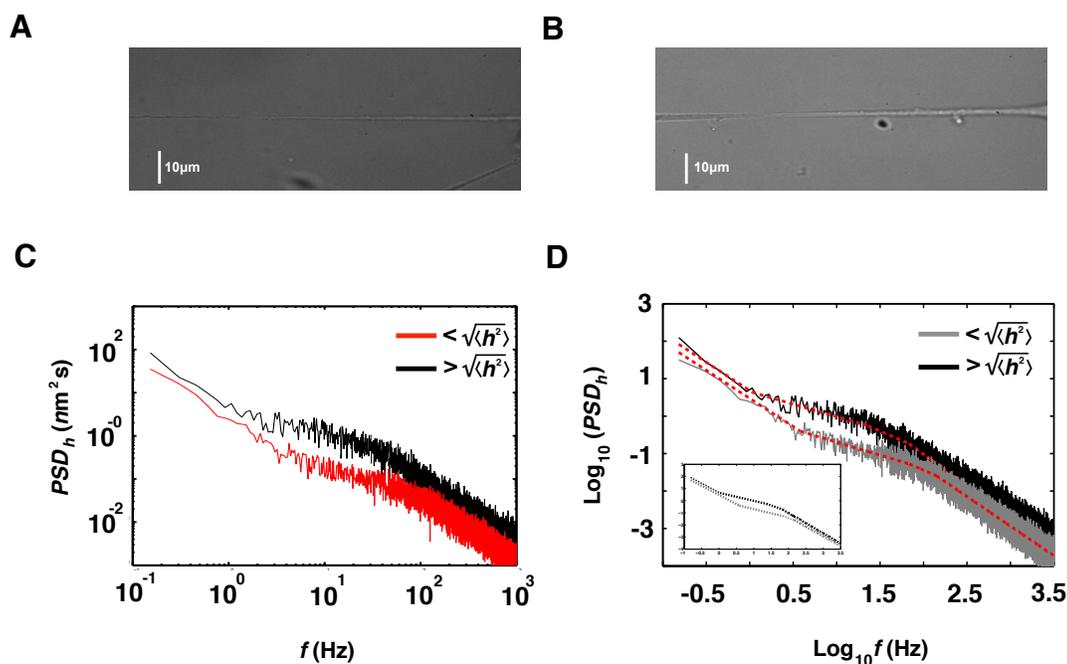


Figura 4.9: C) Figura comparativa para el espectro de fluctuaciones de dos neuritas distintas. La PSD color negra corresponde a la neurita mostrada en A y la PSD color roja de la neurita B. La neurita en A tiene una mayor amplitud de fluctuaciones que la neurita B (ver tabla 4.2). D) Logaritmo de la PSD en función del logaritmo de la frecuencia para las dos neuritas distintas. El color negro representa la neurita mostrada en A y el color gris corresponde a la neurita mostrada en B. Las líneas segmentadas color rojas son la recta $\log_{10} PSD = a \log_{10} f + m$ respectiva a cada régimen. El recuadro muestra sólo las rectas ajustadas. Ambas PSD fueron obtenidas utilizando una potencia igual a $37,5 \text{ mW}$ y representan el promedio de 10 mediciones.

4.6.6. Valores medios y dispersión estadística

Los cuatro regímenes, obtenidos experimentalmente, se encuentran bien definidos para distintas neuritas de células PC12. En la figura 4.10 se resumen los resultados obtenidos para un total de 40 experimentos realizados en un periodo de seis meses. Los paneles A, B, C y D de la figura 4.10 muestran la distribución de probabilidad para la ley de potencia de cada régimen. Por ejemplo, el régimen dominado por la tensión axial (σ), cuya ley de potencia teórica es igual a $a = 3/2$, muestra una ley de potencia igual a $a = 1,5 \pm 0,3$ (ver figura 4.10A). Mientras que el régimen dominado por la rigidez de flexión de la neurita (β), muestra una ley de potencia experimental igual a $a = 0,7 \pm 0,1$ (ver figura 4.10B). En el caso del régimen dominado por la tensión de membrana (σ_{\perp}) ambas leyes de potencias, la teórica y la experimental, están en completa concordancia, con un valor experimental igual a $a = 1,0 \pm 0,3 \times 10^{-2}$. Finalmente, el régimen dominado por el bending de membrana (β_{\perp}), cuya ley de potencia teórica es igual a $a = 5/3$, presenta una ley de potencia experimental igual a $a = 1,6 \pm 0,1$.

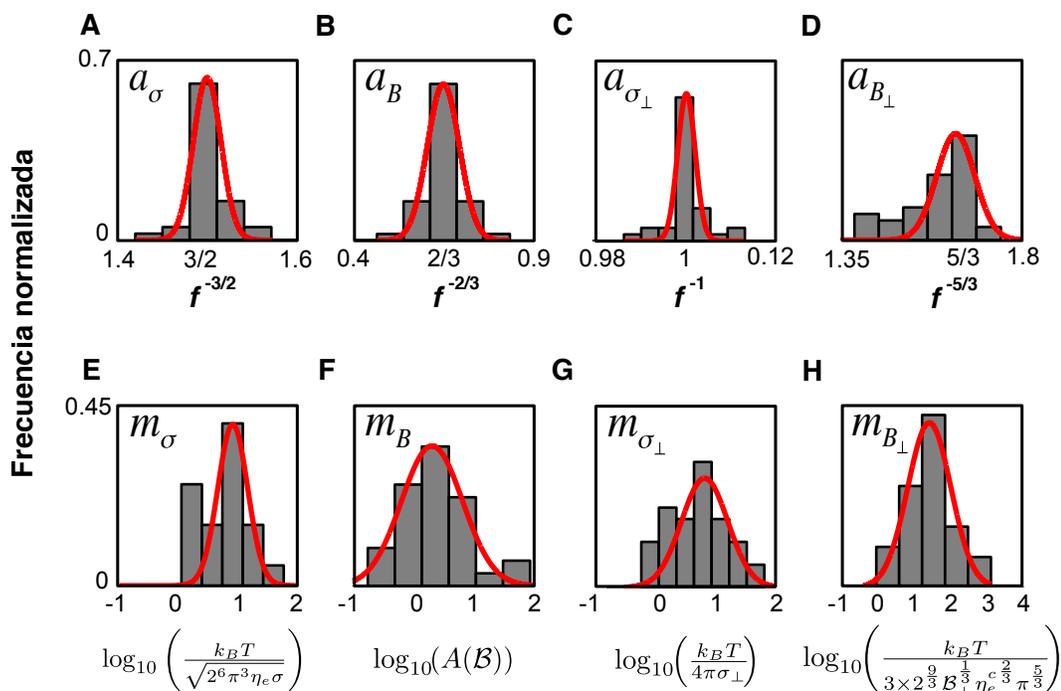


Figura 4.10: Distribución de probabilidad para los parámetros experimentales obtenidos a partir del ajuste $\log_{10} PSD = a \log_{10} f + m$. A, B, C y D muestran los histogramas para las ley de potencia a del régimen para bajas frecuencias, segundo régimen, tercer régimen y régimen a altas frecuencias respectivamente. Los paneles E, F, G y H son los histogramas para la amplitud m para cada régimen. Las neuritas incluidas en el análisis suman un total de 40, de las cuales todas presentan los cuatro regímenes.

Por otro lado, el valor de la amplitud que acompaña cada ley de potencia, presenta una distribución mucho más ancha. En los paneles E, F, G y H de la figura 4.10 se muestran la amplitud calculada para cada régimen, los cuales presentan una distribución normal. El valor medio y la desviación estándar asociada al parámetro m para el régimen a bajas frecuencias es $\langle m_{\sigma} \rangle = 0,8$ y $S_{\sigma}^m = 0,5$ respectivamente. Para el régimen de rigidez de flexión tenemos que $\langle m_B \rangle = 0,4$ y $S_B^m = 0,6$, para el régimen dominado por la tensión de membrana $\langle m_{\sigma_{\perp}} \rangle = 0,7$ y $S_{\sigma_{\perp}}^m = 0,5$ y finalmente para el régimen de altas frecuencias $\langle m_{B_{\perp}} \rangle = 1,9$ y $S_{B_{\perp}}^m = 0,4$.

Estos valores medios y sus respectivas desviaciones estándar, conducen a neuritas con tensión axial en el rango de los 4×10^{-2} a los $3,3nN$ (rango que incluye el 68% de las neuritas), y un valor promedio igual a $0,4nN$. En el caso de la tensión de membrana plasmática, el rango es entre los 20 y $200pN/\mu m$ y un valor promedio igual a $65,9pN/\mu m$, el cual se encuentra en el rango de tensión de membrana de glóbulos rojos. Por último, el modulo de bending de membrana para las neuritas estudiadas, se encuentra en el rango entre $3,0 \times 10^{-19}$ y los $1,3 \times 10^{-16}J$ con un valor promedio igual a $61,1 \times 10^{-19}$. Sin embargo, para el régimen dominado por la rigidez de flexión, no es posible extraer información, ya que la ley de potencia teórica no concuerda con la experimental.

4.7. Conclusiones

En este capítulo hemos mostrado que, mediante la técnica de espectroscopía de fluctuaciones extendida a neuritas, es posible obtener los aspectos principales que describen sus propiedades mecánicas. Mediante nuestro modelo y el uso de las pinzas ópticas, en su régimen de baja potencia, hemos cuantificado las propiedades mecánicas de relevancia biológica, de manera simultánea y más importante aún, de una manera no invasiva. Este último punto es destacable, ya que cualquier otro tipo de medición que provoque alguna fuerza externa sobre la neurita, puede inducir cambios en su arquitectura o función celular. Los resultados muestran que el espectro de fluctuaciones de una neurita presenta cuatro regímenes. Cada régimen se encuentra dominado por alguno de los parámetros mecánicos. Tal como se muestra en la figura 4.11.

Los valores para la tensión axial, bending y tensión de membrana fueron encontrados en el rango de los nano Newton, décimas de ato Joules y décimas de pico Newton, respectivamente. Estos resultados son concordantes con valores promedios o efectivos reportados en la literatura. Con una diferencia crítica, nuestros experimentos se realizan de manera no intrusiva en unos cuantos segundos vs. experimentos invasivos cuyo tiempo característico mayor a 100 segundos.[14, 16, 28, 51, 52].

A bajas frecuencias, domina la tensión axial, con una PSD , tanto experimental como teórica, proporcional a $f^{-3/2}$. Si sólo consideráramos la neurita (sin membrana plasmática), observaríamos sólo dos regímenes. El primero dominado por la tensión axial y el segundo régimen dominado por la rigidez de flexión (\mathcal{B}), cuya ley de potencia teórica es $7/4$.

Experimentalmente, la ley de potencia del segundo régimen, $PSD_{\mathcal{B}}^{exp} \propto f^{-2/3}$, no coincide con la ley de potencia teórica para la rigidez de flexión, $PSD_{\mathcal{B}}^{teo} \propto f^{-7/4}$, de las neuritas de células PC12. Por lo que no podemos determinar el valor de la rigidez de flexión. Esto se debe principalmente a que, en esta región de frecuencias, la contribución de la rigidez de flexión (\mathcal{B}) es opacada por las contribuciones de la tensión axial (σ) y por el espectro de fluctuaciones para la membrana (σ_{\perp} y \mathcal{B}_{\perp}).

En cuanto al tercer régimen, este se encuentra dominado por la tensión de membrana (σ_{\perp}) con una amplitud, en la densidad espectral de potencia, que no depende de la viscosidad diámica del citosol ni de la viscosidad del medio externo. Sin embargo, el rango de frecuencias, donde la tensión de membrana es dominante, se encuentra apantallado a bajas frecuencias por la tensión

axial, y a altas frecuencias por el bending de membrana.

El cuarto régimen, corresponde al bending de la membrana plasmática (B_{\perp}), con una *PSD*, experimental y teórica, proporcional a $f^{-5/3}$. Esta ley de potencia ha sido modelada como un caso especial entre la interacción de la membrana plasmática y la corteza celular. En el modelo desarrollado por Ricard Alert y Pierre Sens [50], se muestra el cambio en la ley de potencia en la *PSD* debido a una interacción de membrana-corteza. El primer caso corresponde a una *PSD* dominada por el bending de membrana, con una *PSD* proporcional a $f^{-5/3}$ como el mostrado, experimental y teóricamente, aquí. Y el segundo caso, corresponde a una *PSD* dominada por el adhesión de la membrana a la corteza celular, con una *PSD* proporcional a f^{-2} . Sin embargo, este último caso nunca fue observado bajo nuestros parámetros experimentales.

Por cuanto la densidad espectral de potencia, es el resultado de la contribución de todos estos elementos.

Un punto a destacar, es que a pesar de que las neuritas estudiadas muestran características geométricas muy similares, como su radio y largo, la amplitud que acompaña a cada ley de potencia en la *PSD* tiene una distribución ancha. Ciertamente, incluso en el caso de dos neuritas idénticas en términos de su geometría, ambas provienen de células diferentes, por lo que no hay razón alguna para esperar que ambas neuritas presenten los mismos parámetros mecánicos. En términos de la actividad biológica y la distribución de las proteínas que conforman el citoesqueleto, estas son dos neuritas distintas. Por esta razón, es notable que la técnica de espectroscopía de fluctuaciones extendida a neuritas, sea capaz de diferenciar neuritas cuasi idénticas.

Sin embargo, aún se requiere un conjunto de experimentos con el fin de modificar, de manera controlada, los parámetros mecánicos y cuantificar estos cambios mediante el análisis de la densidad espectral de potencia. Por ejemplo, una forma efectiva de aumentar la tensión axial de la neurita, es fijarlas con paraformaldehído, de esta manera podríamos verificar si el método es capaz de detectar el aumento en la tensión axial. Por otro lado, podemos causar un aumento o disminución en la tensión de membrana, inhibiendo o promoviendo la fosforilación de las proteínas que median la adhesión entre la corteza y la membrana celular.

Finalmente, el potencial de la espectroscopía de fluctuaciones y su extensión natural a escenarios más complejos, abre una puerta para el estudio de la respuesta de sistemas biológicos modelo frente a estímulos bioquímicos. Y más importante aún, cuantificar en tiempo real los cambios inducidos por estos estímulos.

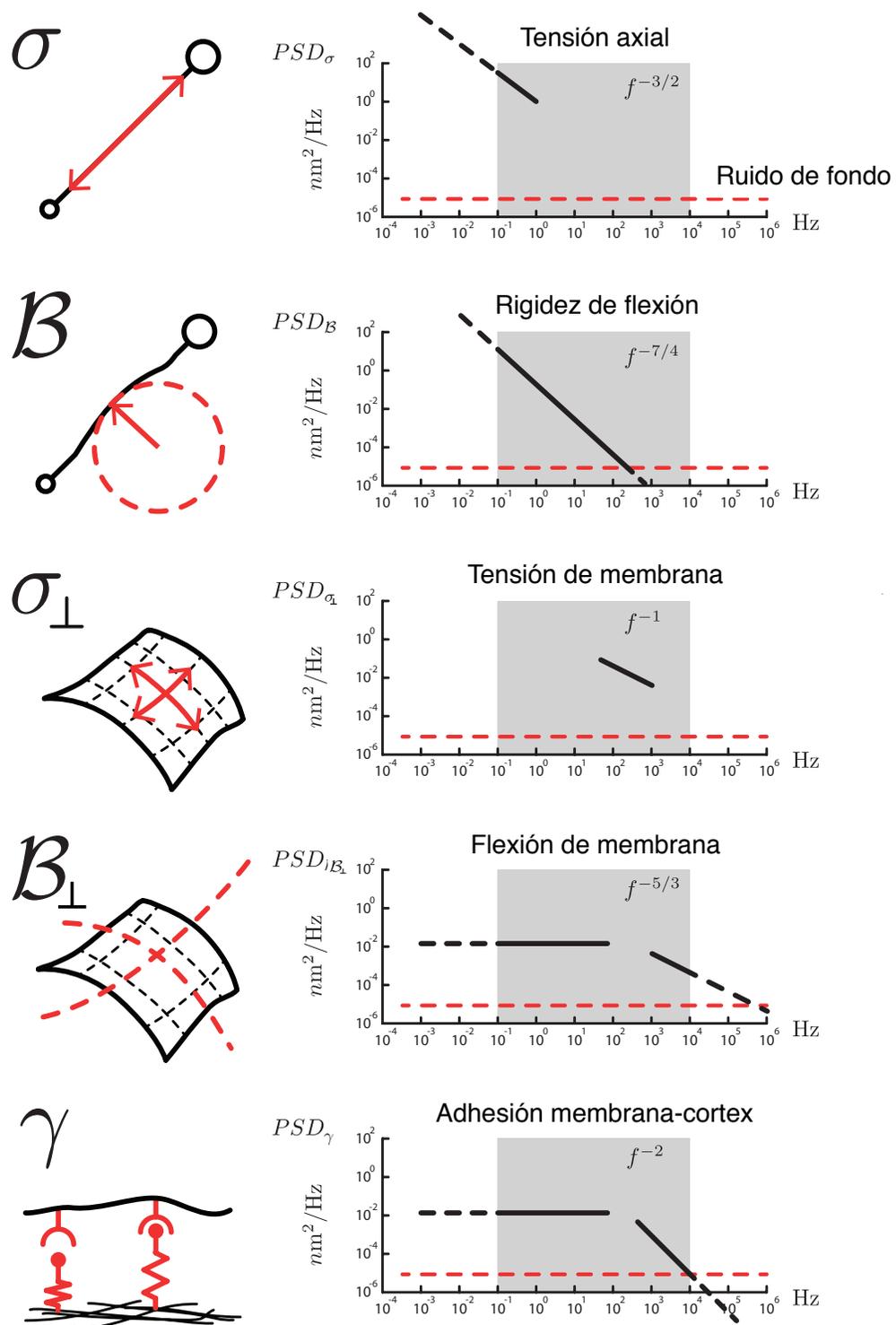


Figura 4.11: Figura que muestra la contribución de los diferentes efectos para cada uno de los cuatro regímenes. El último régimen presentado en este diagrama, el cual considera la interacción membrana-corteza, denotado por γ , representa el acoplamiento elástico de la membrana plasmática al citoesqueleto. Esta última contribución no ha sido considerada en nuestro modelo.

Capítulo 5

Perspectivas y resultados preliminares

5.1. Introducción

Las características mecánicas de las neuritas dependen de los cambios dinámicos que toman lugar en la célula. Por ejemplo, se sabe que la tensión mecánica a lo largo de la neurita depende de la actividad de los motores moleculares presentes en el citoesqueleto, los cuales regulan la elongación o contracción de la neurita, modulando así la tensión en el tiempo [14, 16]. La tensión y el bending de membrana dependen fuertemente del acoplamiento entre la membrana y la corteza celular, el cual puede ser modificado por la activación o inhibición de la fosforilación de las proteínas que median la adhesión [55]. Además, el transporte axonal lento modifica las concentraciones locales de las componentes que conforman el citoesqueleto, alterando la elasticidad, la rigidez de flexión y la viscosidad interna, mediante la presencia de unidades monoméricas que forman los neurofilamentos presentes en la neurita [53, 54].

Los cambios estructurales pueden ser inducidos por medio de perturbaciones biofísicas, como por ejemplo, la aplicación de fuerzas que provoquen el estiramiento o la contracción de la célula [56–58] o mediante estímulos bioquímicos, como la utilización de drogas que promuevan la polimerización o depolimerización de los distintos filamentos que conforman el citoesqueleto [11, 15], o simplemente bloqueando la actividad de los motores moleculares.

Células expuestas a Latrunculin-A, sufren la disociación de sus filamentos mediante diferentes mecanismos [1]. Esta droga inhibe la polimerización de los filamentos de F-actina, uniéndose al terminal positivo del filamento, y bloqueando así la adición de nuevas subunidades de G-actina [1].

Muchos son los trabajos que caracterizan cuantitativamente las propiedades mecánicas de las células, ya sea perturbando físicamente el sistema en estudio o mediante estímulos bioquímicos. Sin embargo, un instrumento híbrido que combine pinzas ópticas con alguna técnica de visualización como la microscopía de fluorescencia, tiene la ventaja de entregar simultáneamente información cuantitativa y cualitativa de los sistemas biológicos. Esta capacidad, puede ser utilizada para relacionar los parámetros mecánicos de la célula con las distintas componentes que conforman su citoesqueleto y estudiar las componentes celulares interiores responsables de los cambios en la mecánica[11]. Por ejemplo, es posible obtener mapas de elasticidad de neuronas corticales, a partir la combinación entre espectroscopía de fuerza atómica con microscopía de fluorescencia. A partir de este tipo de técnicas, se identifican áreas cuyo módulo elástico del cuerpo celular tiene un valor alto cuando se observan grandes concentraciones de filamentos de actina [11].

En este capítulo se muestran una serie de experimentos preliminares, que pueden ser llevados a cabo gracias a la técnica desarrollada en esta tesis doctoral.

5.2. Materiales y método

Para llevar a cabo los experimentos que se describen a continuación, los protocolos y consideraciones que se deben tener en cuenta.

Mediciones de las fluctuaciones en función del tiempo

Para el estudio de la evolución de las propiedades mecánicas en el tiempo, se registran las fluctuaciones que experimenta la neurita, en una posición fija, durante un tiempo de 100s, con una frecuencia de adquisición de 80kHz. La temperatura ambiente debe mantenerse constante durante el tiempo de medición.

Cultivo celular y preparación de muestras con drogas

Los protocolos para el cultivo celular de neuritas y la preparación de las muestras se explican detalladamente en el anexo A sección A.1.2 y en la sección A.1.3 respectivamente. En pocas palabras, las células PC12 son cultivadas usando medio DMEM (gibco 12430), 6% de suero de caballo (gibco 16050), 6% de suero fetal bovino (gibco 10437) y 1% de antibiótico antimicótico (gibco 15240). Las neuritas son obtenidas resemebrando las células, a una concentración de 10000 células/mL, en un cubreobjetos recubierto por colágeno ($50\mu\text{g/mL}$, gibco A10644) y cultivándolas en su medio de diferenciación. Después de tres días de cultivo bajo estas condiciones, las neuritas de PC12 alcanzan aproximadamente $200\mu\text{m}$ de largo.

Para llevar a cabo los experimentos con drogas, las muestras son preparadas en condiciones normales. Las concentraciones utilizadas y la metodología depende de la droga a utilizar. Para estudiar el efecto de Latruncullin-A, la droga es agregada 10 minutos antes de realizar las mediciones. Se utiliza una concentración de trabajo de $0,05\mu\text{M}$ en la muestra. El protocolo de preparación de Latruncullin-A se encuentra descrito en el anexo A en la sección A.5. Por otro lado, el estudio del efecto provocado por Paraformaldehído se lleva a cabo mediante al protocolo descrito en el anexo en la sección A.4.

Imágenes de fluorescencia

Para contrastar los resultados cuantitativos de los parámetros mecánicos de neuritas, se utilizan imágenes de fluorescencia para visualizar los filamentos de F-actina que conforman el citoesqueleto de la neurita. Los experimentos de fluorescencia son llevados a cabo mediante una línea celular estable con F-actina fluorescente. Para obtener la línea fluorescente se utiliza el método de transfección de plásmido mEGFP-Lifeact-7, el protocolo se describe detalladamente en el anexo A en la sección A.3. Este plásmido es un péptido formado por 17 aminoácidos, y proviene de la proteína abp (actin binding protein), de la literatura se sabe que este plásmido se une de manera selectiva a los filamentos de actina [59]. Para obtener la fluorescencia, este plásmido se fusiona con algún fluoróforo o proteína fluorescente. En el caso particular del plásmido utilizado en esta tesis, el fluoróforo es GFP, el cual se une a uno de los terminales de Lifeact.

Las imágenes de fluorescencia son obtenidas iluminando la muestra con luz de longitud de onda es $470nm$ (ver GFP de la figura 4.3). Antes de comenzar las mediciones se captura una imagen de la distribución de F-actina durante un tiempo de exposición fijo de 3s. Posteriormente seguimos el protocolo descrito en la metodología del capítulo 4 para registrar las fluctuaciones de amplitud de la neurita.

Preparación de muestras de células DRG

Las células DRG fueron obtenidas mediante el protocolo descrito en el apéndice A sección A.7.

5.3. Resultados preliminares

5.3.1. Evolución temporal de la mecánica de neuritas

Registrando las fluctuaciones transversales que experimenta una neurita, en un punto determinado y durante un tiempo largo, nos es posible obtener la evolución de los parámetros mecánicos en el tiempo, tal como se muestran en la figura 5.1. El registro de las fluctuaciones se realiza durante un tiempo total de 100s con una frecuencia de adquisición de 80kHz. La ventana de tiempo de análisis es de 3s (ver rectángulo segmentado de color rojo mostrado en la figura 5.1A). Luego de determinar los 4 parámetros mecánicos, la ventana es desplazada 3s (ver rectángulo segmentado color gris) y el proceso de cálculo es repetido. Estos resultados se discutirán más adelante.

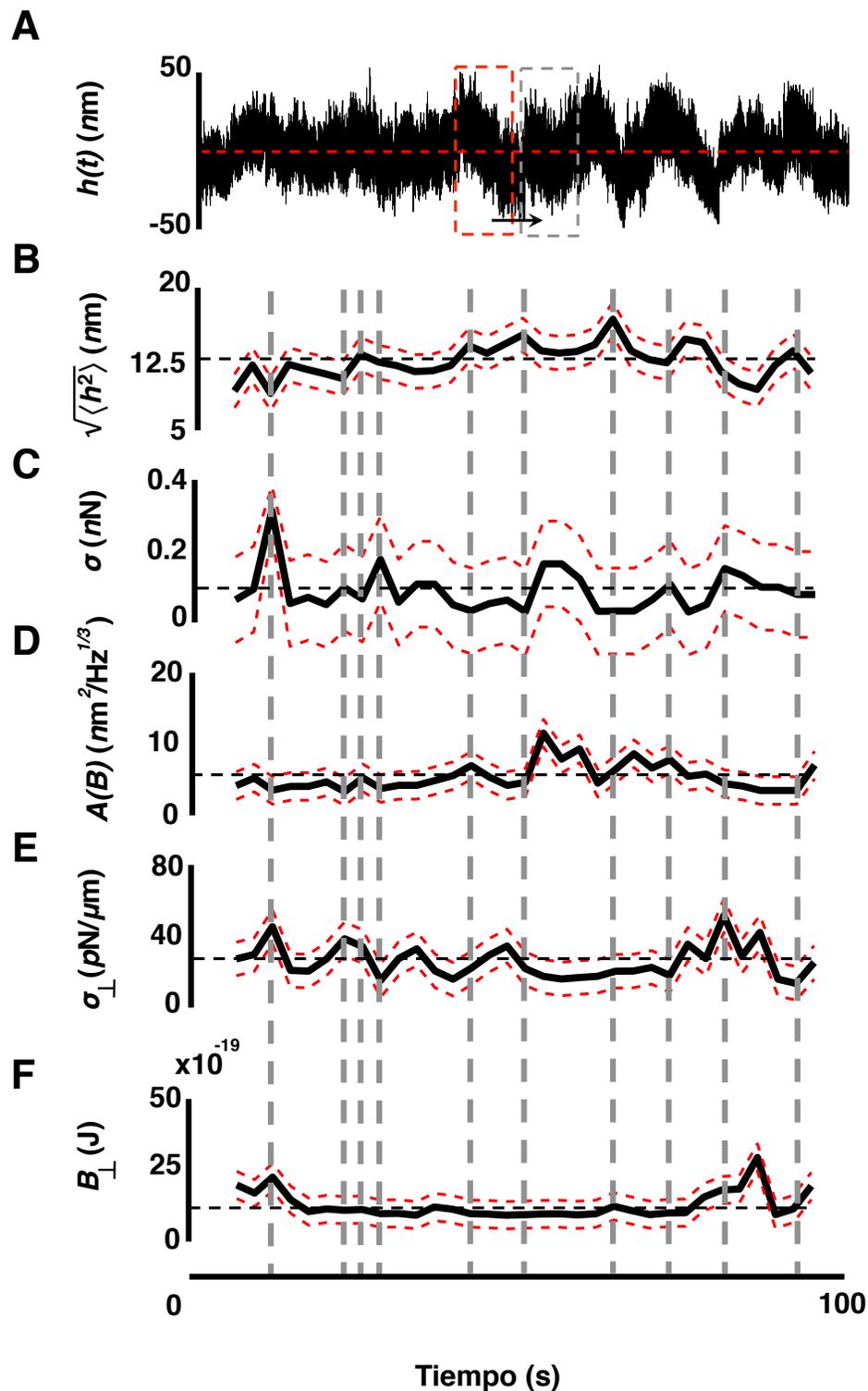


Figura 5.1: A) Señal ya calibrada para h , adquirida a una frecuencia de adquisición de 80kHz durante un tiempo de 100s. B) Amplitud de las fluctuaciones obtenida directamente de la señal mostrada en A. Mientras que la tensión axial (C), la función para la rigidez de flexión $A(B)$ (D), la tensión de membrana (E) y el bending de membrana (F), fueron determinados a partir del ajuste de $\log_{10} PSD = a \log_{10} f + m$ en los regímenes correspondientes. Hemos asumido que la disipación efectiva debido al citoesqueleto de la neurita y el medio que la rodea, es constante e igual a $\eta_e = 0,55 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ y la disipación efectiva debido a la presencia del citosol y el medio es igual a $\eta_e^c = 80 \times 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$. La ventana de integración (rectángulo segmentado color rojo) para estas mediciones es de 3s con un desplazamiento de la ventana de 3s. Las líneas segmentadas color rojo representan el intervalo de confianza que incluye 68% de los valores obtenidos.

5.3.2. Efecto del Latrunculin-A y del Paraformaldehido

En esta sección estudiamos el comportamiento de la *PSD* de la neurita luego de interactuar con dos drogas distintas; Latruncullin-A y Paraformaldehido. La finalidad de estos experimentos, es probar la sensibilidad de la técnica desarrollada para determinar si somos capaces de detectar los cambios inducidos por la acción de drogas.

Latrunculin-A: En la figura 5.2A se compara las fluctuaciones que experimenta la neurita en condiciones normales y diez minutos después de ser expuesta a latruncullin (LAT-A). La figura 5.2B muestra la comparación para la *PSD* obtenida a partir de la señal mostrada en la figura 5.2A.

A simple vista, podemos notar el cambio en la respuesta espectral. Las fluctuaciones para una neurita bajo el efecto de la droga es mucho mayor que cuando se encuentra en condiciones normales. El valor de la desviación estandar para las fluctuaciones, equivalente a la amplitud de las fluctuaciones, para la neurita en condiciones normales y con LAT-A son iguales a 5,0 y 38,6nm respectivamente. Las tablas 5.1 y 5.2 resumen las distintas leyes de potencias y los valores para la amplitud 10^m para cada régimen de la misma neurita antes y después de interactuar con LAT-A. Para ambos casos, se mantienen los cuatro regímenes, con leyes de potencia similares, sin embargo, los rangos de frecuencias de corte y los valores para la amplitud 10^m son muy diferentes. Diferencias que discutiremos más adelante.

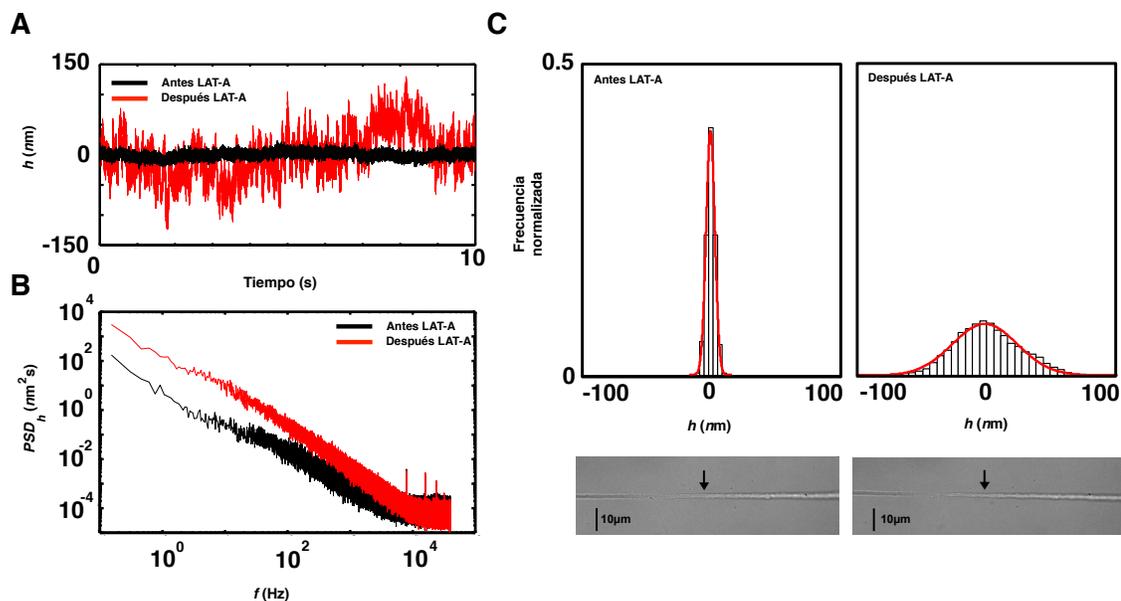


Figura 5.2: A) Fluctuaciones para la misma neurita antes y diez minutos después de interactuar con LAT-A. B) Comparación de la PSD para la misma neurita antes y después de interactuar con Latruncullin-A. Los resultados mostrados son el promedio de diez mediciones sobre la misma neurita. C) Histogramas para las fluctuaciones y las imágenes correspondiente de la neurita antes y después de interactuar con LAT-A.

Régimen	Rango (Hz)	Ley de potencia, a	Amplitud, 10^m
σ	{0, 4}	$-1,6 \pm 0,2$	$5,4 \pm 0,1$
\mathcal{B}	{4, 7}	$-0,7 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,8$
σ_{\perp}	{7, 80}	$-1,0 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,3$
\mathcal{B}_{\perp}	{80, 10^3 }	$-1,6 \pm 0,2$	$35,0 \pm 6,0$

Cuadro 5.1: Resumen de los parámetros obtenidos a partir del ajuste de la ecuación $\log_{10} PSD = a \log_{10} f + m$ en la PSD_h experimental de la neurita mostrada en la figura 5.2 bajo condiciones normales.

Régimen	Rango (Hz)	Ley de potencia, a	Amplitud, 10^m
σ	{0, 1}	$-1,5 \pm 0,3$	$152,4 \pm 10,8$
\mathcal{B}	{1, 3}	$-0,7 \pm 0,5$	$77,5 \pm 10,3$
σ_{\perp}	{3, 11}	$-1,0 \pm 0,9$	$112,5 \pm 75,5$
\mathcal{B}_{\perp}	{11, 10^3 }	$-1,7 \pm 0,1$	$519,2 \pm 86,4$

Cuadro 5.2: Resumen de los parámetros obtenidos a partir del ajuste de la ecuación $\log_{10} PSD = a \log_{10} f + m$ en la PSD_h experimental de la neurita mostrada en la figura 5.2 bajo los efectos de la latruncullin.

Paraformaldehido: En contraste al caso de las neuritas expuestas a los efectos de la latruncullin, el caso del Paraformaldehido (PFA) es completamente distinto. Si bien se mantienen los cuatro regímenes, la amplitud promedio de las fluctuaciones y la amplitud de la PSD baja drásticamente por efecto del PFA en comparación con las neuritas bajo condiciones normales, como se puede observar en la figura 5.3.

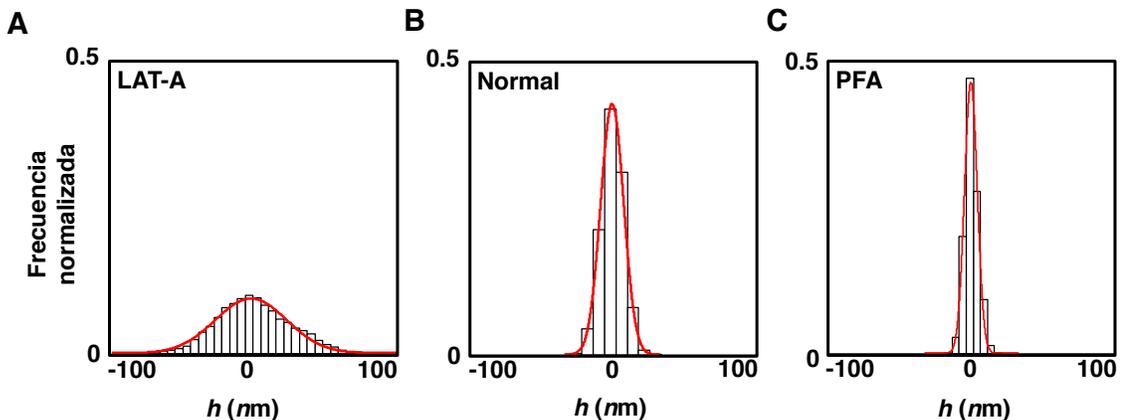


Figura 5.3: Los histograma muestran la distribución de las fluctuaciones que experimenta una neurita tras interactuar con LAT-A y PFA, donde el valor medio de la amplitud de fluctuaciones son de $\sqrt{\langle h^2 \rangle}_{LAT-A} = 38,6nm$, $\sqrt{\langle h^2 \rangle}_{Normal} = 12,1nm$ y $\sqrt{\langle h^2 \rangle}_{PFA} = 6,7nm$ respectivamente.

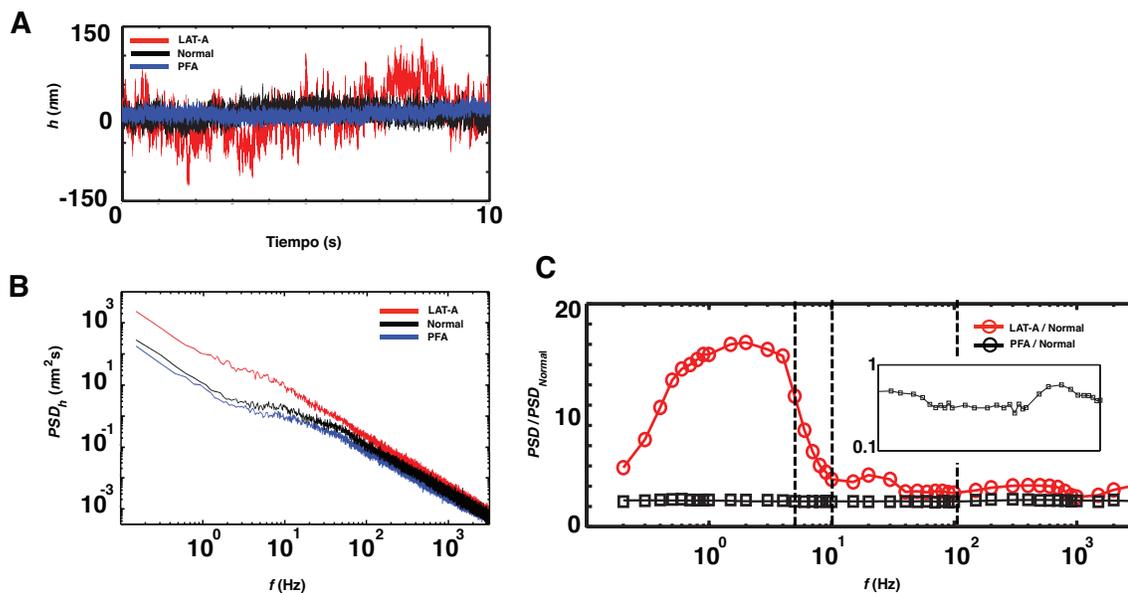


Figura 5.4: Figura que muestra el efecto en la respuesta espectral para neuritas bajo la influencia de latruncullin y Paraformaldehido. A) Efecto en las fluctuaciones que experimenta una neurita en su solución, tras interactuar con dos drogas distintas. B) Comparación de la PSD de neuritas bajo la influencia dos drogas distintas: Latruncullin-A y Paraformaldehido. C) Representación semi logarítmica de la respuesta espectral de la neurita, normalizada por la PSD bajo condiciones normales (PSD_{Normal}). El recuadro muestra en detalle la normalización para la curva negra. Las líneas segmentadas verticales color negro, representan las frecuencias de corte de cada régimen. Para las figuras B) y C) la PSD mostrada resulta del promedio de la PSD de siete neuritas distintas, con diez mediciones para cada una.

5.3.3. F-actina vs. tensión axial

Un aspecto esencial en el entendimiento de mecánica celular, es la relación entre la arquitectura, función biológica y la respuesta mecánica de una célula frente a fuerzas externas. A modo de ejemplo, en la figura 5.5 se muestran imágenes de fluorescencia de dos neuritas distintas marcadas con mEGFP-LifeAct-7 (ver anexo A.3). Para cuantificar las imágenes, estas se obtuvieron fijando la intensidad de la lámpara (ver figura 4.3) y el tiempo de exposición de la cámara, y luego se calculó la densidad lineal de intensidad de fluorescencia. Posteriormente, se midió el espectro de fluctuaciones para obtener los parámetros mecánicos para cada neurita. La densidad ρ_0 , usada como referencia, es la densidad de las neuritas que presentaron tensiones entre $\sigma_0 = 0,2 - 0,8nN$ (ver figura 4.10).

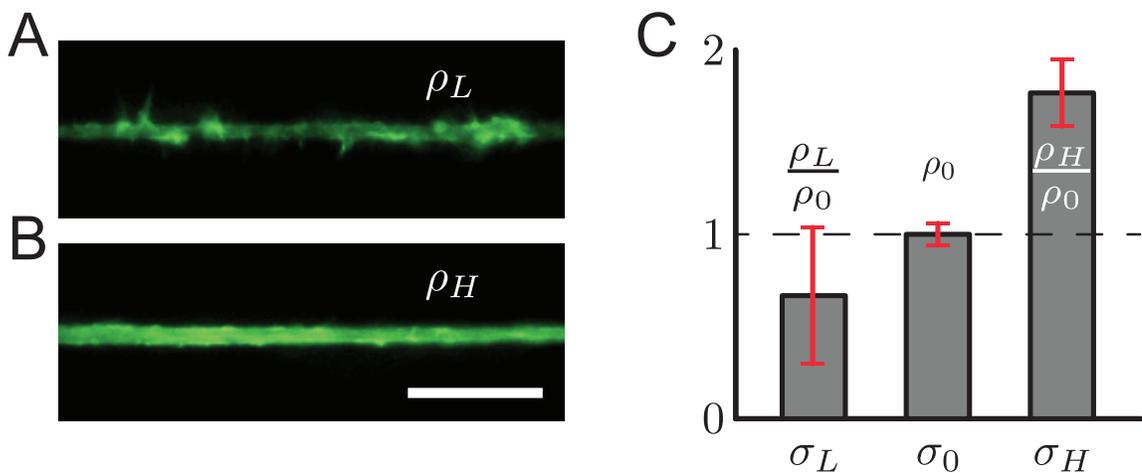


Figura 5.5: Imágenes de fluorescencia de neuritas de células PC12 marcadas con mEGFP-LifeAct-7. A) Distribución espacial de F-actina de una neurita con baja densidad lineal de actina ($\rho_L/\rho_0 = 0,7 \pm 0,1$). B) Distribución espacial de F-actina de una neurita con alta densidad lineal de actina ($\rho_H/\rho_0 = 1,9 \pm 0,2$). Escala $10\mu m$. C) Histograma de la densidad lineal de F-actina en función de la tensión axial obtenida mediante el análisis de la densidad espectral de potencia ($\sigma_L < 0,2nN$, $0,2 < \sigma_0 < 0,8nN$ y $\sigma_H > 0,8nN$).

En la figura 5.5C, se presenta el histograma de la densidad lineal (normalizada, ρ/ρ_0) de F-actina en función de la tensión axial medida experimentalmente por nuestro instrumento. Se observa que, de un total de 12 neuritas analizadas, las neuritas que presentan menos actina (figura 5.5A) tienen, en promedio, una tensión axial por debajo de los $0,2nN$. Por el contrario, las neuritas que presentan más actina (figura 5.5B), su tensión axial sobrepasa los $0,8nN$.

Este resultado da evidencia del rol que juegan los filamentos de actina en la tensión de la neurita. Sin embargo, para obtener una visión más acabada de la relación entre la tensión de las neuritas y las proteínas que conforman su citoesqueleto, se debe estudiar además otros com-

ponentes como por ejemplo, la distribución de los motores moleculares, microtúbulos, filamentos intermedios, entre otros.

5.3.4. Espectro de fluctuaciones para una neurona DRG.

Entre las conclusiones del capítulo anterior (ver sección 4.7), se menciona la extensión de la metodología desarrollada en este trabajo en sistemas biológicos más complejos. Este es el caso de neuronas sensoriales primarias procedentes del ganglio de la raíz dorsal (DRG), dada su importancia en el sistema nervioso periférico. Nuestros resultados preliminares muestran que la densidad espectral de potencia de neuritas de células PC12, no es una característica intrínseca de este tipo de neuritas, sino que se observan las mismas leyes de potencia para neuronas DRG.

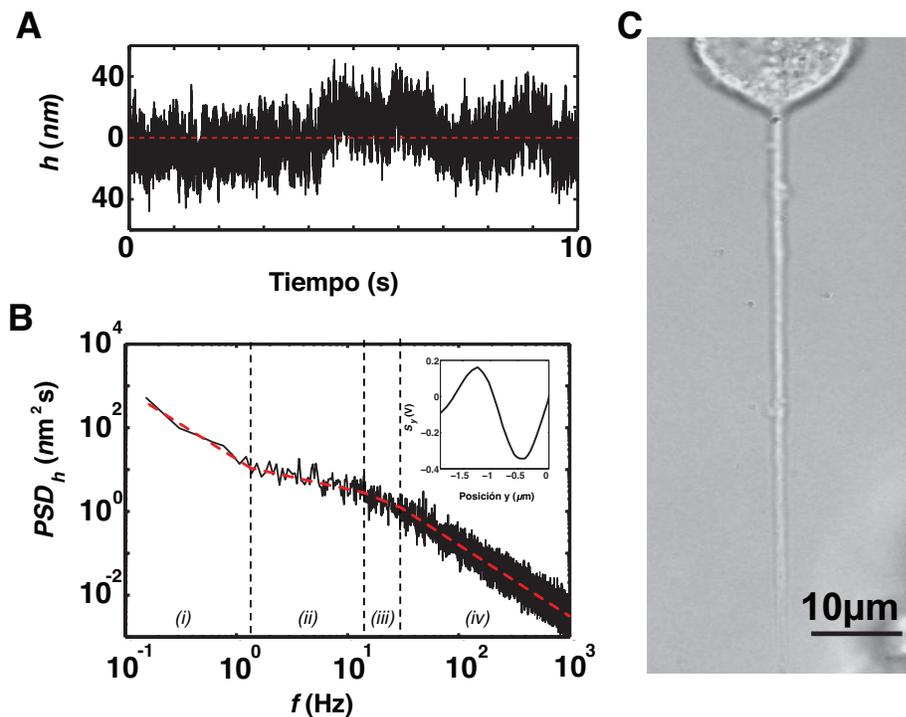


Figura 5.6: A) Fluctuaciones de una neurona DRG registradas por las pinzas ópticas. B) PSD_h de la neurona DRG determinada a partir de la señal mostrada en A. Las líneas verticales segmentadas negras representan las frecuencias de corte de los distintos regímenes descritos por nuestro modelo. La figura inscrita, es la curva de calibración medida al borde de la neurona. C) Imagen de campo claro de una neurita DRG de $1\mu\text{m}$ de radio, donde además se observa el soma de la neurona.

Como se muestra en la figura 5.6, las fluctuaciones que experimenta una neurona DRG y su densidad espectral de potencia, son similares a los obtenidos para neuritas de células PC12. Por lo que el estudio en sistemas más complejos es completamente factible.

Régimen	Rango (Hz)	Ley de potencia, a	Amplitud, 10^m
σ	{0, 1, 4}	$-1,5 \pm 0,3$	$9,7 \pm 3,0 \times 10^{-3}$
\mathcal{B}	{1, 4, 14}	$-0,7 \pm 0,4$	$7,2 \pm 0,1$
σ_{\perp}	{14, 30}	$-1,0 \pm 0,2$	$16,2 \pm 0,2$
\mathcal{B}_{\perp}	{30, 10^3 }	$-1,7 \pm 2 \times 10^{-2}$	$148,2 \pm 34,7$

Cuadro 5.3: Resumen de los parámetros experimentales obtenidos para la neurona DRG mostrada en 5.6.

5.4. Discusión resultados preliminares

5.4.1. Dinámica de la mecánica de una neurita

El análisis en función del tiempo de la densidad espectral de potencia, provee evidencia directa de la existencia de la evolución temporal de los parámetros mecánicos que exhiben las neuritas. Así por ejemplo en la figura 5.1, se observan picos de tensión, con un rápido aumento dentro de 2–5 segundos y con un valor máximo de hasta tres veces el nivel de tensión basal de las neuritas. Este nivel de variaciones de tensión se había informado anteriormente en neuritas hipocampales, utilizando microscopía de fuerza de tracción, donde la media de las fuerzas de tracción se eleva hasta 2 a 3 veces el nivel basal. [60].

Otra observación es la relación entre la tensión axial y la tensión de membrana. Si consideramos un tubo continuo homogéneo bajo tensión, la tensión axial y la tensión radial se encuentran relacionadas como $\sigma \sim 2\pi r\sigma_{\perp}$ [61], es decir que entre la tensión axial y la tensión radial hay un factor 2π de diferencia. Este es también el caso que se muestra experimentalmente aquí en neuritas de células PC12 (ver figura 5.1C y E). Si consideramos la tensión axial promedio ($0,1nN$), la tensión de membrana promedio ($\sigma_{\perp} = 28,6pN/\mu m$) y el radio de la neurita ($r \approx 1,0\mu m$), tenemos que $2\pi r\sigma \sim 0,2nN$. Sin embargo, la dinámica de la tensión de membrana y la axial no están directamente relacionadas, sugiriendo que la tensión de membrana también depende de los procesos biológicos tales como el acoplamiento con el citoesqueleto o los procesos de exocitosis y endocitosis.

Por otro lado, la constante de rigidez de la membrana no experimenta grandes cambios durante el transcurso del tiempo, con un valor promedio igual a $8,0 \times 10^{-19}J$ y una desviación estándar igual a $1,5 \times 10^{-19}J$.

5.4.2. Efectos del LAT-A y PFA

Para entender los efectos que provoca cada droga en la mecánica celular, debemos tener en cuenta que tipo de modificación introduce el compuesto/químico/proteína/droga utilizada. Esto es de vital importancia, dado que algún compuesto en particular puede afectar a uno o más aspectos biológicos de las células.

En el caso de la Latruncullin-A, se sabe que inhibe la polimerización de la actina y se une a los monómeros de actina, lo que resulta en una disrupción del citoesqueleto. Dado que los F-actina y las proteínas motoras son responsables de la generación de tensión mecánica, es de esperar que las muestras de neuritas perturbadas por la presencia de LAT-A disminuyan su tensión axial [5, 62].

De la figura 5.2 hemos obtenido los parámetros mecánicos de neuritas antes y después de la exposición a LAT-A, cuyos resultados se encuentran resumidos en la tabla 5.4. Experimentalmente, los efectos de esta droga son visibles en la amplitud de las fluctuaciones, la que crece aproximadamente en un factor 5. Esto implica que la tensión axial debe disminuir significativamente. Como se muestra en la tabla 5.4, esto es lo que reflejan nuestras mediciones. Además, la tensión de membrana disminuye aproximadamente en un 98 % respecto una neurita en condiciones normales. En relación al bending de membrana, se observa un decrecimiento significativo. Este último resultado puede ser explicado mediante el acoplamiento membrana-citoesqueleto. En otras palabras, la depolimerización de los filamentos de actina, lleva consigo una reducción en la cantidad de proteínas que se acoplan desde la membrana al citoesqueleto, provocando una disminución en la adhesión de estos últimos, dejando como consecuencia una rigidez de flexión y bending menor que para una neurita en condiciones normales.

Parámetro	Control	LAT-A
$d \mu\text{m}$	$2,5 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,1$
$\sqrt{\langle h^2 \rangle} \text{ nm}$	$5,6 \pm 0,2$	$24,6 \pm 1,1$
$\sigma \text{ nN}$	$0,5 \pm 2,0 \times 10^{-2}$	$1,0 \pm 0,1 \times 10^{-3}$
$\sigma_{\perp} \text{ pN}/\mu\text{m}$	$130,9 \pm 31,2$	$2,9 \pm 2,0$
$\mathcal{B}_{\perp} \times 10^{-19} \text{ J}$	$613,5 \pm 8,7$	$9,0 \pm 0,1 \times 10^{-2}$

Cuadro 5.4: Resumen comparativo de las propiedades mecánicas de la neurita mostrada en 5.2A, antes y 10 minutos después de interactuar con la droga Latruncullin-A.

Por otra parte, el Paraformaldehído se une a las proteínas de manera no selectiva. El PFA es utilizado ampliamente en microscopía de fluorescencia e histología. Como consecuencia, las células expuestas al PFA cesan toda actividad biológica dado que todas las proteínas que componen a la célula se encuentran fijadas al compuesto. Esto significa que, bajo la presencia del PFA, se fijan todos los enlaces (cross-links) y además se producen nuevos enlaces de entrecruzamiento entre las proteínas que conforman el citoesqueleto, la membrana celular y en general, en toda la célula.

Estas alteraciones son observadas experimentalmente por nuestro sistema (ver tabla 5.5). Por ejemplo, la amplitud de las fluctuaciones decrecen con PFA, la tensión axial aumenta un factor

3 respecto del valor de control de neuritas sin PFA, y la tensión de la membrana plasmática también aumenta. Y dado que el PFA aumento el grado de cross-link, observamos que el bending de membrana aumenta casi en un factor 100 respecto del valor de la neurita control, debido a que el aumento de enlaces de cruzamiento crea un mayor acoplamiento membrana-citoesqueleto.

A continuación se muestran el cuadro comparativo de 21 experimentos (7 control, 7 LAT-A y 7 PFA) para estos dos casos.

Parámetro	LAT-A	CONTROL	PFA
$\sqrt{\langle h^2 \rangle}$ nm	$16,5 \pm 0,6$	$11,2 \pm 0,2$	$10,0 \pm 0,3$
σ nN	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	$0,5 \pm 0,1$	$1,5 \pm 1,0$
σ_{\perp} pN/ μ m	$4,2 \pm 1,7$	$37,2 \pm 7,4$	$39,4 \pm 3,7$
$B_{\perp} \times 10^{-19}$ J	$1,2 \pm 0,1 \times 10^{-2}$	$17,5 \pm 0,2 \times 10^{-1}$	$111,2 \pm 1,7$

Cuadro 5.5: Resumen comparativo de las propiedades mecánicas neta para una neurita bajo la influencia de dos drogas distintas.

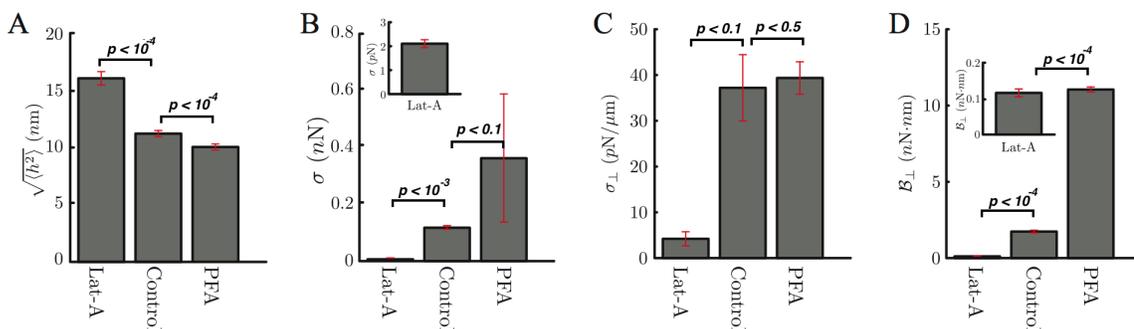


Figura 5.7: Gráfico de barra que muestra el efecto en las propiedades mecánicas para una neurita bajo la influencia de dos drogas distintas: Latruncullin-A y Paraformaldehído al 4 %. A) Amplitud de fluctuaciones de una neurita. B) Tensión axial C) Tensión de membrana D) Bending de membrana. Cada barra representa el promedio para siete neuritas. La variable p representa el p -value.

5.4.3. Rol de F-actina

De los resultados inferidos de la figura 5.5, podemos notar que a medida que aumenta la tensión axial de las neuritas, la intensidad de fluorescencia también aumenta. Sabemos que la intensidad de fluorescencia está directamente relacionada con las concentraciones de actina presentes en la neurita. Por lo tanto, un neurita que presenta una intensidad de fluorescencia superior a otra, significa que tiene mayores concentraciones de filamentos de actina.

Este simple experimento, y teniendo en cuenta el resultado sobre los efectos de la depolimerización de F-actina por medio de LAT-A, demuestra el rol que juegan los filamentos de actina en

la generación y control de la tensión mecánica en neuritas [6, 14, 62].

Sin embargo, como se mencionó anteriormente, para obtener una visión más acabada de la relación entre la tensión de las neuritas y las proteínas que confoman su citoesqueleto, se debe estudiar además otras componentes.

5.4.4. Un caso más real: neuronas DRG

Como se mencionó en la sección 4.2 de este trabajo, las células PC12 no son neuronas y sus prolongaciones no son precisamente neuritas. Sin embargo, esta línea celular ha sido ampliamente utilizada como un modelo biológico debido a las ventajas que presenta frente a cultivos primarios de neuronas.

	Neurita DGR
$d \mu\text{m}$	2
$\sqrt{\langle h^2 \rangle} \text{ nm}$	$7,6 \pm 0,4$
$\sigma \text{ nN}$	$0,2 \pm 0,1 \times 10^{-2}$
$\sigma_{\perp} \text{ pN}/\mu\text{m}$	$20,4 \pm 0,3$
$\mathcal{B}_{\perp} \times 10^{-19} \text{ J}$	$8,1 \pm 0,1$

Cuadro 5.6: Resumen de las propiedades mecánicas de la neurita DRG mostrada en 5.6, determinadas a partir del análisis de fluctuaciones.

Por otra parte, el estudio de sistemas más complejos, como es el caso de neuronas DRG (ver sección 5.3.4), utilizando la metodología desarrollada en este trabajo, abre aún más posibilidades. Sólo a modo de comparación, se contrastan las propiedades mecánicas de neuritas PC12 con las propiedades de neuronas DRG.

Parámetro	PC12	DRG
$\sqrt{\langle h^2 \rangle} \text{ nm}$	$11,2 \pm 0,2$	$22,2 \pm 0,7$
$\sigma \text{ nN}$	$0,5 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,4 \times 10^{-2}$
$\sigma_{\perp} \text{ pN}/\mu\text{m}$	$37,2 \pm 7,4$	$4,7 \pm 0,8$
$\mathcal{B}_{\perp} \times 10^{-19} \text{ J}$	$17,5 \pm 2 \times 10^{-2}$	$0,4 \pm 0,1 \times 10^{-2}$

Cuadro 5.7: Resumen de las propiedades mecánicas promedio de prolongaciones de células PC12 y neuritas DRG, determinadas a partir del análisis de fluctuaciones.

5.5. Conclusiones

En este capítulo hemos mostrado un abanico reducido de posibilidades que nos entrega la metodología desarrollada en este trabajo de tesis. La implementación de un sistema experimental no invasivo, de alta resolución espacial y temporal, potenciado con el análisis de fluctuaciones térmicas y complementado por nuestro modelo de neuritas, nos permite explorar situaciones mucho más complejas.

Por ejemplo, el hecho de que este método requiera sólo un par de segundos de medición para extraer información mecánica, nos permite estudiar el sistema de control de tensión axial de las neuritas, cuyo rol es fundamental en la modulación del transporte activo de vesículas al interior de las neuronas [21], como también la transducción de fuerza durante los procesos sinápticos [63]. Es sabido que estos procesos están relacionados con la características mecánicas de las neuritas y con los estímulos biofísicos y/o bioquímicos. Nuestras mediciones dan un acceso directo al complejo acoplamiento entre las funciones biológicas y las propiedades mecánicas. La dinámica de la tensión muestra unos picos transitorios que decaen rápidamente al estado base, similar al caso de las neuritas hipocampales [60], sugiriendo un control de retroalimentación muy rápido, que tiene como objeto evitar daños en las neuronas por tensiones excesivas, que puedan afectar la transmisión de señales, alterando finalmente la red neuronal.

Hemos visto que las propiedades mecánicas de las neuritas se ven significativamente afectadas tras interactuar con distintos tipos de drogas y los cuales hemos sido capaces de cuantificar, ya sea para una misma neurita o los efectos netos de cada droga.

También mostramos que mediante nuestro instrumento híbrido y el modelo desarrollado, es posible realizar mediciones cuantitativas de las propiedades mecánicas y simultáneamente obtener información cualitativa sobre la arquitectura celular, lo que nos permite relacionar los aspectos mecánicos principales de una neurita con las distintas componentes que conforman su citoesqueleto. Particularmente, nuestros resultados cuantitativos y cualitativos corroboran el hecho de que los filamentos de actina tienen un rol principal en la tensión axial de la neurita [6, 62].

Las prolongaciones de las células PC12 son un modelo limitado para estudiar axones, debido a que hacen procesos neuronales similares, pero no son axones. Por lo tanto, para aumentar el potencial de esta técnica y que pueda ser extendida a sistemas más complejos, hemos replicado nuestras mediciones a un sistema biológico más realista, como es el caso de neuronas DRG.

Los resultados obtenidos son notables, por la gran semejanza con los resultados obtenidos para células PC12. Esta similitud se debe a la geometría que tienen ambas prolongaciones (prolongaciones de células PC12 y neuritas DRG). Por lo tanto, creemos que esta técnica y nuestro modelo, pueden ser extendidos a sistemas biológicos similares.

El potencial de la espectroscopía de fluctuaciones térmicas en tiempo real (RT-TFS), y su extensión natural a escenarios más complejos, abre una puerta para entender en detalle la respuesta de las células a frente a estímulos externos, tanto biofísicos como bioquímicos. La técnica desarrollada, capaz de distinguir neuritas cuasi idénticas, aún requiere un conjunto de experimentos para probar los efectos sobre la respuesta espectral de una neurita debido a los cambios de sus parámetros mecánicos, como por ejemplo, estimular la polimerización/depimerización de los microtúbulos o neurofilamentos, inhibir la actividad de las proteínas motoras, entre otros. Sería interesante estudiar los cambios en las propiedades mecánicas para distintas concentraciones de drogas, determinar las concentraciones de saturación o evaluar cuando los procesos de depimerización son reversibles. Por último, se propone mejorar el sistema de visualización de fluorescencia, que permita cuantificar las concentraciones de las distintas componentes de la célula, esto proporcionará una herramienta que permitirá cuantificar no sólo propiedades mecánicas, sino también la arquitectura celular, permitiendo una mejor caracterización de los sistemas biológicos.

Otro aspecto importante de esta investigación, es la posibilidad que se abre para realizar estudios patológicos en base a la mecánica de neuritas. De hecho, algunas enfermedades importantes están vinculadas a los cambios en las propiedades mecánicas y estructurales de las células. Este es el caso de los glóbulos rojos infectados con malaria [64] o en células cancerígenas [65]. En el caso de las enfermedades neurodegenerativas, la tensión mecánica juega un papel importante en la determinación del crecimiento, la orientación y la regulación de la función neuronal. De hecho, la tensión mecánica modifica la distribución de microtúbulos a lo largo del axón y la red de actina en el terminal del axón. Como consecuencia, la tensión del axón modula el transporte de vesículas y por lo tanto contribuye a la agrupación de los neurotransmisores en la unión neuromuscular [7]. Otra alteración neurodegenerativa que afecta a las propiedades biofísicas de las neuronas proviene de la agregación de proteínas beta-amiloide, que afecta a la integridad de la membrana plasmática [66]. Además, los pacientes con demencia frontotemporal (FTD) muestran concentraciones anormales de filamentos intermedios en las neuronas, alterando así la viscosidad interna del axón [67]. Estas alteraciones, en las propiedades mecánicas de las neuronas, han sido recientemente vinculado a las enfermedades de Parkinson, Alzheimer, Charcot-Marie-Tooth (CMT) y enfermedades de inclusión de filamentos intermedios (NIFID), como se informa en las

referencias [67, 68].

Finalmente, el potencial de la técnica de espectroscopía de fluctuaciones térmicas y su extensión natural a escenarios más complejos, abre una puerta para entender con más detalle las propiedades mecánicas de los axones en condiciones fisiológicas y patológicas. Esta técnica también ofrece la oportunidad de evaluar la respuesta de los axones frente a estímulos externos. Por ejemplo, caracterizar los efectos en la mecánica de axones en el curso de tiempo producidos por neurotóxicos o potenciales medicamentos terapéuticos.

Capítulo 6

Conclusiones Generales

En esta tesis, hemos construido y caracterizado una pinza óptica, con la finalidad de medir las fluctuaciones transversales que experimenta una neurita. Para interpretar y cuantificar nuestras mediciones, hemos desarrollado un modelo que describe el sistema biológico. Nuestro modelo simplifica la neurita como una cuerda, la que fluctúa en torno a su posición de equilibrio. A partir de la técnica experimental desarrollada, hemos sido capaces de determinar simultáneamente, de manera simple, directa y no invasiva tres aspectos claves de la mecánica de axones; la tensión axial de la neurita, la tensión y bending de membrana. Los resultados obtenidos son concordantes con valores promedio previamente medidos por técnicas invasivas [16, 28, 51, 52]. Otra ventaja es la sensibilidad de la técnica, la cual es lo suficientemente buena para diferenciar, mecánicamente, neuritas indistinguibles respecto a su geometría, como ha sido demostrado en este trabajo.

Si bien, hemos propuesto una posible solución a uno de los problemas experimentales más importantes que surgen al momento de estudiar la mecánica de axones, aún queda pendiente un conjunto de experimentos para probar los efectos en la respuesta espectral de neuritas debido a los cambios en sus propiedades mecánicas, ya sean por la dinámica intrínseca de la neurita o inducidos mediante estímulos físicos o bioquímicos.

Con la ventaja de requerir sólo unos cuantos segundos para realizar una medición, de la que se extrae la información mecánica de la neurita, esta herramienta nos da la posibilidad de estudiar la evolución temporal de las propiedades mecánicas, como hemos mostrado en este trabajo. Por lo tanto, nuestras mediciones dan acceso directo al complejo acoplamiento entre la función biológica

y las propiedades mecánicas [60].

El aspecto más importante de esta investigación, es la posibilidad que se abre para realizar estudios patológicos en base a la mecánica de las neuritas, debido a la fuerte dependencia que existe entre los cambios mecánicos y las enfermedades neurodegenerativas que se ha reportado en las referencias [64–68].

Finalmente, el potencial de la técnica de espectroscopía de fluctuaciones térmicas y su extensión natural a escenarios más complejos, abre una puerta para entender con más detalle las propiedades mecánicas de los axones en condiciones fisiológicas y patológicas. Esta técnica también ofrece la oportunidad de evaluar la respuesta de los axones frente a estímulos externos. Por ejemplo, caracterizar los efectos en la mecánica de axones en el curso de tiempo producidos por neurotóxicos o potenciales medicamentos terapéuticos.

Bibliografía

- [1] Harvey F Lodish, Arnold Berk, S Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, James Darnell, et al. *Molecular cell biology*, volume 4. Citeseer, 2000.
- [2] Ke Xu, Guisheng Zhong, and Xiaowei Zhuang. Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons. *Science*, 339(6118):452–456, 2013.
- [3] Guisheng Zhong, Jiang He, Ruobo Zhou, Damaris Lorenzo, Hazen P Babcock, Vann Bennett, and Xiaowei Zhuang. Developmental mechanism of the periodic membrane skeleton in axons. *eLife*, 3:e04581, 2015.
- [4] Kristian Franze and Jochen Guck. The biophysics of neuronal growth. *Reports on Progress in Physics*, 73(9):094601, 2010.
- [5] D Bray. Mechanical tension produced by nerve cells in tissue culture. *Journal of cell science*, 37(1):391–410, 1979.
- [6] TJ Dennerll, HC Joshi, VL Steel, RE Buxbaum, and SR Heidemann. Tension and compression in the cytoskeleton of pc-12 neurites. ii: Quantitative measurements. *The Journal of cell biology*, 107(2):665–674, 1988.
- [7] WW Ahmed, TC Li, SS Rubakhin, A Chiba, JV Sweedler, and TA Saif. Mechanical tension modulates local and global vesicle dynamics in neurons. *Cellular and molecular bioengineering*, 5(2):155–164, 2012.
- [8] Kyle E Miller and Michael P Sheetz. Direct evidence for coherent low velocity axonal transport of mitochondria. *The Journal of cell biology*, 173(3):373–381, 2006.
- [9] Matthew O’Toole and Kyle E Miller. The role of stretching in slow axonal transport. *Biophysical journal*, 100(2):351–360, 2011.
- [10] Yoshio Goshima, Tomonobu Hida, and Toshiyuki Gotoh. Computational analysis of axonal transport: a novel assessment of neurotoxicity, neuronal development and functions. *International journal of molecular sciences*, 13(3):3414–3430, 2012.

-
- [11] Elise Spedden, James D White, Elena N Naumova, David L Kaplan, and Cristian Staii. Elasticity maps of living neurons measured by combined fluorescence and atomic force microscopy. *Biophysical journal*, 103(5):868–877, 2012.
- [12] Aidong Yuan, Mala V Rao, Ralph A Nixon, et al. Neurofilaments at a glance. *Journal of cell science*, 125(14):3257–3263, 2012.
- [13] Daniel A Fletcher and R Dyche Mullins. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463(7280):485–492, 2010.
- [14] Direct evidence that growth cones pull.
- [15] Timothy J Dennerll, Phillip Lamoureux, Robert E Buxbaum, and Steven R Heidemann. The cytomechanics of axonal elongation and retraction. *The journal of cell biology*, 109(6):3073–3083, 1989.
- [16] Roberto Bernal, Pramod A Pullarkat, and Francisco Melo. Mechanical properties of axons. *Physical review letters*, 99(1):018301, 2007.
- [17] Roberto Bernal, Francisco Melo, and Pramod A Pullarkat. Drag force as a tool to test the active mechanical response of pc12 neurites. *Biophysical journal*, 98(4):515–523, 2010.
- [18] DB Hill, MJ Plaza, K Bonin, and G Holzwarth. Fast vesicle transport in pc12 neurites: velocities and forces. *European Biophysics Journal*, 33(7):623–632, 2004.
- [19] Hui Ouyang, Eric Nauman, and Riyi Shi. Contribution of cytoskeletal elements to the axonal mechanical properties. *J Biol Eng*, 7(1):21, 2013.
- [20] Joseph N Fass and David J Odde. Tensile force-dependent neurite elicitation via anti- β 1 integrin antibody-coated magnetic beads. *Biophysical journal*, 85(1):623–636, 2003.
- [21] Wylie W Ahmed and Taher A Saif. Active transport of vesicles in neurons is modulated by mechanical tension. *Scientific reports*, 4, 2014.
- [22] Kristian Franze, Paul A Janmey, and Jochen Guck. Mechanics in neuronal development and repair. *Annual review of biomedical engineering*, 15:227–251, 2013.
- [23] J. Howard. *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. Sinauer Associates, Publishers, 2001.
- [24] James CM Lee and Dennis E Discher. Deformation-enhanced fluctuations in the red cell skeleton with theoretical relations to elasticity, connectivity, and spectrin unfolding. *Biophysical Journal*, 81(6):3178–3192, 2001.

-
- [25] H Strey, M Peterson, and E Sackmann. Measurement of erythrocyte membrane elasticity by flicker eigenmode decomposition. *Biophysical journal*, 69(2):478, 1995.
- [26] Mark A Peterson, Helmut Strey, and Erich Sackmann. Theoretical and phase contrast microscopic eigenmode analysis of erythrocyte flicker: amplitudes. *Journal de Physique II*, 2(5):1273–1285, 1992.
- [27] Michael Gögler, Timo Betz, and Josef Alfons Käs. Simultaneous manipulation and detection of living cell membrane dynamics. *Optics letters*, 32(13):1893–1895, 2007.
- [28] Timo Betz, Martin Lenz, Jean-François Joanny, and Cécile Sykes. Atp-dependent mechanics of red blood cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(36):15320–15325, 2009.
- [29] Arthur Ashkin. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Physical review letters*, 24(4):156, 1970.
- [30] Arthur Ashkin, JM Dziedzic, JE Bjorkholm, and Steven Chu. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Optics letters*, 11(5):288–290, 1986.
- [31] Arthur Ashkin, JM Dziedzic, and T Yamane. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature*, 330(6150):769–771, 1987.
- [32] Xinming Zhang, Lu Ma, and Yongli Zhang. High-resolution optical tweezers for single-molecule manipulation. *The Yale journal of biology and medicine*, 86(3):367, 2013.
- [33] Jeffrey T Finer, Robert M Simmons, James A Spudich, et al. Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature*, 368(6467):113–119, 1994.
- [34] Rene Castberg. Characterisation and calibration of optical tweezers. 2008.
- [35] Keir C Neuman and Steven M Block. Optical trapping. *Review of scientific instruments*, 75(9):2787–2809, 2004.
- [36] Mike Woerdemann. *Structured Light Fields: Applications in Optical Trapping, Manipulation, and Organisation*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [37] Juan Rubén Gomez-Solano. *Nonequilibrium fluctuations of a Brownian particle*. PhD thesis, Lyon, École normale supérieure, 2011.
- [38] Nicolaas Godfried Van Kampen. *Stochastic processes in physics and chemistry*, volume 1. Elsevier, 1992.

-
- [39] Astrid van der Horst, Nancy R Forde, et al. Power spectral analysis for optical trap stiffness calibration from high-speed camera position detection with limited bandwidth. *Optics express*, 18(8):7670–7677, 2010.
- [40] Romina Muñoz, Felipe Aguilar Sandoval, Christian AM Wilson, and Francisco Melo. Pulling on super paramagnetic beads with micro cantilevers: single molecule mechanical assay application. *Physical biology*, 12(4):046011, 2015.
- [41] Sanghwa Lee and Sungchul Hohng. An optical trap combined with three-color fret. *Journal of the American Chemical Society*, 135(49):18260–18263, 2013.
- [42] Iddo Heller, Gerrit Sitters, Onno D Broekmans, Géraldine Farge, Carolin Menges, Wolfgang Wende, Stefan W Hell, Erwin JG Peterman, and Gijs JL Wuite. Sted nanoscopy combined with optical tweezers reveals protein dynamics on densely covered dna. *nature methods*, 10(9):910–916, 2013.
- [43] Karen C Vermeulen, Gijs JL Wuite, Ger JM Stienen, and Christoph F Schmidt. Optical trap stiffness in the presence and absence of spherical aberrations. *Applied optics*, 45(8):1812–1819, 2006.
- [44] J Huisstede, K van der Werf, M Bennink, and V Subramaniam. Force detection in optical tweezers using backscattered light. *Optics express*, 13(4):1113–1123, 2005.
- [45] Rebecca K Montange, Matthew S Bull, Elisabeth R Shanblatt, and Thomas T Perkins. Optimizing bead size reduces errors in force measurements in optical traps. *Optics express*, 21(1):39–48, 2013.
- [46] Lloyd A Greene and Arthur S Tischler. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(7):2424–2428, 1976.
- [47] Julio E Celis, Nigel Carter, Kai Simons, J Victor Small, Tony Hunter, and David Shotton. *Cell biology, four-volume set: a laboratory handbook*. Academic Press, 2005.
- [48] Thomas Grevesse, Bornha E Dabiri, Kevin Kit Parker, and Sylvain Gabriele. Opposite rheological properties of neuronal microcompartments predict axonal vulnerability in brain injury. *Scientific reports*, 5, 2015.
- [49] Neville H Fletcher and Thomas Rossing. *The physics of musical instruments*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [50] Ricard Alert, Jaume Casademunt, Jan Brugués, and Pierre Sens. Model for probing membrane-cortex adhesion by micropipette aspiration and fluctuation spectroscopy. *Biophysical journal*, 108(8):1878–1886, 2015.

-
- [51] Robert M Hochmuth. Micropipette aspiration of living cells. *Journal of biomechanics*, 33(1):15–22, 2000.
- [52] Jean-Yves Tinevez, Ulrike Schulze, Guillaume Salbreux, Julia Roensch, Jean-François Joanny, and Ewa Paluch. Role of cortical tension in bleb growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(44):18581–18586, 2009.
- [53] J Roger Jacobs and John K Stevens. Changes in the organization of the neuritic cytoskeleton during nerve growth factor-activated differentiation of pc12 cells: a serial electron microscopic study of the development and control of neurite shape. *The Journal of cell biology*, 103(3):895–906, 1986.
- [54] J Roger Jacobs and John K Stevens. Experimental modification of pc12 neurite shape with the microtubule-depolymerizing drug nocodazole: a serial electron microscopic study of neurite shape control. *The Journal of cell biology*, 103(3):907–915, 1986.
- [55] Timo Betz, Daniel Koch, Yun-Bi Lu, Kristian Franze, and Josef A Käs. Growth cones as soft and weak force generators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(33):13420–13425, 2011.
- [56] Ammar Azioune, Marko Storch, Michel Bornens, Manuel Théry, and Matthieu Piel. Simple and rapid process for single cell micro-patterning. *Lab on a chip*, 9(11):1640–1642, 2009.
- [57] Manuel Thery, Anne Pepin, Emilie Dressaire, Yong Chen, and Michel Bornens. Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment. *Cell motility and the cytoskeleton*, 63(6):341–355, 2006.
- [58] Jenny Fink, Nicolas Carpi, Timo Betz, Angélique Bétard, Meriem Chebah, Ammar Azioune, Michel Bornens, Cecile Sykes, Luc Fetler, Damien Cuvelier, et al. External forces control mitotic spindle positioning. *Nature cell biology*, 13(7):771–778, 2011.
- [59] Julia Riedl, Alvaro H Crevenna, Kai Kessenbrock, Jerry Haochen Yu, Dorothee Neukirchen, Michal Bista, Frank Bradke, Dieter Jenne, Tad A Holak, Zena Werb, et al. Lifeact: a versatile marker to visualize f-actin. *Nature methods*, 5(7):605–607, 2008.
- [60] Daniel Koch, William J Rosoff, Jiji Jiang, Herbert M Geller, and Jeffrey S Urbach. Strength in the periphery: growth cone biomechanics and substrate rigidity response in peripheral and central nervous system neurons. *Biophysical journal*, 102(3):452–460, 2012.
- [61] E.M. Lifshitz and L.D. Landau. *Theory*. Butterworth-Heinemann, MA, 2000.
- [62] Harish C Joshi, Dan Chu, Robert E Buxbaum, and Steven R Heidemann. Tension and compression in the cytoskeleton of pc 12 neurites. *The Journal of cell biology*, 101(3):697–705, 1985.

-
- [63] William J Tyler. The mechanobiology of brain function. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(12):867–878, 2012.
- [64] Chwee Teck Lim and Ang Li. Mechanopathology of red blood cell diseases-why mechanics matters. *Theoretical and Applied Mechanics Letters*, 1(1):014000, 2011.
- [65] Daniel R Gossett, TK Henry, Serena A Lee, Yong Ying, Anne G Lindgren, Otto O Yang, Jianyu Rao, Amander T Clark, and Dino Di Carlo. Hydrodynamic stretching of single cells for large population mechanical phenotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(20):7630–7635, 2012.
- [66] Sholpan Askarova, Xiaoguang Yang, and James C-M Lee. Impacts of membrane biophysics in alzheimer’s disease: from amyloid precursor protein processing to $\alpha\beta$ peptide-induced membrane changes. *International Journal of Alzheimer’s Disease*, 2011, 2011.
- [67] Anne B Young. Four decades of neurodegenerative disease research: how far we have come! *The Journal of Neuroscience*, 29(41):12722–12728, 2009.
- [68] Rodolphe Perrot and Joël Eyer. Neuronal intermediate filaments and neurodegenerative disorders. *Brain research bulletin*, 80(4):282–295, 2009.
- [69] Elise Spedden, David L Kaplan, and Cristian Staii. Temperature response of the neuronal cytoskeleton mapped via atomic force and fluorescence microscopy. *Physical biology*, 10(5):056002, 2013.

Apéndice A

Protocolos

En esta sección se encuentran descritos los procedimientos básicos para la preparación del cultivo celular y transfección de las muestras experimentales. Se debe tener en cuenta que existen muchas variantes para cada una de las secciones aquí descritas.

A.1. Cultivo celular de células PC12

Cultivo celular es el proceso mediante el cual las células pueden ser cultivadas en condiciones controladas, proporcionando un stock permanente de células. Este proceso me permite realizar experimentos constantemente.

A.1.1. Preparación del medio, colágeno, factor de crecimiento neuronal (NGF)

Medio de cultivo de crecimiento

El medio de cultivo de crecimiento debe contener:

- 6 % de suero de caballo (HS-Horse Serum), previamente inactivado por calor a 56°C en un baño térmico durante 30 minutos (gibco ref. 16050-122).
- 6 % suero fetal bovino (FBS-fetal bovine serum), previamente inactivado por calor a 56°C en un baño térmico durante 30 minutos (gibco ref. 10437-028).
- 1 % antibiótico antimicótico (100X) (gibco ref. 15240-062).
- El resto Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), alto en glucosa + L-glutamina (gibco ref. 12430-047).

El medio de cultivo de crecimiento se prepara en el frasco original de 1000ml de DMEM, por lo tanto, para cumplir con las proporciones del protocolo, es necesario remover previamente 130ml de DMEM del frasco, luego se añaden los 60ml de HS, 60ml de FBS y finalmente 10ml de antibiótico. Una vez preparado el medio almacenar a 4 °C.

Factor de crecimiento neuronal

Para realizar la diferenciación de las células PC12 se utiliza NGF 2.5s (gibco ref. 13257-019). La concentración final deseada de NGF en las muestras es de 50ng/ml. Por lo tanto, diluir los 10µg de NGF del Stock en 2ml de DMEM. Alicuotar esta solución en 20 eppendorf estériles de 500µl, es decir cada eppendorf contendrá 100µl de esta solución. Almacenar a -20°C.

Medio de cultivo de diferenciación

El medio de cultivo para diferenciar las células debe contener:

- 1 % de suero de caballo (HS-Horse Serum), previamente inactivado por calor a 56°C en un baño térmico durante 30 minutos (gibco ref. 16050-122).
- 1 % antibiótico antimicótico (100X) (gibco ref. 15240-062).
- 1 % Solución NGF 2.5s + DMEM.
- El resto Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), alto en glucosa + L-glutamina (12430-047 gibco).

El medio de cultivo de diferenciación se prepara en frascos de centrifugar de 15ml. Añada 100 μ l de HS, 100 μ l de antibiótico y 100 μ l de la solución de NGF + DMEM (1 eppendorf) y 9,7ml de DMEM.

Colágeno

Para obtener volumen total de 10ml de solución de colágeno, disuelva 100 μ l del stock de colágeno (gibco ref. A10644-01) en 9,9ml de solución de ácido acético al 0.02N. Agitar cuidadosamente, sin hacer burbujas (las burbujas destruyen las proteínas en la superficie). Almacenar a 4°C).

A.1.2. Cultivo regular

Las células crecen en un ambiente a 37°C y en una atmosfera con 5% CO₂. Si ellas se encuentran saludables, crecerán adheridas a la superficie del frasco de cultivo celular. Si muchas células se encuentran en suspensión probablemente significa que no están en buena condición. Las células en suspensión también se presentan cuando la concentración de células es demasiado alta.

Cambio de medio de células PC12

El medio de crecimiento debe ser cambiado una vez cada dos días. Remueva el viejo medio, añada medio nuevo para conservar las células en el mismo contenedor.

Resiembra de células PC12

Para mantener la buena condición de las células y evitar que se diferencien (una vez diferenciadas dejarán de multiplicarse), una porción de las células del frasco (1/15) deben ser resembradas a un nuevo frasco de cultivo cuando se encuentren al 60 % de confluencia.

■ Materiales para resembrar:

- Tripsina 0,25 % (1X) Solution (HyClone Cat No.: SH30042.01)
- PBS pH 7,4 (1X) (Phosphate Buffered Saline, gibco ref. 10010-023)
- Medio de crecimiento

■ Procedimiento

Antes de comenzar, calentar en un baño térmico a 37°C la tripsina, el PBS y el medio de crecimiento. El primer paso es remover el medio antiguo (con cuidado de no remover células adheridas a la superficie del frasco), luego lavar con 5ml PBS pre-calentado. Despegar las células del frasco utilizando 1ml de Tripsina, esperar aproximadamente 3 minutos. Agregar al frasco 3ml de medio de crecimiento, pipetear para mezclar muy bien el medio con la tripsina. Tomar los 4ml de solución (células + medio de crecimiento + Tripsina) y colocarlos en un tubo de centrifugar de 15ml. Programar centrifuga en 2000rpm, 25°C y un tiempo de 5 minutos. Una vez centrifugadas las células, botar el medio viejo del tubo de centrifugar. Colocar 5ml de medio de crecimiento nuevo en el tubo de centrifugar que contiene el “pellet” de células. Pipetear reiteradas veces para mezclar las células con el medio nuevo. De esta solución tomar 333µl y colocarlos en un nuevo frasco de cultivo que contenga 5ml de medio de crecimiento nuevo. Los 333µl equivalen 1/15 del frasco anterior (células + medio de crecimiento). Este procedimiento se debe realizar cada 7 días.

Siempre trabajar bajo campana, la cual debe ser previamente esterilizada exponiéndola a radiación UV durante un mínimo de 15 minutos. Luego limpiar con alcohol su superficie y cada instrumento a utilizar en ella.

A.1.3. Preparación de muestras

Preparación de los coverslips y placas de muestra

Para las muestras experimentales se utilizan cubreobjetos de 12 × 12mm y 200µm de espesor.

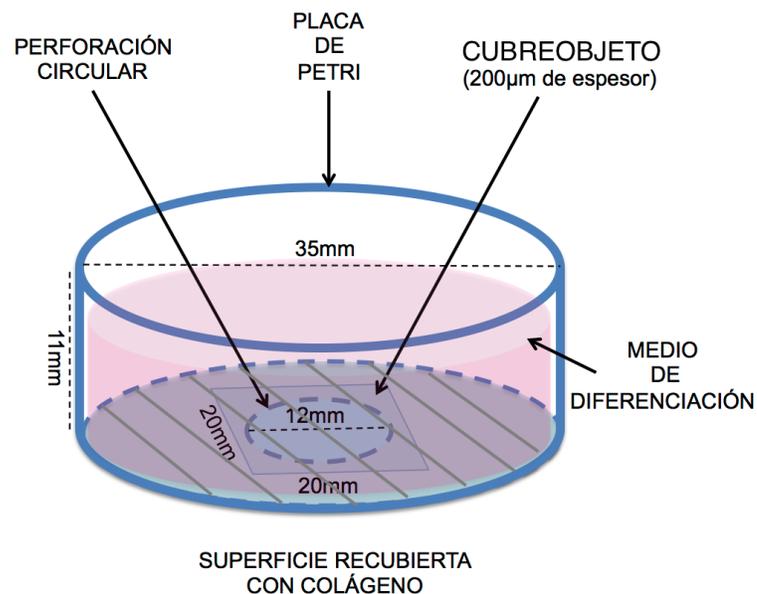
Sumergir los cubreobjetos en alcohol etílico, colocar el contenedor dentro de un baño ultrasónico durante 15 minutos. Secar cada uno utilizando gas comprimido Nitrógeno. Finalmente, guardar

todos los cubreobjetos limpios en una placa petri y sellarla con Parafilm.

Para las muestras se utilizan también placas de petri de 35mm de diámetro y 11mm de altura, a las cuales se les hace una perforación circular de 12mm de diámetro en su base (ver figura A.1).

Una vez modificadas las placas petri, los cubreobjetos tratados son pegados por fuera de la superficie de la placa, utilizando Adhesivo Araldit Epóxico Transparente. Se coloca pegamento en los bordes del orificio circular de la base de la placa y con pinzas se coloca el cubreobjeto. Unir el cubreobjeto con la placa hasta que no queden espacios sin pegamento, para evitar posteriores filtraciones de medio. Dejar secar por 48hrs. A estas placas modificadas les llamamos placas de muestra.

Figura A.1: Placa de muestra



Recubrimiento de las placas de muestra con colágeno

Bajo campana, exponer las placas de muestra a UV durante un mínimo de 15 minutos. Para que las células se adhieran a las placas de muestra, es necesario recubrir los coverslips con la solución de colágeno (ver A.1.1 colágeno). Agregar suficiente material diluido para cubrir las placas de muestra con $5\mu\text{g}/\text{cm}^2$. La placa de muestra tiene una superficie de 10cm^2 aproximadamente. Usar 2ml de la solución será suficiente para cubrir las placas. Dejar incubar a temperatura ambiente durante un mínimo de una hora. Finalmente aspirar la solución y lavar la superficie uti-

lizando PBS (5 veces). Dejar secar a temperatura ambiente durante 5 minutos o hasta que los cubreobjetos se encuentren secos.

Preparación de Cultivo en las superficies de colágeno

El día que las células son resembradas (ver sección A.1.2) es el día que se preparan las muestras. A cada una de las placas agregar una gota de $10\mu\text{l}$ con la concentración de solución (células + medio viejo) necesaria para obtener una densidad final de 20,000 células en 2ml de medio de crecimiento. Para obtener la densidad deseada las células son contadas utilizando una cámara de Neubauer. Llevar las placas de muestra (con la gota $10\mu\text{l}$) a la incubadora durante 30 minutos. Finalmente y con mucho cuidado, colocar los 2ml de medio de diferenciación (ver A.1.1) y llevar a la incubadora nuevamente. Después de 3 a 5 días de cultivo bajo estas condiciones, las neuritas de PC12 alcanzan aproximadamente $200\mu\text{m}$ de largo.

A.2. Transfección de células PC12

A.2.1. Transformación de bacterias competentes

Materiales:

- Bacterias competentes E.coli DH5 α
- Vector de expresión mEGFP-Lifeact-7 (Addgene plasmid ref. 54610)
- Mercaptoetanol (1 : 10)
- Caldo de cultivo LB
- Agitador (Shaker) a 37°C
- Baño termostático a 42°C
- Estufa a 37°C
- Antibiótico
- Placa petri

- LB agar

Procedimiento:

- Descongelar las bacterias en hielo.
- Añadir $1\mu\text{l}$ de plásmido de interés a transformar (mEGFP-Lifeact-7). Pipetear enérgicamente para mezclar el contenido.
- Incubar durante 30 minutos en hielo.
- Dar choque térmico de 1 minuto en baño térmico a 42°C .
- Incubar durante 2 minutos en hielo.
- Añadir $600\mu\text{l}$ de Caldo LB al tubo de células e incubar durante 45 minutos en el agitador a 37°C .
- Tomar $10\mu\text{l}$ de la mezcla y sembrar en una placa con el antibiótico indicado.
- Incubar toda la noche en estufa a 37°C .

A.2.2. Purificación de DNA plasmidial con kit Minipress E.N.Z.A (Omega).

A partir de cultivos de bacteria E.coli DH5 α , en caldo LB en falcon de 50ml ($15\text{ml}+15\mu\text{l}$ de antibiótico (ampicilina 100mg/ml o kanamicina 60mg/ml), se procede con:

- Centrifugar los tubos a 2500rpm por 10min a RT.
- Descartar sobrenadante y sobre un papel absorbente, posicionar boja a bajo los tubos.
- Resuspender pellet con $500\mu\text{l}$ de Solución I. Tomar la mezcla y colocarla en un tubo epp. De 2ml
- Agregar $500\mu\text{l}$ de Solución II, mezclar manualmente.
- Incubar 2 – 3min.
- Agregar $700\mu\text{l}$ de Solución III. Mezclar manualmente.
- Centrifugar por 10 min a 12.000rpm a RT

- Tomar sobrenadante y llevarlo a otro epp. de 2ml.
- Centrifugar por 6min a 10,000rpm a RT
- Tomar 700 μ l del sobrenadante y agregarlo a la columna de purificación.
- Centrifugar por 1min a 10.000rpm a RT.
- Descartar el líquido del tubo colector.
- Tomar 700 μ l del sobrenadante y agregarlo a la columna de purificación.
- Centrifugar por 1min a 10.000rpm a RT.
- Descartar el líquido del tubo colector.
- Agregar 500 μ l de buffer HBC en la columna.
- Centrifugar por 1min a 10.000rpm a RT. Eliminar el líquido del tubo colector.
- Agregar 700 μ l de DNA wash buffer, centrifugar por 30s a 10,000rpm a RT y eliminar el líquido del tubo colector. (repetir 2 veces)
- Centrifugar la columna por 2min a 10,000rpm a RT
- Posicionar la columna dentro de un tubo epp de 1,5ml sin tapa, y agregar 90 μ l de Buffer de Elución.
- Incubar por 1min a RT.
- Centrifugar la columna por 1min a 10,000rpm a RT
- Tomar el líquido eluido y agregarlo a la columna.
- Centrifugar la columna por 1min a 10,000rpm a RT
- Tomar el volumen eluido y agregarlo a un tubo epp de 1,5ml ya rotulado para guardarlo a -20°C .

A.2.3. Preparación placa de cultivo de 24 pocillos

El día que las células son resembradas (ver A.1.2) es el día que se preparan las placas de 24 a las que se les aplicará el tratamiento para transfectar las células PC12. Tomar 50 μ l de la solución que contiene el tubo de centrifugar (células + medio viejo) y sembrarlas en una placa de cultivo de 24 pocillos. Al menos sembrar 4 pocillos.

A.2.4. Transfección con el plásmido mEGFP-Lifeact-7

Los materiales a usar son:

- Lipofectamina 2000 (Invitrogen ref. 11668-019)
- DMEM
- Vector de expresión mEGFP-Lifeact-7 (Addgene plasmid ref. 54610)

Pasos para realizar la transfección

En un tubo eppendorf de $1,5\mu\text{l}$, mezclar $1\mu\text{g}$ del plásmido mEGFP-Lifeact-7 con $50\mu\text{l}$ de DMEM, resuspender al menos 20 veces.

En otro tubo eppendorf de $1,5\mu\text{l}$, mezclar $2\mu\text{l}$ de Lipofectamina con $50\mu\text{l}$ de DMEM, resuspender al menos 20 veces. Dejar reposar ambos tubos eppendorf durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Al tubo eppendorf que contiene el plásmido se le añaden $50\mu\text{l}$ de la solución Lipofectamina 2000 y DMEM. Resuspender al menos 20 veces y dejar reposar la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Para dar paso a la transfección, las células de la placa de cultivo de 24 pocillos, deben tener entre 30 – 40 % de confluencia.

Con una pipeta, tomar todo el contenido de la mezcla del plásmido-Lipofectamina y añadirlo al pocillo correspondiente, cuidando de que todo el contenido quede dentro del pocillo. Agitar suavemente. Dejar incubar por 6 horas.

A.2.5. Preparación de muestras de células PC12 transfectadas

Cumplidas las 6hrs de incubación, resembrar las células transfectadas en los pocillos recubiertos con colágeno (ver A.1.3). Para esto es necesario remover el medio del pocillo, lavar con $500\mu\text{l}$

de PBS. Luego levantar las células utilizando $100\mu\text{l}$ de Tripsina, una vez despegadas las células (1 minuto aproximadamente) agregar $500\mu\text{l}$ de medio de crecimiento y resuspender 10 veces. Del pocillo tomar el volumen necesario para obtener una concentración final en la placa de muestra de 10,000 células en 2ml de medio de crecimiento. Llevar cada placa al incubador y esperar 30 minutos. Finalmente agregar los 2ml de medio de crecimiento a cada placa de muestra. Al día siguiente remover el medio de crecimiento y agregar 2ml de medio de diferenciación.

A.3. Línea celular estable

Aplicar el tratamiento de transfección a las células PC12 tal como se indica en la sección A.1.1. Luego de las 6 horas de incubación, resemar todas las células en una placa de cultivo de 96 pocillos (véase sección A.1.2). Al día siguiente agregar a cada pocillo 1 % del antibiótico geneticina (60 mg/ml) (cellgro G418 Sulfate, ref. 61-234-RF). La geneticina es un antibiótico de selección, que permite crear una línea celular fluorescente. Todas las células que han incorporado el plásmido al núcleo, son resistentes al antibiótico, de manera contraria, las células que no han incorporado el plásmido, mueren. Por lo tanto, el medio de crecimiento debe incluir siempre 1 % de geneticina. Cuando las células se encuentren al 60 % de confluencia, observar la placa bajo el microscopio, y elegir el pocillo que presente mayor densidad de células fluorescentes. Resembar todas las células del pocillo seleccionado en uno de los pocillos de una placa de cultivo de 24. Cambiar medio una vez por semana. Una vez alcanzado el 60 % de confluencia resemar el total de células en una placa de cultivo de 6 pocillos. Cambiar medio cada dos días y una vez por semana resemar todas las células a una nueva placa. Al llegar a confluencia, resemar por completo el pocillo en un frasco de cultivo de 5ml . Seguir este procedimiento hasta tener 5 frascos de cultivo. Finalmente congelar las células de cada frasco en sus respectivos crioviales (ver sección A.6).

Una vez que tenemos la línea celular fluorescente estable, ya no es necesario transfectar las células cada vez que se prepara una muestra, desde este punto se preparan las muestras utilizando la línea estable utilizando el mismo protocolo descrito previamente en A.1.3 agregando al medio de cultivo, geneticina.

A.4. Fijación células con Paraformaldehido

El día del experimento, remover el medio de diferenciación/crecimiento de las placas de muestra. Agregar cuidadosamente 1ml de Paraformaldehido al 4 % previamente calentado en un baño térmico a 37°C . Esperar 30 minutos antes de comenzar los experimentos.

A.5. Preparación Latrunculin-A

Latruncilin-A ($L163 - 100\mu\text{g}$ Sigma-Aldrich) viene en forma de polvo, en una ampolla que contienen $100\mu\text{g}$, almacenarla a -20°C . Para obtener una concentración final de trabajo de $1\mu\text{M}$ diluir los $100\mu\text{g}$ en $273\mu\text{l}$ de DMSO, esto da como resultado una concentración de almacenamiento igual a 1mM . Luego alicuotar esta solución en 5 tubos eppendorf con un volumen de $50\mu\text{l}$ de solución.

A.6. Procedimiento para congelar células PC12

Materiales y químicos a usar:

- 1 criovial de 2ml por cada frasco de cultivo.
- DMSO (winkler LTDA ref. BM-0660)
- FBS

Procedimiento:

Tripsinizar las células de cada frasco a congelar como se hace regularmente (ver sección A.1.2). Una vez centrifugadas las células, remover el medio viejo del tubo y agregar 4ml de FBS, pipetear energéticamente. En cada criovial colocar $900\mu\text{l}$ de esta solución y al último agregar $100\mu\text{l}$ de DMSO, pipetear energéticamente. Llevar cada criobial a -20°C durante 2 horas. Una vez transcurrido este tiempo, almacenar los criobiales a una temperatura de -80°C .

A.7. Cultivo celular de neuronas DRG.

A.7.1. Soluciones y medio de cultivo

- HBSS-Ca²⁺-Mg²⁺
- MEM con sales de Earle (gibco cat #11095)
- Penicilina/Estreptomicina (stock 100X, concentración final 100 μ g/mL)
- MEM-vit (stock 100X)
- NGF (stock 1000X, concentración final 100ng/mL)
- MC (medio completo): MEM 10 % FBS, Pen/Strep 1X, MEM-vit 1X
- Mix colagenasa XI (650U/mL, ~ 0,66mg/mL)/Dispasa (5U/mL, ~ 3mg/mL)
- Agua desionizada autoclavada.
- Poli-L-lisina
- FBS

Preparar 16ml de medio completo, las cantidades a usar son:

- 14,2ml de MEM con Earles's BSS (gibco, 31095 – 029)
- 160 μ l de MEM-vit (gibco 11120-037)
- 160 μ l de pen/strep (gibco PL15140122)
- 1,6ml de FBS (gibco 16000 – 044)
- 16 μ l de NGF (SIGMA N–0513)

Sacrificio del animal: En la zona de precultivos, un ratón, de la cepa de interés, de 21 a 45 días, se sacrifica utilizando ambiente saturado de CO₂ bajo campana de extracción de gases.

Extracción de los ganglios:

INC-Mix	Conc (mM)	Pm (g/mol)	Cant. p/100ml
NaCl	155	58,44	0,9g
K ₂ HPO ₄	1,5	174,18	26mg
HEPES	10	238,3	238mg
Glucosa	5	180	90mg
H ₂ O			c.s.p 100ml

1. En la zona de precultivos, se empapa con alcohol al 70 % al ratón recién sacrificado (zona de cuello y cabeza), se decapita con tijera y se lleva sólo la cabeza a la campana de cultivos en placa petri.
2. Con tijeras se realiza un corte longitudinal en la piel que cubre el cráneo y se retira hasta dejarlo completamente visible. A continuación, con tijeras de tamaño intermedio se realiza un corte longitudinal en el cráneo y dos cortes en la base de éste, que permitan levantar la cubierta. Con cuidado se retira el cerebro utilizando pinzas y/o tijeras y se dejan expuestos los ganglios trigéminos, que se ubican en la base del cráneo.
3. Con tijera de 2,5mm de filo, se cortan las tres ramas principales de cada ganglio y éstos se retiran con pinzas.
4. Los ganglios se depositan en una placa P35 con HBSS frío, donde se limpian los restos de tejido conectivo y de las tres ramificaciones.
5. Posteriormente los ganglios se depositan en una placa de vidrio de base cóncava. Esta placa debe contener 0,5ml del siguiente medio:
INC-mix, colagenasa tipo XI (0,66mg/ml) y dispasa (3mg/ml).
Ajustar a pH 7,4 con NaOH, filtrar y agregar 100 µl de penicilina/estreptomicina. Congelar el alícuotas de 10 a 12ml. La digestión enzimática se realiza a 37°C y 5 % de CO₂ durante 40 minutos.
6. La disociación mecánica se realiza con una pipeta Pasteur de vidrio previamente ambientada con medio completo, y a la cual se le pulió mediante flameado la punta previamente. Observación: Se debe agregar 500µl de medio completo antes de comenzar la disociación para neutralizar la actividad enzimática con el suero contenido en el medio. Se realizan 6 a 12 repeticiones pasando la solución hacia arriba y hacia abajo cuidando no formar burbujas. El tejido debe quedar completamente en suspensión, pasando por un cell strainer de 70µm, para recuperar la suspensión celular en un tubo cónico de 15ml.
7. Posteriormente se añade al tubo medio de cultivo hasta completar 4 ml de volumen total y se centrifuga a 2000rpm (Epp) durante 10 min. Tras lo cual se aspira el sobrenadante mediante

el uso del sistema de vacío habilitado en la campana y se resuspende el pellet en $25\mu\text{l}$ de medio de cultivo por cristal.

8. La resuspensión se deposita repartida en 5 a 6 coverslips de 6 mm de diámetro previamente tratados con Poly-L-Lysine 0,01 % (2 – 3 h con poly-L-lysine y lavados 2 veces con H₂O estéril) y colocados en una placa P35. Observación: Bajo el microscopio se vera mucha “suciedad” (mielina) y un número medio de células.
9. El cultivo se deposita en el incubador durante 4-6hrs tras lo que se le añade 2ml de medio de cultivo. Observación: La mayor parte de suciedad quedará flotando en el medio y un número importante de células quedarán pegadas al cristal. Se extrae la suciedad por succión con pipeta de 1ml y se agrega 1ml más de medio completo. El cultivo pasa al incubador O.N. o puede ser utilizado inmediatamente. Se recomienda su uso dentro de las primeras 36hrs.

Apéndice B

Selección del plásmido

Para realizar la transfección de las células PC12 fueron adquiridos dos plásmidos; el GFP-UtrCH (Addgene Plasmid ref. 6737) y mEGFP-Lifeact-7 (Addgene Plasmid ref. 54610). La elección del plásmido se basa en dos criterios, el primero recae en la eficiencia de transfección y el segundo en la tasa de decaimiento de la fluorescencia en el tiempo.

B.0.2. Eficiencia de transfección

El estudio sobre la eficiencia del plásmido para la transfección de células PC12, fué realizado bajo las mismas condiciones (densidad de células y concentración plásmidos, lipofectamina y DMEM), para ambos plásmidos, utilizando los mismos procedimientos y tiempos de espera descritos previamente en el anexo A, sección A.2).

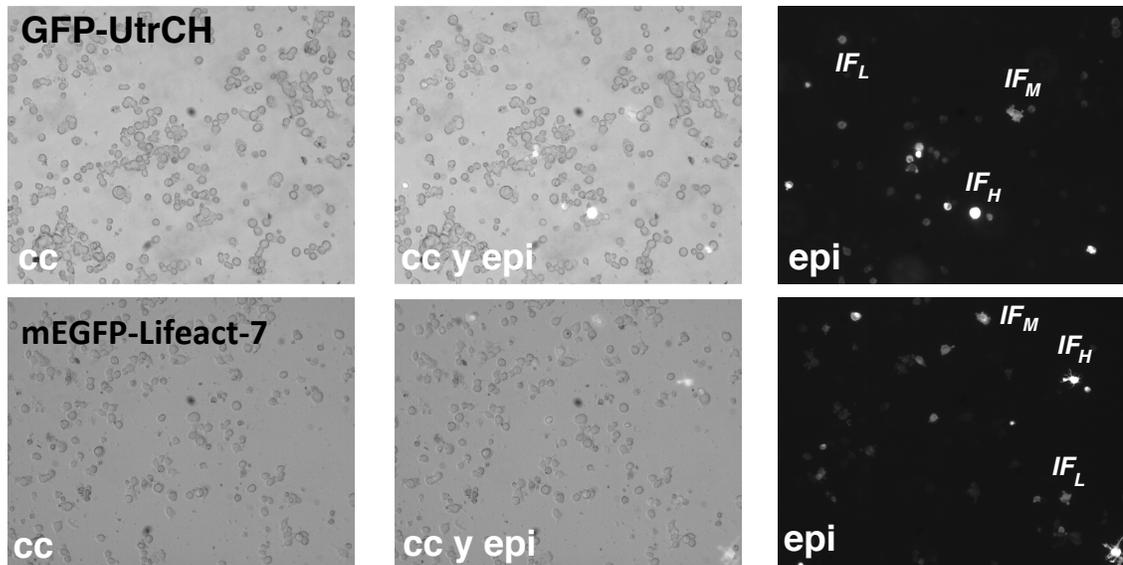


Figura B.1: Imágenes de campo claro y fluorescencia (cc y epi) y fluorescencia (epi) para células PC12 transfectadas con GFP-UtrCH y mEGFP-Lifeact-7. Las imágenes fueron realizadas con una magnificación del microscopio de 10X.

La figura B.2 presenta un gráfico de barras que muestra el porcentaje de células fluorescentes para distintas concentraciones del plásmido, donde 1X hace referencia a la concentración indicada por el protocolo descrito en A, sección A.2, 2X y 3X significa que se ha utilizado el doble y el triple de la cantidad indicada, respectivamente. Para obtener el porcentaje de células fluorescentes, se cuenta el total de células que se observa en las imágenes de campo claro (ver figura B.1 cc) y luego se cuenta el número de células fluorescentes (ver figura B.1 epi). Este proceso fue realizado para 10 campos de visualización diferentes por cada concentración y para cada plásmido, es decir se analizaron un total de 60 imágenes.

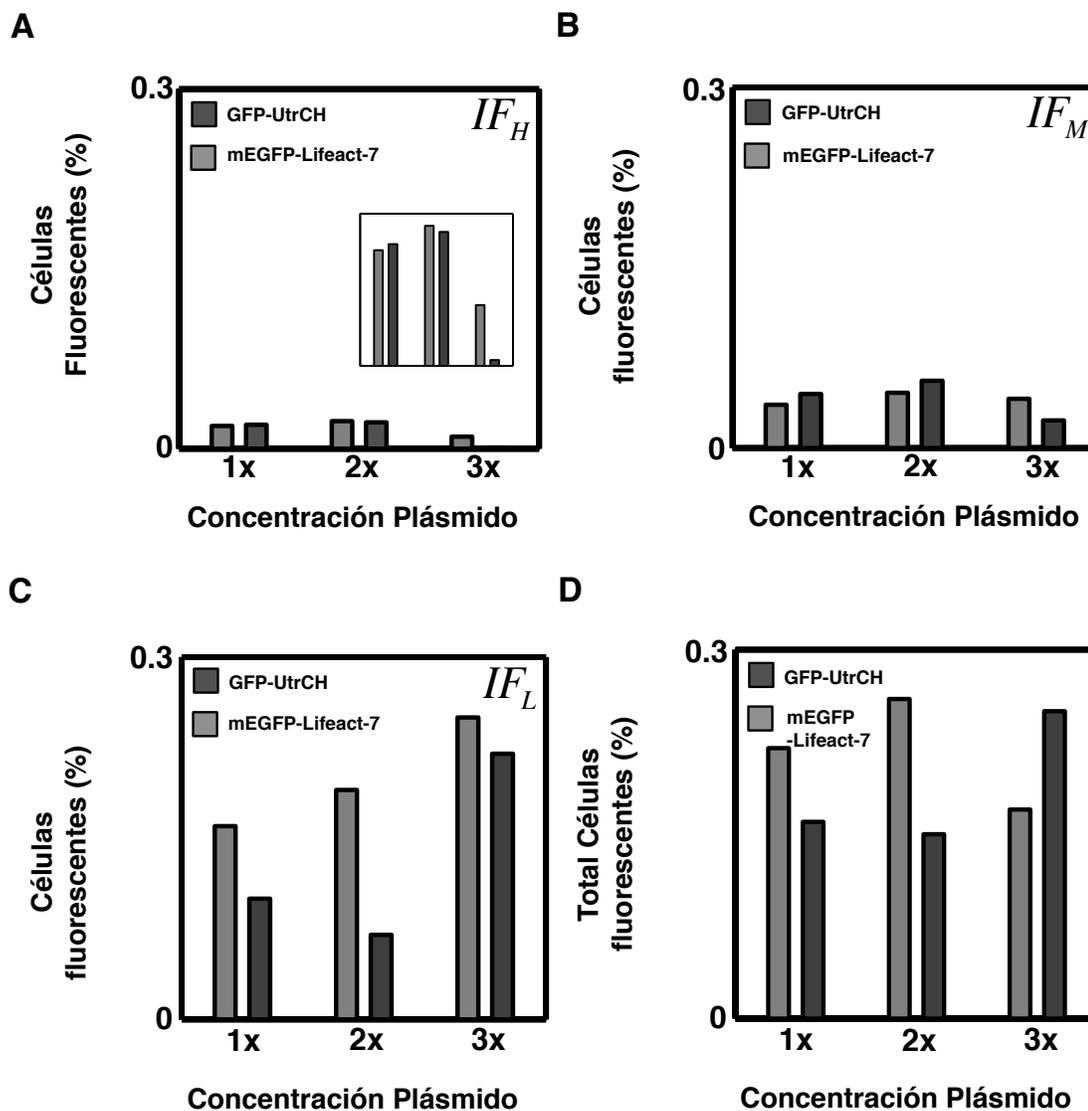


Figura B.2: Gráfico de barras que presenta el porcentaje de células fluorescente en función del tipo y concentración del plásmido. Las figuras A), B), C), D) muestran el porcentaje de células que presentan una intensidad de fluorescencia alta (IF_H), media (IF_M), baja (IF_L) y el total, respectivamente, en función de la concentración del plásmido.

B.0.3. Decaimiento de fluorescencia en el tiempo

Para el estudio de la tasa de decaimiento de la fluorescencia, se realizó un video de una célula fluorescente a una exposición continua de la luz de excitación, durante un tiempo de 10 minutos. Los resultados se muestran en la figura B.3, donde B.3C representa la curva de decaimiento para las células PC12 mostradas en B.3A.

La curva de diamantes color gris y la curva de círculos color negro, representan la intensidad de fluorescencia normalizada promedio de la sección de interés (rectángulo segmentado color rojo), para células transfectadas con los plásmidos GFP-UtrCH y mEGFP-Lifeact-7 respectivamente. La curva segmentada color rojo representa el ajuste exponencial $N_0e^{-\lambda_d t}$ donde N_0 y λ_d son constantes y representan la intensidad de fluorescencia inicial y la constante de decaimiento exponencial, respectivamente.

Para el caso, de la célula transfectada con el plásmido mEGFP-Lifeact-7, el tiempo de decaimiento de la intensidad de fluorescencia expresado como $1/\lambda_d$ es igual a 53 segundos aproximadamente, en cambio la intensidad de fluorescencia para la célula transfectada con GFP-UtrCH decae más rápido, en un tiempo de 46 segundos aproximadamente.

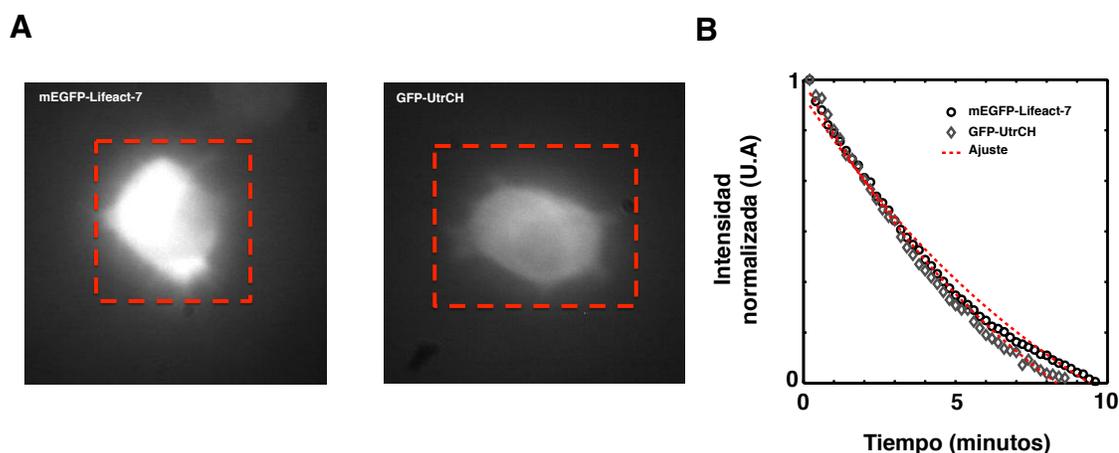


Figura B.3: A) Imágenes de células PC12 transfectadas con GFP-UtrCH y mEGFP-Lifeact-7. Las imágenes fueron realizadas con una amplificación del microscopio de 40X. El rectángulo segmentado color rojo representa el área de análisis. B) Curva de decaimiento de la intensidad de fluorescencia promedio en función del tiempo, para las células mostradas en A. Las imágenes fueron capturadas durante un tiempo de 10 minutos a 9 cuadros por segundo, bajo las mismas condiciones de intensidad de luz de excitación y a una exposición continua.

B.0.4. Conclusión

Como se puede apreciar para el caso del plásmido GFP-UtrCH mostrado en la imagen B.1epi, la célula que presenta una intensidad de fluorescencia alta es una imagen saturada, sin embargo, de las células que presentan una intensidad media y baja es posible apreciar la forma de la célula. Por esta razón, el plásmido seleccionado es mEGFP-Lifeact-7, ya que presenta el mayor porcentaje de células con intensidad baja y media (ver figura B.2C y D). Además, el decaimiento de la intensidad ocurre en un tiempo mayor que para el plásmido GFP-UtrCH, lo que significa que

el proceso de fotoblanqueo ocurre de manera posterior. Sin embargo, este último criterio no es un factor culminante debido a la estrecha diferencia.

Apéndice C

Desarrollo matemático del modelo

La ecuación que describe la dinámica de una cuerda de densidad lineal ρ_l , tensión axial σ_\perp , rigidez de flexión \mathcal{B} y fricción interna β , inmersa en un fluido de viscosidad dinámica η es:

$$\rho_l \partial_t^2 h + \eta_e \partial_t h = \sigma \partial_x^2 h - \mathcal{B} \partial_x^4 h \quad (\text{C.1})$$

Donde $\eta_e = 1/2((\eta/\sqrt{2\pi}) + \beta)$ es la viscosidad efectiva [28]. Esta ecuación representa el balance de fuerzas sobre una cuerda, el cual considera la inercia, la disipación (interna y externa), el estiramiento y el doblamiento que experimenta. Descomponiendo la amplitud $h(x, t)$ en j modos de Fourier, con amplitud h_{q_j} , vector de onda q_j y frecuencia angular Ω_j tenemos que: $h(x, t) = \sum_{q_j} h_{q_j} e^{i(q_j x - \Omega_j t)}$.

Las derivadas parciales correspondientes son:

$$\partial_t^n h = \sum_{q_j} (i\Omega_j)^n h_{q_j} e^{i(q_j x - \Omega_j t)} \quad (\text{C.2})$$

$$\partial_x^n h = \sum_{q_j} (iq_j)^n h_{q_j} e^{i(q_j x - \Omega_j t)} \quad (\text{C.3})$$

Reemplazando en la ecuación C.1 queda:

$$\sum_{q_j} (-\rho_l \Omega_j^2 - i\eta_e \Omega_j + \sigma q_j^2 + \mathcal{B}q_j^4) h_{q_j} e^{i(q_j x - \Omega_j t)} = 0. \quad (\text{C.4})$$

Haciendo el producto interno obtenemos que:

$$\sum_{q_j q_k} f(\Omega_j, q_j) f(\Omega_k, q_k)^* h_{q_j} h_{q_k}^* e^{i(q_j x - \Omega_j t)} e^{-i(q_k x - \Omega_k t)} \delta_{ij} = 0 \quad (\text{C.5})$$

Donde $f(\Omega_j, q_j) = -\rho_l \Omega_j^2 - i\eta_e \Omega_j + \sigma q_j^2 + \mathcal{B}q_j^4$. Para $j = k$:

$$\sum_{q_j} |f_j|^2 |h_{q_j}|^2 = 0 \quad (\text{C.6})$$

Siempre se cumple que $|h_{q_j}|^2 \neq 0$, por lo tanto $|f_j|^2 = 0$, esto es:

$$|-\rho_l \Omega_j^2 - i\eta_e \Omega_j + \sigma q_j^2 + \mathcal{B}q_j^4|^2 = 0 \quad (\text{C.7})$$

Por lo tanto la relación de dispersión queda:

$$\Omega_j = \frac{\mathcal{B}q_j^4 + \sigma q_j^2}{i\eta_e} = -i\omega_j \quad (\text{C.8})$$

Donde ω_j es la parte compleja de la relación de dispersión. Para número de Reynolds pequeño, el término $\rho_l \Omega_j^2$ es despreciado. Por otro lado, hemos aproximado la contribución de la viscosidad η y la disipación interna β de la siguiente manera: La disipación del fluido que rodea la neurita por unidad de longitud es del orden de $\eta \approx 10^{-3}$ Pa·s y la viscosidad interna $\beta \approx 1,1$ Pa·s, este valor se determina a partir del seguimiento de vesículas individuales a lo largo de axones de células PC12 [18]. Dado que β es tres órdenes de magnitud mayor que η , este último se desprecia, por lo tanto, la viscosidad efectiva queda $\eta_e \sim \beta/2 \approx 0,55$ Pa·s. La expresión final para la relación de dispersión se reduce a:

$$\Omega_j = \frac{\sigma q_j^2 + \mathcal{B}q_j^4}{i\eta_e} = \frac{\sigma q_j^2 + \mathcal{B}q_j^4}{i\beta/2} = -i\omega_j \quad (\text{C.9})$$

Por otro lado, en el límite de pequeños desplazamientos, la energía elástica para estirar y/o doblar una neutira, en términos de la amplitud h , está descrito por el clásico Hamiltoniano:

$$E = \int \left(\frac{1}{2} \mathcal{B} (\nabla^2 h)^2 + \frac{1}{2} \sigma (\nabla h)^2 \right) dl \quad (\text{C.10})$$

Donde $\delta l \approx \delta x$. Podemos expandir h en términos de los vectores de onda q_j . Haciendo el análisis para la coordenada x , tenemos que $h(x) = \sum_{q_j} h_{q_j} e^{iq_j x}$. Calculando el laplaciano y el gradiente para $h(x)$ nos queda que:

$$\nabla^2 h = \sum_{q_j} (iq_j)^2 h_{q_j} e^{iq_j x} \quad (\text{C.11})$$

$$\nabla h = \sum_{q_j} (iq_j) h_{q_j} e^{iq_j x} \quad (\text{C.12})$$

Reemplazando estas expresiones en la ecuación C.10:

$$E = \int \frac{1}{2} \left[\mathcal{B} \left(\sum_{q_j} (iq_j)^2 h_{q_j} e^{iq_j x} \right)^2 + \sigma \left(\sum_{q_j} (iq_j) h_{q_j} e^{iq_j x} \right)^2 \right] \delta x \quad (\text{C.13})$$

$$= \int \frac{1}{2} \sum_{q_j q_k} \left[\mathcal{B} \left(q_j^2 q_k^2 h_{q_j} h_{q_k} e^{i(q_j x + q_k x)} \right) \right. \quad (\text{C.14})$$

$$\left. - \sigma \left(q_j q_k h_{q_j} h_{q_k} e^{i(q_j x + q_k x)} \right) \right] \delta x$$

$$= \frac{1}{2} \sum_{q_j q_k} \left[\left(\mathcal{B} q_j^2 q_k^2 - \sigma q_j q_k \right) h_{q_j} h_{q_k} \int e^{i(q_j x + q_k x)} \delta x \right] \quad (\text{C.15})$$

$$(\text{C.16})$$

Intercambiando la sumatoria por la integral y utilizando la definición de la delta de dirac:

$$\int_L e^{i(q_j+q_k)x} \delta x = L \delta_{q_j, -q_k} \quad (\text{C.17})$$

La ecuación C.16 queda:

$$E = \frac{L}{2} \sum_{q_j, -q_j} \left(\mathcal{B}q_j^4 + \sigma q_j^2 \right) h_{q_j} h_{-q_j} \quad (\text{C.18})$$

$$(\text{C.19})$$

Debido a que $h(x)$ es real, $h_{-q_j} = h_{q_j}^*$, por lo tanto $h_{q_j} h_{-q_j} = |h_{q_j}|^2 = |h_{q_j}|^2$. Entonces la ecuación C.19 queda:

$$E = \frac{L}{2} \sum_{q_j} \left(\mathcal{B}q_j^4 + \sigma q_j^2 \right) |h_{q_j}|^2 \quad (\text{C.20})$$

$$(\text{C.21})$$

Debido a la presencia del baño térmico, todos los modos son excitados, y cada modo q_j contribuye con una energía térmica igual a $1/2k_bT$, donde k_b es la constante de Boltzmann ($k_b = 1,38065 \times 10^{-23}$ J/K) y T es la temperatura del medio. Luego la amplitud cuadrática de las fluctuaciones queda escrita como:

$$\therefore |h_{q_j}|^2 = \frac{k_b T}{L (\mathcal{B}q_j^4 + \sigma q_j^2)} \quad (\text{C.22})$$

Así como los modos son excitados por el medio que rodea la neurita, también son amortiguados por este mismo. Por lo tanto, la función de autocorrelación del modo q_j decae como $\langle h_{q_j}(t) h_{q_j}(0) \rangle = |h_{q_j}|^2 e^{-\omega(q_j)t}$ donde $\omega(q_j)$ es la parte compleja de la relación de dispersión. En el espacio de Fourier, la función de autocorrelación es igual a la densidad de potencia espectral (*PSD*), integrando todas las contribuciones de los modos q_j , la *PSD* total es:

$$PSD = \frac{L}{2\pi} \int_0^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \left(\langle h_q(t) h_q(0) \rangle e^{i\omega t} dt \right) dq \quad (C.23)$$

$$= \frac{L}{2\pi} \int_0^{\infty} dq \int_{-\infty}^{\infty} |h_q|^2 e^{-\omega(q)t} e^{i\omega t} dt \quad (C.24)$$

$$= \frac{1}{2\pi} \int_0^{\infty} |h_q|^2 dq \underbrace{\int_{-\infty}^{\infty} e^{-\omega(q)t} e^{i\omega t} dt}_{\mathcal{L}\{f(t)\}} \quad (C.25)$$

Donde $\mathcal{L}\{f(t)\}$ es la transformada bilateral de Laplace para la función $f(t) = e^{-\omega(q)t}$. Reemplazando el valor de la transformada obtenemos:

$$PSD = \frac{L}{2\pi} \int_0^{\infty} |h_q|^2 \frac{2\omega(q)}{\omega^2(q) + \omega} dq \quad (C.26)$$

Reemplazando la expresión encontrada para la amplitud de las fluctuaciones $|h_{q_j}|^2$ (ecuación C.22) y la parte compleja de la relación de dispersión (ecuación C), la expresión final para la PSD queda:

$$PSD = \frac{\eta_e k_b T}{\pi} \int_0^{\infty} \frac{dq}{(\mathcal{B}q^4 + \sigma q^2)^2 + (\eta_e \omega)^2} \quad (C.27)$$

Sin embargo, este resultado está incompleto. El citoesqueleto de una neurita, está cubierto por la membrana plasmática, que también experimenta fluctuaciones térmicas debido al medio que la rodea. Por lo tanto, la amplitud de las fluctuaciones ($h(x, t)$) es una contribución de las fluctuaciones de la neurita ($h_a(t)$) y de la membrana ($h_\delta(t)$). Estas dos cantidades no tienen correlación. Por lo tanto los términos cruzados son iguales a cero. Esto significa que sólo la transformada de Fourier de la neurita pura y la membrana pura contribuyen a la PSD total (ver ecuación C.28).

$$\begin{aligned}
h(t) &= h_a(t) + h_\delta(t) \\
\langle h(t)h(0) \rangle &= \langle (h_a(t) + h_\delta(t))(h_a(0) + h_\delta(0)) \rangle \\
&= \langle h_a(t)h_a(0) \rangle + \langle h_\delta(t)h_\delta(0) \rangle + \underbrace{\langle h_a(t)h_\delta(0) \rangle}_0 + \underbrace{\langle h_\delta(t)h_a(0) \rangle}_0 \\
\langle h(t)h(0) \rangle &= \langle h_a(t)h_a(0) \rangle + \langle h_\delta(t)h_\delta(0) \rangle
\end{aligned} \tag{C.28}$$

Entonces, una expresión completa para la PSD toma en cuenta también las fluctuaciones de la membrana plasmática de espesor δ (ver figura 4.2) que tiene una tensión cortical σ_\perp y bending B_\perp . Por lo tanto la PSD total queda expresada como:

$$\begin{aligned}
PSD^* &= PSD + PSD_\perp \\
&= \frac{\eta_e k_b T}{\pi} \int_0^\infty \frac{dq}{(Bq^4 + \sigma q^2)^2 + (\eta_e \omega)^2} + \frac{4\eta_e^c k_b T}{\pi} \int_0^\infty \frac{dq}{(B_\perp q^3 + \sigma_\perp q)^2 + (4\eta_e^c \omega)^2}
\end{aligned} \tag{C.29}$$

Donde PSD y PSD_\perp da cuenta de las fluctuaciones de la neurita y la membrana respectivamente [28], y $\eta_e^c = 1/2(\eta + \eta_c)$ es la viscosidad efectiva del citosol [28, 50], compuesta por la viscosidad externa del medio η y la viscosidad interna del citosol η_c .

La ecuación C.29 representa las fluctuaciones laterales de la neurita, que en principio tienen una componente en x y en z . Debido al diseño del instrumento, sólo tenemos acceso a la componente x . Por la geometría axial del problema, x y z son componentes ortogonales que contienen la misma información para el análisis de fluctuaciones. Sin embargo, las fluctuaciones en z son suprimidas por la presencia del cubreobjeto.

La contribución de cada término de la PSD^* está limitada por las características biomecánicas y geométricas de la neurita. De hecho, su largo fija el valor para q mínimo que puede contribuir a la PSD^* , que es del orden de $q_{min} \sim 1/L$. Por otro lado, el radio de la neurita fija el máximo valor para q del orden de $q_{max} \sim 1/r$. Estos dos límites están relacionados sólo con la tensión axial y la rigidez de flexión de la neurita. Para el caso de la membrana plasmática, el modo más bajo que contribuye, está relacionado con el perímetro de la membrana, esto es $q_{\perp min} \sim 1/r$ y el modo más alto se relaciona con el espesor de membrana, $q_{\perp max} \sim 1/\delta$

Apéndice D

Cálculo del aumento de temperatura debido a la presencia del láser infrarrojo

Las células neuronales cambian sus propiedades mecánicas en respuesta a estímulos físicos externos tales como; las variaciones en la temperatura externa, la rigidez del sustrato de crecimiento, entre otras [69]. Por ejemplo, las neuronas corticales muestran un aumento significativo en el módulo de elasticidad media en una disminución de la temperatura ambiente de 37°C a 25°C. Estos resultados demuestran la importancia de considerar los efectos de temperatura en la investigación de la dinámica del citoesqueleto en las células [69].

En este capítulo se presenta un cálculo aproximado sobre el cambio de temperatura del medio en que se encuentra la neurita, en la zona de enfoque del láser, provocado por la absorción de energía del láser infrarrojo.

Para determinar la cantidad de energía absorbida por un material, se requiere la capacidad calorífica del material de absorción (C_p). La capacidad calorífica, es la cantidad de calor necesario para elevar la temperatura del material en 1°C. La energía absorbida produce un aumento de la temperatura (T). Para un tiempo t , en términos del cambio de temperatura y la capacidad calorífica, la potencia absorbida está dada por (Kingston y Jessie, 1988):

$$P_{absorvida} = \frac{\Delta T}{t} \times C_p m \quad (D.1)$$

Donde $P_{absorvida}$ es la potencia absorbida por la muestra en unidades de watt (W), C_p es calor específico del agua (a $25^\circ C$ es igual a $4,184 J/g^\circ C$), m es la masa del medio en unidades de *gramos*, ΔT es el cambio de temperatura provocado por la absorción de energía y t es el tiempo transcurrido en unidades de *segundos*. Por lo tanto el cambio de temperatura que experimenta la muestra está dado por:

$$\Delta T = \frac{P_{absorvida} \times t}{C_p m} \quad (D.2)$$

Para determinar el cambio de temperatura es necesario entonces calcular la energía que absorbe la muestra. Por la ley Beer Lambert Law tenemos que:

$$\mathcal{T} = e^{-a_\lambda l} \quad (D.3)$$

Donde \mathcal{T} es la transmitancia, a_λ es el coeficiente de absorción del material, que depende de la longitud de onda del haz, y l es el largo del camino óptico recorrido por el haz a través del material. Para realizar el cálculo, supongamos que la neurita se encuentra inmersa en agua a una temperatura de $25^\circ C$. El factor de absorción del agua para una longitud de onda igual a $\lambda = 975nm$ tiene un valor aproximado de $0,1cm^{-1}$. Debido a que el haz se encuentra altamente enfocado, sólo consideraremos la contribución del volumen pequeño definido anteriormente como la cintura del haz ($\approx 1\mu m \times 1\mu m \times 2\mu m$). Por lo tanto, el valor para l está dado por el diámetro de la cintura del haz (2 veces ϖ) en el eje z aproximada a $2\mu m$. Por lo tanto, el valor aproximado para la transmitancia del haz al atravesar la muestra es 0,998. Esto quiere decir que, si la potencia del láser en la muestra tiene un valor aproximado de $16mW$, sólo $3,2 \times 10^{-4}mW$ son absorbidos por la muestra.

Por otro lado, podemos obtener el valor de la masa del agua en el volumen que se encuentra enfocado del haz, despreciando la masa de las neuritas. Considerando la densidad del agua igual a $1000kg/m^3$, la masa contenida en un volumen $2\mu m^3$ es de $2 \times 10^{-12}g$.

Falta determinar el tiempo característico que tarda una molécula de agua en transmitir la

energía a las otras moléculas de agua (t). Utilizando la ecuación del calor (heat equation) :

$$\frac{\partial T}{\partial t} = \alpha \nabla^2 T \quad (\text{D.4})$$

Donde α es el coeficiente de difusión térmica igual a $0,143 \times 10^6 m^2/s$ para el agua. La ecuación D.4 la podemos simplificar como:

$$\frac{\Delta T}{t} = \alpha \frac{\Delta T}{\Delta z^2} \quad (\text{D.5})$$

A partir de la ecuación D.5 podemos determinar un valor estimado para el tiempo de transmisión de calor, $t = \Delta z^2 / \alpha = 2,8 \times 10^{-5} s$

Reemplazando el valor calculado para la potencia absorbida, la masa del volumen afectado por el láser y el tiempo de transmisión de energía, en la ecuación D.2 obtenemos que el cambio de temperatura experimentado por la muestra es igual a $\approx 1^\circ C$, un cambio de temperatura mucho menor que el necesario para provocar cambios en las propiedades mecánicas de neuritas [69]. Por el contrario, si ocupamos la potencia máxima del láser $\approx 300 mW$ el aumento de la temperatura sería de aproximadamente $8^\circ C$, este aumento en la temperatura es considerable y podría provocar cambios en las propiedades mecánicas de las neuritas.

Por esta razón y por que la mayor componente de las células también es el agua (lo que implica una pequeña absorción de energía), es que utilizamos un láser infrarojo en su régimen de baja potencia. Ahora bien, es posible disminuir el coeficiente de absorción utilizando un láser visible, sin embargo, de esta manera podríamos provocar el fotoblanqueamiento de nuestras muestras, ya que la longitud de onda para excitar los fluoróforos utilizados para marcar las células, también pertenece al visible.