



Universidad de Concepción  
Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas

---

# Pinzas ópticas débiles para estudio de propiedades mecánicas en glóbulos rojos

Tesis que presenta

**Diego Andrés Ramírez Alegría**

Para optar al grado  
de

Magister en Ciencias mención Física.

Profesor Guía: Dr. Carlos Saavedra Rubilar  
Departamento de Física  
Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas  
Universidad de Concepción

# Tabla de Contenidos

Índice de Figuras	IV
Índice de Cuadros	VII
Agradacimientos	VIII
Resumen	IX
Abstract	x
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Hipótesis y Objetivos</b>	<b>3</b>
2.1. Hipótesis . . . . .	3
2.2. Objetivo general . . . . .	3
2.2.1. Objetivos específicos . . . . .	3
<b>3. Marco Teórico</b>	<b>4</b>
3.1. Pinzas Ópticas . . . . .	5
3.2. Principio de Atrapamiento Óptico . . . . .	7
3.2.1. Descripción Teórica . . . . .	8
3.2.2. Densidad espectral de potencia para una partícula confinada . . . . .	12
3.3. Escenario de aplicación biológico . . . . .	14
3.4. Estudio de propiedades mecánicas en glóbulos rojos . . . . .	16
3.5. Modelo matemático de membrana . . . . .	16
<b>4. Montaje Experimental</b>	<b>20</b>
4.1. Adaptación instrumental . . . . .	21
4.1.1. Sistema de visualización . . . . .	22
4.2. Planos conjugados . . . . .	23
4.3. Caracterización láser . . . . .	26
4.3.1. Perfil de intensidad . . . . .	27
4.3.2. Respuesta corriente/potencia en láser . . . . .	28
4.3.3. Estabilidad en potencia . . . . .	29
4.4. Adquisición de datos . . . . .	30
4.4.1. Fotodetección . . . . .	30

<b>5. Desarrollo experimental</b>	<b>32</b>
5.1. Calibración de los desplazamientos del láser . . . . .	33
5.2. Preparación de la muestra . . . . .	34
5.2.1. Preparación cámara . . . . .	34
5.2.2. Glóbulos rojos normales . . . . .	34
5.2.3. Glóbulos rojos con hipoclorito de sodio (HClO) . . . . .	35
5.2.4. Glóbulos rojos con resveratrol. . . . .	35
5.2.5. Glóbulos rojos con resveratrol e hipoclorito de sodio. . . . .	35
5.3. Curvas de calibración . . . . .	36
5.4. Análisis de datos . . . . .	38
5.4.1. PSD . . . . .	38
5.4.2. Análisis estadístico . . . . .	39
<b>6. Discusión y análisis de resultados</b>	<b>40</b>
6.1. Análisis de resultados . . . . .	40
6.1.1. Discusión . . . . .	42
<b>7. Conclusión y proyecciones</b>	<b>43</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>44</b>



# Índice de figuras

1.1. Dominios de conocimiento histórico del laboratorio de microscopía y atrapamiento óptico: dominio microscópico [27–30], dominio sub-microscópico biológico [31] y sintético [32–34], dominio 10-nanométrico biológico [35] y dominio nanométrico sintético [36,37]. Fuente: Elaboración Propia. . . . .	2
3.1. Trampa óptica estable. (a) Dominio de la fuerza gradiente sobre la fuerza de scattering. (b) Visualización de una partícula confinada en una trampa óptica. Fuente: Elaboración propia. . . . .	5
3.2. Setup experimental para estudio de empaquetamiento viral del virus Fago $\Phi 29$ . Fuente: Imagen extraída de [48]. . . . .	6
3.3. Origen de las componentes de gradiente ( $F_g$ ) y scattering ( $F_s$ ) de la fuerza óptica sobre una esfera dieléctrica debido a la interacción de un haz láser de perfil gaussiano. Fuente: Elaboración propia. . . . .	8
3.4. Estabilidad axial de una esfera dieléctrica en un haz láser gaussiano focalizado por una lente. Fuente: Elaboración propia. . . . .	9
3.5. Ilustración de las cuatro deformaciones principales que contribuyen a las fluctuaciones de membrana: flexión (bending), estiramiento del área de la membrana (membrane area change/stretching), cambio en el espesor de la membrana (membrane thickness change), y módulo de rigidez transversal (shearing). Fuente: Extraída de [77] . . . . .	15
4.1. Sistema de pinzas ópticas simple. El láser IR es expandido, filtrado y colimado en el telescopio, luego es focalizado por un lente objetivo sobre la muestra, produciendo la trampa óptica. Posterior el lente condensador colecta la luz láser y desvía hacia el detector, a su vez ilumina la muestra para visualizar la muestra en vivo en la cámara. Fuente: Elaboración propia. . . . .	20
4.2. Configuración de pinzas ópticas débiles. El láser infrarrojo (Ventus HP, $\lambda = 1064nm$ ) pasa a través de diferentes componentes relevantes antes de llegar al plano de la muestra(sample). Por medio de estos componentes es posible controlar la potencia del láser hasta llegar a $0,9mW$ en el plano de la muestra. Para obtener desplazamientos superiores a $2\mu m$ y escanear la totalidad de la zona lineal de un glóbulo rojo, se utiliza un espejo piezoeléctrico ( $PZM$ ) en conjunto a un sistema de expansor y uno reductor del haz (lentes $L1-L2$ y $L3-L4$ ), permitiendo alcanzar un desplazamiento de $2,2\mu m$ . En el plano de la muestra, el láser se enfoca mediante la lente de objetivo de inmersión en agua (OL1) y se dispersa parcialmente fuera del borde de la célula. La luz láser que sale del plano de la muestra se recoge mediante una lente objetivo condensadora (OL2) y se proyecta en un detector cuatro cuadrantes (QPD) colocada en un plano conjugado del sistema mediante el cual se miden los cambios en la posición de la luz láser. Fuente: Elaboración Propia. . . . .	21

4.3.	Representación de un rayo en sistema de planos conjugados utilizando lentes delgadas $L_1$ y $L_2$ de distancias focales $f_1$ y $f_2$ Fuente: Elaboración Propia. . . . .	23
4.4.	Diagrama de rayos para configuración de planos conjugados (denotados por *) mediante la utilización de sistema de lentes 4f. Este sistema convierte deflexiones angulares del haz en PZM a desplazamientos tranlacionales sobre la muestra en LO1. Fuente: Elaboración propia. . . . .	24
4.5.	Diagrama de rayos para configuración de planos conjugados (denotados por **) mediante la utilización de sistema de lentes 4f. Este sistema recupera la posición del láser en el PZM con la finalidad de que el haz no se desplace del eje óptico para adquirir las señales de voltaje con el QPD . Fuente: Elaboración propia. . . . .	25
4.6.	Determinación de plano conjugado para QPD utilizando oscilaciones de PZM. Con la oscilación fija del PZM a medida la posición del QPD se acerca al plano conjugado la oscilación comienza a disminuir Fuente: Elaboración propia. . . . .	25
4.7.	Perfiles de intensidad a 40 % de potencia del láser en la salida de este, y a la entrada del lente objetivo. El desplazamiento del eje x pudo ser producido por movimientos del instrumento de medida en el mismo eje. Fuente: Elaboración propia. . . . .	27
4.8.	Respuesta en potencia láser Ventus. Fuente: Elaboración propia. . . . .	28
4.9.	Estabilidad del láser en potencia funcionando a 40 % y con potencia de llegada al lente objetivo de 572,9mw. Fuente: Elaboración propia. . . . .	29
4.10.	Visualización de programa de adquisición de datos en modo automático (a) y modo manual (b) para medidas de fluctuaciones en globulos rojos. Fuente: Elaboración propia. 30	
4.11.	Fotodetector. (a) Cuadrantes del fotodetector. (b) Láser incidiendo sobre fotodetector. Fuente: <a href="https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfmobjectgroup_id=4400pn=PDQ80A">https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfmobjectgroup_id=4400pn=PDQ80A</a> . . . . .	31
5.1.	A) Familia de figuras en test target USAF 1951. B) Visualisación de grupo 7-1 del test target en montaje experimental. Elaboración Propia. . . . .	33
5.2.	Desplazamiento de haz láser por medio de PZM para calibración en escala real de los desplazamientos. Elaboración Propia. . . . .	33
5.3.	A) El Parafilm cortado en forma de u es ubicado entre dos cubre objetos el tipo de corte se debe a que por un lado ingresa el fluido mientras que por el otro sale el aire desplazado, de esta forma la camara queda llena de forma uniforme y sin burbujas de aire. B) Proceso de sellado de los cubre objetos mediante calor. C) cámara sellada luego del proceso de calor. Fuente: Elaboración Propia. . . . .	34
5.4.	A) Barrido del láser de 0V a 150V, sobre el glóbulo rojo. B) triplicado de curva de calibración en función del voltaje del PZM y QPD. Es posible observar que en el tramo entre 0V y 35V del PZT, la señal se mantiene plana debido a que el láser aun no tiene contacto con la membrana, sin embargo pasado este tramo comienza a aparecer la zona lineal hasta los 95V. Fuente: Elaboración Propia. . . . .	36
5.5.	Ajuste de recta en zona lineal para curva de caracterización. Fuente: Elaboración Propia. 37	
5.6.	Análisis de PSD y modelo matemático. La PSD media correspondiente a una medición completa de 200s sobre un RBC, la línea naranja tiene la pendiente teórica esperada $f^{(-5/3)}$ en el régimen de alta frecuencia. También indica los rangos de frecuencia donde se ajustó Eq.3,29 para determinar $\kappa$ . El recuadro muestra el histograma distribuido de Gauss de amplitudes de fluctuaciones para el mismo RBC. Fuente: Elaboración propia. 39	

- 6.1. Valores de STD de las fluctuaciones de RBC en diferentes condiciones. RBC normal (control,  $n = 100$ ), RBC con  $20\mu M$  de resveratrol (RV,  $n = 20$ ), RBC con  $0,2mM$  de HClO (HClO,  $n = 20$ ) y RBC preincubados con resveratrol y luego expuestos a  $0,2mM$  de HClO (RV + HClO,  $n = 20$ ). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías, las comparaciones entre los grupos se realizaron mediante una prueba de Tukey protegida. La significación estadística se definió como  $P < 0,01$ . Fuente: Elaboración propia. . . . . 41



# Índice de cuadros

3.1. Comparación de técnicas comunes utilizadas en sistemas biológicos. Fuente: Elaboración Propia. . . . .	14
4.1. Valores de ancho y $R^2$ para distintas potencias del láser. Fuente: Elaboración propia. . . . .	28
6.1. Comparación de los valores medios de fluctuaciones (STD) de los glóbulos rojos sanos. Fuente: Elaboración propia. . . . .	40
6.2. Tabla 2. Parámetros mecánicos de membrana para glóbulos rojos para diferentes condiciones. Resumen de todos los parámetros relevantes de los RBC para diferentes condiciones. En la primera fila se muestran las fluctuaciones de membrana (STDs) para cada condición. Segunda y tercera fila, contienen el módulo de flexión $\kappa$ . El valor del módulo de flexión varía para diferentes condiciones en comparación con la situación normal para RBC. Los valores de $\kappa$ asociados con el control y la presencia de resveratrol son más bajos incluso cuando las std son iguales en ambos casos (no tienen una diferencia estadística significativa). Revela menos rigidez que otros casos, pero la presencia de resveratrol disminuye aún más el valor de este parámetro. Por otro lado, los RBCs solo en presencia de $H^+$ (HClO), adquirieron el valor más alto de $\kappa$ , lo que indica una mayor rigidez de la membrana que en cualquier otro caso. Sin embargo, cuando el RBC se incubaba previamente con resveratrol y luego se pone en contacto con la misma concentración de $H^+$ previamente, la rigidez no disminuye tanto. Revela un efecto protector del resveratrol en el RBC, lo protege de los efectos causados por $H^+$ . Fuente: Elaboración propia. . . . .	42

# Agradecimientos

Gracias a mi familia, Esposa Johanna y amigos.



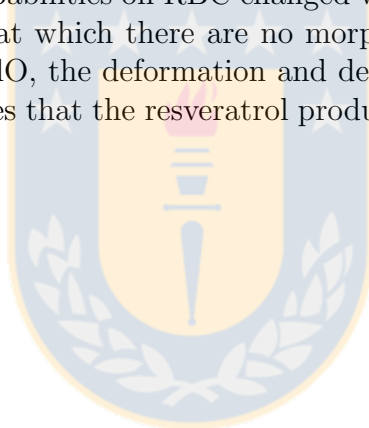


# Resumen

La membrana de los glóbulos rojos humanos (RBC) tiene importantes propiedades elásticas que se pueden describir midiendo las fluctuaciones típicas del borde de la membrana (valor de fluctuación de membrana  $\approx 30nm$ ) y las propiedades mecánicas mediante técnicas ópticas. Las propiedades elásticas de los RBC pueden verse afectadas por cambios en los medios circundantes. En el intento de dilucidar los mecanismos moleculares de la interacción del resveratrol con las membranas celulares y el efecto como agente protector contra la oxidación, estudiamos los cambios en las propiedades mecánicas de las membranas de RBC. Estudiamos los efectos antioxidantes protectores del resveratrol en las membranas de los glóbulos rojos en presencia del agente oxidante ácido hipocloroso (HClO). Para demostrarlo, medimos las fluctuaciones de los glóbulos rojos para así obtener parámetros mecánicos de las membranas de los glóbulos rojos utilizando un sistema de pinza óptica débil, el cual fue desarrollado como parte de esta tesis. Nuestros resultados sugirieron que las capacidades elásticas en los glóbulos rojos cambiaron con una baja concentración de HClO, sin embargo, con esta concentración no hay cambios morfológicos. Por otra parte, si hay resveratrol en presencia de HClO, la deformación y la disminución de las capacidades elásticas en RBC son más lentas. Esto indicó que el resveratrol produce un efecto protector en RBC en presencia de HClO.

# Abstract

The human red blood cells (RBCs) membrane has significant elastic capabilities which can be described measuring typical membrane edge fluctuations and mechanical properties by optical techniques. The RBC elastic properties can be affected by changes in the surrounding media. In the attempt to elucidate the molecular mechanisms of the interaction of resveratrol with cell membranes and the effect as a protective agent against oxidation, we studied the changes in mechanical properties of RBC membranes. We studied the protective antioxidant effects of the resveratrol on RBCs membranes in the presence of the oxidant agent HClO. To prove it, we measured the RBC fluctuations to obtain mechanical parameters of RBCs membranes using a weak optical tweezer. Our results suggested that the elastic capabilities on RBC changed with a low concentration of hypochlorous acid (HClO), a concentration at which there are no morphological changes. However, if there is resveratrol in the presence of HClO, the deformation and decrease of elastic capabilities on RBC are slower. This observation indicates that the resveratrol produces a protective effect in RBC in the presence of HClO.



# Capítulo 1

## Introducción

En óptica clásica, el límite de resolución de un sistema óptico para la descripción y caracterización de fenómenos de pequeña escala, guarda relación con la capacidad de formar imágenes que tiene un sistema de lentes a partir de la interacción entre la fuente de iluminación incidente y el objeto. Para un microscopio óptico, esta interacción es función, principalmente, de la longitud de onda de la luz, la apertura numérica de la lente objetivo del microscopio óptico, la distancia focal efectiva de la lente objetivo, y el tamaño del objeto o espécimen de estudio. Estos parámetros físicos combinados determinan cualitativamente la calidad de la imagen observable, y definen, cuantitativamente, el límite de resolución espacial o límite difractivo ( $\sim 250nm$ ) [1]. Tradicionalmente, las diversas estrategias para superar el límite de resolución espacial abordan técnicas de instrumentación y algoritmos de procesamiento digital directamente dirigidos hacia una optimización de la imagen de una escena para describir con el mayor detalle posible los fenómenos de interés de baja escala espacial. En un contexto histórico, la observación de especímenes cuasi-invisibles, dado por su transparencia y fineza, comenzó con Fritz Zernike, quien desarrolló la técnica de Contraste de Fase Interferencial hace ya muchas décadas atrás [2–8]. Esta técnica es ampliamente utilizada hasta el día de hoy en microscopios ópticos tradicionales para la observación de especímenes celulares sin la necesidad de procesos de tinción (procedimiento agresivo a nivel celular). Desde entonces, se han realizado mayores esfuerzos por mejorar la máxima resolución espacial en la imagen del objeto [9–12] para así superar el límite de la óptica difractiva. Las nuevas estrategias empleadas por los microscopios ópticos de súper-resolución promueven un determinado tipo de interacción entre la luz incidente y el espécimen en el contexto de la óptica clásica, con fase y amplitud determinadas inequívocamente, como fuente de iluminación para observación directa o para excitación por técnicas físico-químicas (por ejemplo micro-fluorescencia por láser). Reconocidos por sus acrónimos, los instrumentos más relevantes de microscopía para formación de imagen en alta resolución son: SIM, STORM, PALM, TIRF, FRET y STED [10–23]. El límite de resolución espacial en estos instrumentos puede alcanzar la decena de nanómetros que, sin embargo, generalmente conllevan una limitación práctica importante: el espécimen debe ser preparado en cortes histológicos y fijado en un sistema porta-muestra.

Si bien la óptica clásica y la video-microscopía han aportado herramientas fundamentales para describir una cantidad importante de fenómenos en el rango de las escalas de resolución espacial antes mencionadas, existe otro grupo de fenómenos que no son observables para estas herramientas. Desde una perspectiva más amplia, para describir fenómenos en escalas espaciales más pequeñas (nanométricas y sub-nanométricas) inherentes a procesos sub-celulares, la estrategia es abandonar el esfuerzo de formación de imágenes en alta resolución, para así comenzar a describir fenómenos a partir de mediciones directas de sus propiedades físicas relacionadas con señales débiles y extremadamente débiles (en la razón señal-ruido), tales como fuerzas de interacción, dinámica vibracional u

otras. Por lo anterior, las nuevas técnicas de medición en microscopía buscan la detección de señales débiles que permiten acceder a los procesos biológicos de interés, pero que a la vez presentan un reto diferente al límite impuesto por la óptica formadora de imagen. En este nuevo escenario los límites de resolución están asociados a las limitantes que imponen los sensores de estas señales. En décadas recientes, los esfuerzos han estado orientados al desarrollo de instrumentos híbridos para la medida cuantitativa directa de propiedades mecánicas de objetos dinámicos pequeños y funcionalmente íntegros (“vivos”). Así, medidas de fuerza, elasticidad y torque en escalas sub-microscópicas, son ahora posibles de alcanzar por medio de las más recientes técnicas de Photonic Force Microscopy (PFM), Optical Tweezers (OT), Magnetic Tweezers (MT) entre otros instrumentos, los cuales han permitido comprender el funcionamiento mecánico de macromoléculas biológicas, ADN, proteínas y motores moleculares en escalas de fuerza de femto-Newtons ( $10^{-15}N$ ) y de resolución espacial de desplazamientos en nanómetros ( $10^{-9}m$ ), por medio del registro de la posición de un haz láser [24–26].

Este trabajo de tesis se enmarca dentro de un contexto de instrumentación científica como es el diseño y desarrollo de instrumentación híbrida a partir de un sistema de Pinzas Ópticas adaptado para el estudio de fluctuaciones mecánicas de membrana celular en glóbulos rojos humanos vivos, en condición normal (sana) y alterada mediante técnicas de rigidización de la bicapa lipídica por procesos de acidez controlada. El objetivo científico directo es la exploración de los modelos teóricos que predicen las propiedades visco-elásticas de las membranas. En paralelo, el objetivo estratégico de este trabajo es establecer una reproducción válida de resultados para el laboratorio donde se ejecuta esta tesis, los cuales permitan confirmar el dominio de la instrumentación y las técnicas de detección en escala espacial de las decenas de nanómetros en ambientes biológicos, apuntando hacia experimentos de dinámica vibracional de moléculas biológicas complejas (por ejemplo proteínas) en escalas sub-nanométricas. Contribuyendo así a ampliar los dominios de conocimiento iniciados en años anteriores (ver Fig. 1.1) en cuanto a técnicas de foto-detección, arquitectura óptica, control de ruido, registro en frecuencia, post-procesamiento, análisis de datos y algoritmos de resolución.

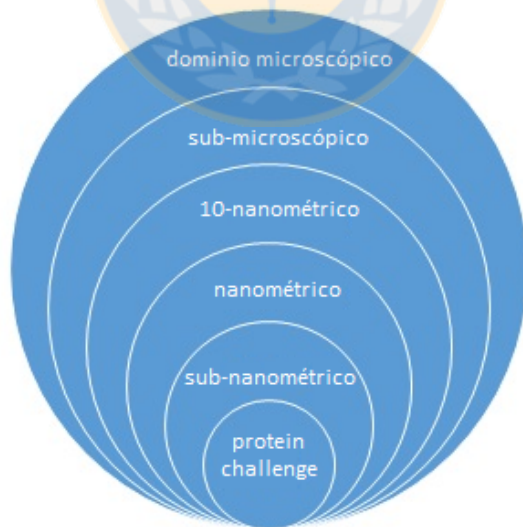


Figura 1.1: Dominios de conocimiento histórico del laboratorio de microscopía y atrapamiento óptico: dominio microscópico [27–30], dominio sub-microscópico biológico [31] y sintético [32–34], dominio 10-nanométrico biológico [35] y dominio nanométrico sintético [36, 37]. Fuente: Elaboración Propia.

# Capítulo 2

## Hipótesis y Objetivos

### 2.1. Hipótesis

En base a un montaje de pinzas ópticas dobles, anteriormente montado en el laboratorio de trabajo, es posible modificarlo y adecuarlo a un setup de pinzas ópticas débiles, para el análisis en forma directa de señales de glóbulos rojos humanos sin alterar su comportamiento.

### 2.2. Objetivo general

Modificar montaje de pinzas ópticas dobles e implementar montaje de pinzas ópticas débiles para el estudio de fluctuaciones y propiedades mecánicas de glóbulos rojos.

#### 2.2.1. Objetivos específicos

Los objetivos específicos de esta tesis son:

1. Analizar las modificaciones necesarias para estudiar glóbulos rojos,
2. Implementar modificaciones a setup de pinzas ópticas,
3. Generar programas de análisis de datos para señales de glóbulos rojos,
4. Estudiar fluctuaciones de membrana y propiedades mecánicas en glóbulos rojos bajo distintas condiciones.

# Capítulo 3

## Marco Teórico

En el presente capítulo se analizan los fundamentos teóricos asociados a pinzas ópticas, explicando como se produce el atrapamiento óptico bajo el régimen de Mie y régimen de Rayleigh. También se incluye la descripción teórica del análisis del espectro de potencias para una partícula confinada en una trampa óptica. Además, se presentarán algunos de los escenarios biológicos en el cual las pinzas ópticas han sido utilizadas durante el paso de los años. Una vez analizados estos escenarios, se finalizará con la descripción de las propiedades mecánicas de los glóbulos rojos, esto acompañado del modelo matemático del cual se pueden extraer los parámetros mecánicos.



### 3.1. Pinzas Ópticas

Artur Ashkin ganador del premio nobel durante el 2018, demostró que la fuerza de presión de radiación de un láser enfocado afectaba considerablemente la dinámica de partículas microscópicas de latex (cuyos tamaños eran del orden de los micrómetros) suspendidas libremente en agua [38]. Él observó que un haz láser, de perfil de intensidad gaussiano, al ser enfocado por medio de una lente producía que las partículas fueran atraídas hacia el punto donde el haz es enfocado y aceleradas en dirección de la propagación del haz. Además, logró atrapar de manera inestable algunas de estas partículas. De esta forma, se logró identificar una fuerza de gradiente en dirección del gradiente de intensidad y otra de dispersión en dirección de la propagación del haz [38]. Este experimento marcó el inicio de las trampas ópticas debido a que no se conocía previamente que se pudieran utilizar fuerzas de presión de radiación para formar una trampa óptica tridimensional estable. Años después, luego de varios trabajos realizados por el grupo de Ashkin, en 1986 se genera por primera vez una trampa óptica estable [39]. Esto es posible generando un equilibrio entre la fuerza de gradiente ( $F_g$ ) y la de scattering ( $F_s$ ) (ver Fig. 3.1). Para ello se utilizó un único haz láser altamente enfocado a través de una lente objetivo de inmersión (lente objetivo de microscopio). De esta forma, el haz diverge rápidamente del foco y se logra atrapar de forma estable micropartículas de entre  $10\mu m$  y  $25nm$ .



Figura 3.1: Trampa óptica estable. (a) Dominio de la fuerza gradiente sobre la fuerza de scattering. (b) Visualización de una partícula confinada en una trampa óptica. Fuente: Elaboración propia.

La elección correcta de la longitud de onda con la que se genera una trampa óptica es de vital importancia en el estudio de muestras biológicas. Al utilizar longitudes de onda del infrarrojo (IR) se minimiza la absorción de la muestra, produciendo menos daño sobre esta, lo que conlleva al aumento del tiempo de estudio de la misma [40,41]. La capacidad de generar fuerzas y desplazamientos sobre partículas dieron como primeras medidas fuerzas del orden de los  $pN$  y resolución espacial en el orden de  $\mu m$  [42,43]. Estos resultados y la versatilidad para modificar elementos en las pinzas ópticas, la convirtieron en una técnica con diversas aplicaciones en distintas disciplinas. Una de ellas es la biofísica, donde la versatilidad de las pinzas ópticas ha conducido a diversos estudios de muestras biológicas que van desde células y bacterias, hasta macro y micromoléculas [43–46]. Ejemplo de esto es el virus Fago  $\Phi 29$  que infecta a la bacteria *Bacillus subtilis*. El mecanismo de empaquetamiento viral que presenta este virus ha sido estudiado con pinzas ópticas, donde la capsida de  $42nm \times 54nm$  en la cual se empaqueta el ADN es unida a una micro-esfera sujeta por una micropipeta, mientras que el extremo libre donde se encuentra el ADN bicatenario de  $6,6\mu m$  de largo es unido a otra micro-esfera, atrapada por una pinza óptica (ver Fig. 3.2). Los resultados permitieron medir en forma cuantitativa que la fuerza utilizada en el empaquetamiento del ADN viral es de hasta  $57pN$  (Fig. 3.2) [47,48].

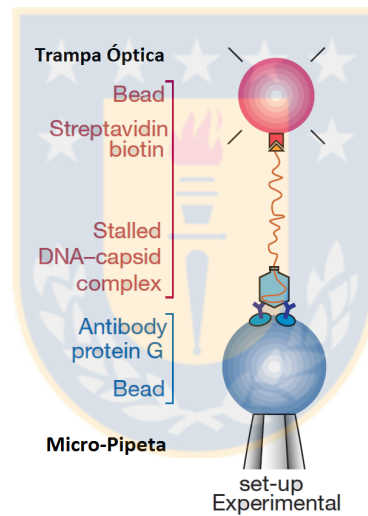


Figura 3.2: Setup experimental para estudio de empaquetamiento viral del virus Fago  $\Phi 29$ . Fuente: Imagen extraída de [48].



## 3.2. Principio de Atrapamiento Óptico

Las pinzas ópticas se basan en la capacidad de las fuerzas ópticas para ejercer presión sobre las partículas que atrapa. La fuerza que ejerce la luz al interactuar sobre la materia es producida por la transmisión, reflexión, refracción, absorción y dispersión de la luz sobre la materia [38, 39, 49]. Esto se puede explicar considerando la interacción de un haz láser altamente enfocado por un lente sobre una partícula dieléctrica. De esta forma, se tendrá que la luz incide sobre la partícula, produciendo transferencia de momento y generando un desplazamiento en la dirección de propagación de la luz, lo cual es denominado fuerza de scattering y es proporcional a la intensidad del haz incidente. El gradiente de intensidad producido por el perfil del haz láser junto con el enfoque de este, generará una fuerza en dirección a la zona de mayor intensidad del campo, desplazando la partícula hacia ese punto. Esta fuerza es denominada fuerza de gradiente y es proporcional al gradiente de intensidad y a la polarizabilidad de la partícula dieléctrica. El confinamiento de las partículas en la pinza óptica se debe a que la luz es altamente transmitida por la partícula atrapada. Por lo tanto, produciendo un equilibrio entre la fuerza de gradiente u scattering, condición que debe cumplirse para que se produzca el atrapamiento óptico estable [39]. Una vez que la partícula es atrapada, la fuerza restauradora que siente la partícula cuando es sacada de la posición de equilibrio puede ser determinada mediante la ecuación (3.1) [49, 50]:

$$F = Q \left[ \frac{nP}{c} \right]. \quad (3.1)$$

Esta expresión de fuerza es la principal relación entre la fuerza de atrapamiento y la potencia del láser ( $P$ ). El término  $Q$  es un parámetro de eficiencia adimensional,  $n$  es el índice de refracción del medio y  $c$  es la velocidad de la luz en el espacio libre. Considerando un valor estándar de  $Q = 0,3$ , potencias en el láser del orden de los  $mW$  e índice de refracción del medio  $n = 1,33$  obtendremos que la fuerza de la trampa se encuentra en el orden de los  $pN$ .

### 3.2.1. Descripción Teórica

La descripción del fenómeno físico por el cual ocurre el confinamiento de la partícula puede ser abordado de distintas formas, ya sea por óptica de rayos (partículas grandes, régimen de Mie  $r \gg \lambda$ ) o considerando que las partículas son pequeñas, vale decir, aproximación dipolar o régimen de Rayleigh ( $r \ll \lambda$ ).

- **Régimen de Mie  $r \gg \lambda$**

Las partículas utilizadas en pinzas ópticas para diversos estudios tienen la característica de ser dieléctricas y poseer un índice de refracción mayor al del medio en el que se encuentran. Bajo esta premisa, y considerando que su radio es mayor a la longitud de onda del haz incidente ( $r \gg \lambda$ ), es posible describir el atrapamiento óptico por medio de la transferencia de momento lineal asociada al cambio de trayectoria de los rayos producto de la refracción, reflexión y transmisión al incidir sobre la esfera dieléctrica [49].

Cuando una esfera dieléctrica, cuyo índice de refracción  $n_e$  mayor al índice del medio en el cual se encuentra  $n_m$ , comienza a interactuar con un haz láser de perfil gaussiano se tendrá que las fuerzas que afectan la esfera producto de la interacción haz-partícula serán: la fuerza de gradiente de intensidad ( $F_g$ ) y la fuerza de scattering ( $F_s$ ), ambas descritas mediante la óptica geométrica de rayos (ver Fig. 3.3).

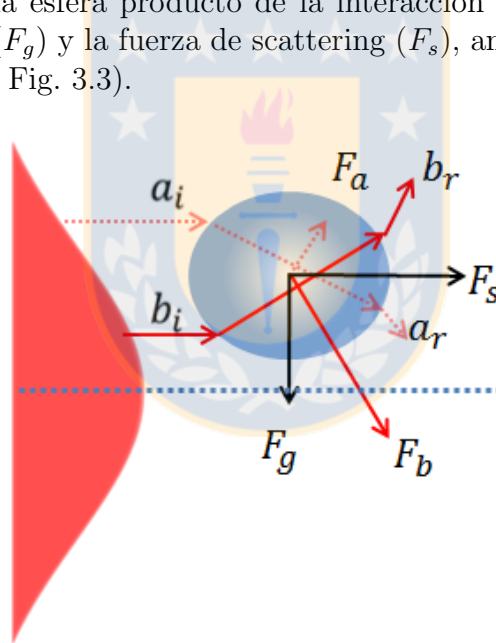


Figura 3.3: Origen de las componentes de gradiente ( $F_g$ ) y scattering ( $F_s$ ) de la fuerza óptica sobre una esfera dieléctrica debido a la interacción de un haz láser de perfil gaussiano. Fuente: Elaboración propia.

Los dos rayos paralelos ( $a_i, b_i$ ) de la figura 3.3 provienen de la zona de menor y mayor intensidad del haz, respectivamente. Estos inciden sobre la esfera dieléctrica que se encuentra desplazada respecto al centro del haz. Ignorando el efecto asociado a las reflexiones secundarias, gran parte de los rayos son refractados debido a la interacción fotones-partícula, lo cual ocasionará un cambio en el momento lineal de los fotones. Este cambio en el momento tendrá como respuesta en la partícula las fuerzas  $F_a$  y  $F_b$  (ver Fig. 3.3). Considerando el efecto de todos los pares de rayos simétricos que inciden sobre la partícula, se tendrá como resultado que la fuerza

neta sobre la partícula tendrá como componentes la fuerza de scattering ( $F_s$ ) en dirección a la propagación del haz y la fuerza gradiente ( $F_g$ ) en dirección al gradiente de intensidad. Sin embargo, la partícula no se encuentra en el eje de propagación del haz  $F_a \neq F_b$ , lo que conlleva a no producir el atrapamiento óptico. El confinamiento óptico se lleva a cabo produciendo un aumento en la fuerza de gradiente, lo cual se consigue enfocando fuertemente un haz láser (ver Fig. 3.4).

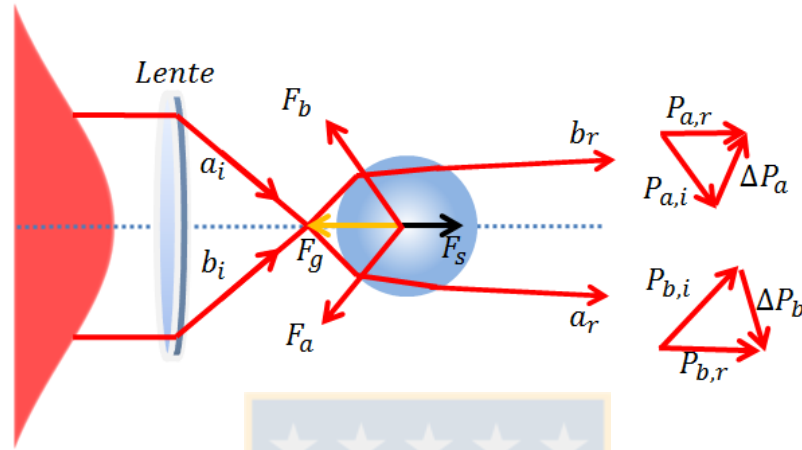


Figura 3.4: Estabilidad axial de una esfera dieléctrica en un haz láser gaussiano focalizado por una lente. Fuente: Elaboración propia.

Las reflexiones asociadas a los rayos incidentes  $a_i$  y  $b_i$  son de menor importancia debido a que la esfera sobre la cual se trabaja tiene un alto nivel de transmisión, sin embargo, estos rayos contribuirán a la generación de la fuerza de scattering.

El rayo incidente  $a_i$ , con momento lineal inicial  $P_{a,i}$ , sufre un cambio en su momento debido a la refracción producida cuando es transmitido por la esfera. Al ser refractado por esta, el rayo lo hace con un momento final  $P_{a,r}$ , lo que produce un cambio total en su momento  $\Delta P_a$ . Esto significa que la interacción fotones-partícula produce transferencia de momento desde los fotones a la partícula, lo cual, según la segunda ley de Newton ( $F = \frac{dp}{dt}$ ), generará una fuerza en dirección al cambio de momento. Además, por la tercera ley de Newton se tendrá una fuerza de reacción en sentido opuesto sobre la partícula (Fig. 3.4). Los rayos  $a_i$  y  $b_i$  producen fuerzas  $F_a$  y  $F_b$  en sentido opuesto al cambio de momento. Luego, considerando la simetría de los rayos y que estos producirán fuerzas de igual magnitud sobre la esfera, se tendrá que la suma de estas fuerzas generadas por los rayos incidentes darán como resultado que la fuerza de gradiente de intensidad esté dirigida en sentido opuesto a la propagación del haz incidente. Entonces, considerando que la fuerza de scattering igual a la fuerza de gradiente [49] producida por enfocar fuertemente un haz en una zona, se tendrá que la partícula será atrapada en esta zona de mayor intensidad generando la trampa óptica.

■ **Régimen de Rayleigh**  $r \ll \lambda$

Bajo este régimen, la partícula es tratada como un pequeño dipolo eléctrico en presencia de un campo electromagnético, por lo que la descripción de la fuerza óptica que sufre la partícula puede obtenerse utilizando las ecuaciones electromagnéticas. Cuando se realizó el análisis geométrico de un haz incidiendo sobre una partícula (Régimen de Mie) se obtuvieron dos componentes asociadas a la fuerza que experimenta la partícula bajo la interacción de la luz, las cuales corresponden a la fuerza de gradiente y scattering. Considerando la aproximación dipolar, el primer término asociado a la fuerza de gradiente es debido a la fuerza de Lorentz que actúa sobre el dipolo inducido, mientras que el término asociado a la fuerza de scattering es producto de la absorción y radiación de la luz del dipolo (cambio de momentum).

En aproximación dipolar, la fuerza de Lorentz para una partícula en presencia de un campo electromagnético es [51]:

$$F = (p \cdot \nabla)E + \frac{1}{c} \frac{\partial p}{\partial t} \times B, \quad (3.2)$$

donde  $E$  y  $B$  corresponden al campo eléctrico y magnético, respectivamente, y  $p$  es el momento dipolar inducido, el cual se encuentra relacionado con el campo eléctrico y la polarizabilidad de la partícula mediante la expresión  $p = \alpha E$ . A partir de esta relación, la Ec. (3.2) queda expresada como:

$$\begin{aligned} F &= (\alpha E \cdot \nabla)E + \frac{\partial(\alpha E)}{\partial t} \times B \\ &= \alpha \left\{ (E \cdot \nabla)E + \frac{\partial E}{\partial t} \times B \right\}. \end{aligned} \quad (3.3)$$

El primer término asociado al campo eléctrico, es posible desarrollarlo mediante el uso de:

$$(A \cdot \nabla)A = \nabla \left( \frac{A^2}{2} \right) - A \times (\nabla \times A). \quad (3.4)$$

Por consiguiente, la Ec. (3.2) es reescrita de la forma:

$$F = \alpha \left\{ \nabla \left( \frac{E^2}{2} \right) - E \times (\nabla \times E) + \frac{\partial E}{\partial t} \times B \right\}. \quad (3.5)$$

Considerando la ley de Faraday,  $\nabla \times E = -\frac{\partial B}{\partial t}$ , es posible reescribir la Ec.(3.5) y obtener de forma reducida la expresión de la fuerza de Lorentz que incluye un término asociado al gradiente de intensidad y otro asociado al vector de Poynting

$$\begin{aligned} F &= \alpha \left\{ \nabla \left( \frac{E^2}{2} \right) - E \times \left( -\frac{\partial B}{\partial t} \right) + \frac{\partial E}{\partial t} \times B \right\} \\ &= \alpha \left\{ \frac{1}{2} \nabla E^2 + \frac{\partial}{\partial t} (E \times B) \right\}. \end{aligned} \quad (3.6)$$

Si se considera que la partícula se encuentra bajo la influencia de un láser, el cual no sufre ninguna perturbación o cambio en el tiempo, se tendrá que el término asociado al vector de Poynting se anula, así, el promedio temporal de la fuerza entrega como resultado:

$$\langle F \rangle = \frac{\alpha}{2} \langle \nabla E^2 \rangle, \quad (3.7)$$

lo cual corresponde a la fuerza de gradiente [39, 51]:

$$F_g = \frac{\alpha}{2} \nabla I. \quad (3.8)$$

Como resultado de considerar la partícula como un dipolo puntual y desarrollar la expresión para la fuerza de Lorentz, la Ec. (3.8) nos entrega la fuerza de gradiente, de la cual se puede observar que la fuerza sobre la partícula dieléctrica es proporcional al gradiente de intensidad del haz.

De la interacción del dipolo con el campo electromagnético se obtendrá que el dipolo realizará la absorción y radiación de este campo, lo que tendrá como resultado la transferencia de momentum y fuerza de scattering sobre la partícula. Esta fuerza puede ser escrita en términos de la intensidad del haz  $I_0$ , la sección transversal de scattering  $\sigma$ , el índice de refracción del medio  $n_m$  en el cual se encuentra la partícula y la velocidad de la luz en el vacío  $c$  [39, 51]:

$$F_s = \frac{I_0 n_m}{c} \frac{128\pi^5 r^6}{3\lambda^4} \left( \frac{m^2-1}{m^2+2} \right)^2, \quad (3.9)$$

$$\sigma = \frac{128\pi^5 r^6}{3\lambda^4} \left( \frac{m^2-1}{m^2+2} \right)^2.$$

El criterio para lograr la estabilidad axial de la partícula dieléctrica en la trampa óptica esta dado por la relación entre la fuerza de gradiente y la fuerza de scattering [39]:

$$R = \frac{F_g}{F_s} \geq 1, \quad (3.10)$$

de esta forma, para obtener una trampa óptica estable se debe de generar un gradiente de intensidad lo suficientemente fuerte para cumplir con la ecuación (3.10).

### 3.2.2. Densidad espectral de potencia para una partícula confinada

Mediante la descripción del movimiento browniano asociado a una partícula en confinamiento óptico es posible obtener la densidad espectral de potencia (PSD) de dicha partícula. El movimiento browniano asociado a una partícula en un potencial armónico puede ser descrito mediante la ecuación de Langevin [52]:

$$m\ddot{x}(t) + \gamma\dot{x}(t) + kx(t) = \sqrt{2k_B T \gamma} \eta(t) \quad (3.11)$$

El lado derecho de la ecuación (3.11) incluye el término  $k_B T$ , el cual corresponde a la energía térmica, donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann y  $T$  corresponde a la temperatura absoluta. Además, el término  $\eta(t)$  es asociado al movimiento browniano de la partícula. El lado izquierdo incorpora tres términos. El primer término,  $m\ddot{x}(t)$ , corresponde al movimiento inercial de la partícula, donde  $m$  es la masa de la esta. El tercer término,  $kx(t)$  es asociado a la fuerza de restauración, donde  $k$  es la rigidez de la trampa. El segundo término,  $\gamma\dot{x}(t)$ , corresponde a la fricción del medio en el cual se encuentra la partícula, donde  $\gamma$  es el coeficiente de fricción y puede ser expresado en función del radio de la partícula  $r$  y el coeficiente de viscosidad  $\eta$ , según la ley de Stokes:

$$\gamma = 6\pi r \eta. \quad (3.12)$$

Una partícula confinada en un medio acuoso corresponde a un sistema sobre amortiguado [53], por lo cual el término inercial es despreciado y es posible describir el movimiento según la ecuación (3.13):

$$\gamma\dot{x}(t) + kx(t) = \sqrt{2k_B T \gamma} \eta(t). \quad (3.13)$$

Ya que el término  $kx(t)$  de la ecuación (3.13) corresponde a la fuerza armónica de la trampa, donde  $k$  es la rigidez de esta y puede ser obtenida mediante el espectro de potencia (PSD) asociado a los desplazamientos de la partícula producto del movimiento browniano.

De acuerdo al trabajo realizado por Sorensen y Flyvbjerg [54], es posible obtener una expresión para el espectro de potencia de la trampa óptica. Para ello, introducimos la relación de Einstein  $D = \frac{k_B T}{\gamma}$  y la ecuación para la frecuencia de corte:

$$f_c = \frac{k}{2\pi\gamma}. \quad (3.14)$$

Considerando esto, la ecuación (3.13) es expresada como:

$$\dot{x}(t) + f_c[2\pi x(t)] = (2D)^{\frac{1}{2}} \eta(t). \quad (3.15)$$

Definiendo la transformada de Fourier como:

$$x(t) = \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{X}(f) e^{-2\pi i f t} df, \quad (3.16)$$

$$\tilde{X}(f) = \int_{-\infty}^{\infty} x(t) e^{2\pi i f t} dt, \quad (3.17)$$

donde el término  $f_k$  es asociado a las frecuencias en el espacio de Fourier que permite el tiempo de medida ( $f = kT_{mrs}$  con  $k$  entero y  $T_{mrs}$  el tiempo de medición), aplicando la transformada a la ecuación (3.15) se obtiene:

$$\tilde{X}(f) = \frac{(2D)^{\frac{1}{2}}}{2\pi(f_c - if)} \tilde{\eta}(f). \quad (3.18)$$

Considerando que el término asociado a la fuente de ruido browniano  $\eta(t)$  tiene promedio temporal cero, es decir:

$$\begin{aligned}\langle \tilde{\eta}(t) \rangle &= 0, \\ \langle \tilde{\eta}_k \tilde{\eta}_l^* \rangle &= T_{mrs} \delta_{k,l},\end{aligned}\tag{3.19}$$

se obtiene el valor experimental del espectro de potencia:

$$P_k^{(ex)} = \frac{|\tilde{X}(f)|^2}{T_{msr}} = \frac{D}{2\pi^2(f_c - if)^2} |\tilde{\eta}_k|^2,\tag{3.20}$$

que para valores de  $k > 0$  da como resultado:

$$P_k = \langle P_k^{(ex)} \rangle = \frac{D}{2\pi^2(f_c^2 + f^2)},\tag{3.21}$$

lo cual corresponde a una lorentziana, y es la expresión para la PSD de una partícula confinada en una trampa óptica.



### 3.3. Escenario de aplicación biológico

En procesos biológicos la fuerza tiene un rol fundamental, ya que todo movimiento biológico es manejado por fuerzas de escala molecular. La habilidad de estudiar estos procesos fundamentales se ha visto revolucionada por el desarrollo de distintas técnicas que permiten medir fuerzas y desplazamientos generados por moléculas individuales, desde células hasta proteínas. La técnica de pinzas ópticas es considerada una de las más versátiles para este tipo de estudios, ya que pueden usarse para ejercer fuerzas de más de 100 pN en partículas de tamaños entre nanómetros y micrómetros y simultáneamente medir desplazamientos en las direcciones  $x$ ,  $y$  y  $z$  de la partícula atrapada con precisión sub-nanométrica.

Características	Pinzas Ópticas	Pinzas Magnéticas	Microscopio de Fuerza Atómica
Resolución espacial ( $nm$ )	0,1 – 2	5 – 10	0,5 – 1
Resolución temporal ( $s$ )	$10^{-4}$	$10^{-1}$ – $10^{-2}$	$10^{-3}$
Rigidez ( $pN/nm$ )	0,005 – 1	$10^{-3}$ – $10^{-6}$	$10$ – $10^5$
Rango de fuerza ( $pN$ )	0,1 – 100	$10^{-3}$ – $10^{-6}$	$10$ – $10^4$
Rango de desplazamiento ( $nm$ )	0,1 – $10^5$	0,5 – 5	100 – 200

Cuadro 3.1: Comparación de técnicas comunes utilizadas en sistemas biológicos. Fuente: Elaboración Propia.

Ashkin y su grupo mostraron por primera vez que moléculas biológicas individuales como virus, bacterias, levaduras, células eucariotas e incluso organelos celulares podían ser atrapados y desplazados sin causar daño óptico [40, 41, 55]. Más tarde, el mismo grupo fue capaz de estimar en tiempo real la fuerza ejercida por una sola mitocondria desplazándose a través de microtúbulos al interior de una gran ameba *Reticulomyxa* [56]. La capacidad de las pinzas ópticas también ha sido utilizada para realizar distintos tipo de estudios, desde la caracterización de la elasticidad del polímero ADN de doble hélice bajo el efecto de fuerzas de  $80pN$  [57], hasta la estructura y propiedades de deformación de glóbulos rojos en ausencia de interacciones con la superficie [58, 59]. Para demostrar la versatilidad de las pinzas ópticas comentamos diversas aplicaciones que esta ha tenido. Para el estudio de procreación, al ser capaces de atrapar un espermatozoide humano individual, es posible investigar sobre su movilidad [60]. También han tenido importancia en analizar el proceso de mitosis, donde las pinzas ópticas se han utilizado para hacer seguimiento y alteraciones al movimiento del cromosoma para el estudio del huso mitótico durante la división celular [61–63]. En cuanto a la investigación de la respuesta inmune, Seeger et al. (1991) [64] guiaron ópticamente linfocitos T a sus células objetivo y observaron los cambios morfológicos y las oscilaciones de membrana en estas últimas luego del contacto. Por otro lado, también han sido investigadas las propiedades mecánicas de las membranas y la reorganización dinámica de los constituyentes del citoesqueleto por medio de la unión de partículas de poliestireno a la superficie externa de las células y luego tirando de ellas con la pinza óptica [65]. Finalmente, comentamos sobre el estudio de difusión de proteína en la membrana, donde las pinzas ópticas sirven para arrastrar macromoléculas al plano de la membrana y así analizar el mecanismo de interacción de la membrana de la proteína con el citoesqueleto [66–68].



Esta tesis tiene dentro de sus objetivos estudiar las deformaciones y desplazamientos de la membrana de glóbulos rojos, lo cual, como mencionamos anteriormente, puede investigarse a través de pinzas ópticas. Pero, ¿por qué es importante conocer sobre estos cambios en las células? Pues porque los estudios de fluctuaciones de membrana que se han hecho desde la década de los 70 indican que estos podrían contribuir fuertemente a la evaluación de procesos celulares y por lo tanto podrían jugar un rol fundamental en diagnósticos.

El conocimiento actual sobre las fluctuaciones de membrana es debido al trabajo del pionero Helfrich [69–72]. A partir de estas fluctuaciones se pueden deducir distintas características, como la longitud de correlación y la amplitud, que a su vez entregan información importante sobre las propiedades mecánicas de la membrana (ver Fig. 3.5) y su interacción con el medio [73–76].

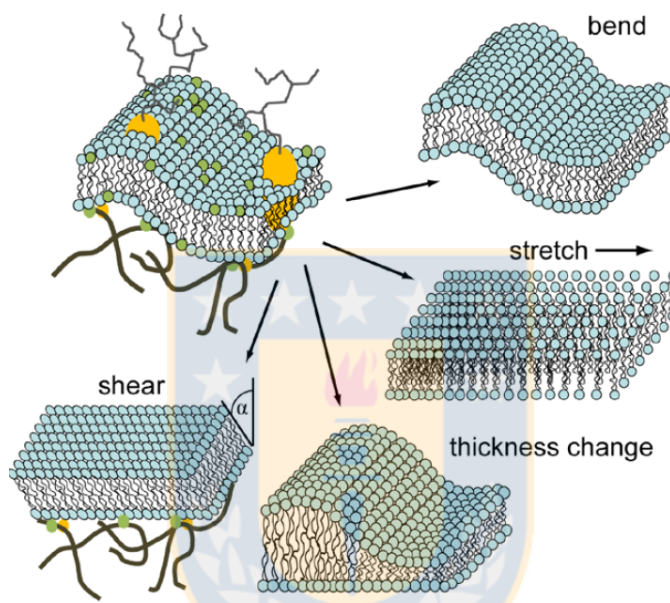


Figura 3.5: Ilustración de las cuatro deformaciones principales que contribuyen a las fluctuaciones de membrana: flexión (bending), estiramiento del área de la membrana (membrane área change/stretching), cambio en el espesor de la membrana (membrane thickness change), y módulo de rigidez transversal (shearing). Fuente: Extraída de [77]

Helfrich reconoció que el cambio de la membrana desde su forma energéticamente favorable, conlleva un costo energético gobernado por la rigidez de flexión de la membrana (bending rigidity), una constante de material característica de la composición lipídica [71]. Para el caso particular de los glóbulos rojos tenemos que estos son altamente flexibles. Esta flexibilidad se deriva de su estructura particular, la que carece de núcleo y otros organelos mayores, permitiendo que sean modelados como objetos homogéneos que producen desplazamientos de fase óptica proporcionales al espesor local. Por esta razón, los glóbulos rojos son los más apropiados para el análisis de fluctuaciones. Ya en trabajos tempranos y con distintas técnicas se han estimado a partir de fluctuaciones los módulos de flexión con valores de  $\kappa = 5 \cdot 10^{-20} J$  [78], y más tarde  $\kappa = 3,4 \cdot 10^{-20} J$  para formas de dacriocitos y estomatocitos, mientras que glóbulos rojos de forma de equinocitos mostraron ser considerablemente más rígidos con  $\kappa = 13 \cdot 10^{-20} J$  [79]. Por todo esto es que nos interesamos en la técnica de pinzas ópticas y en el estudio de glóbulos rojos, ya que la técnica permite estudiar este tipo de células con gran precisión y así poder aportar al conocimiento de manera interdisciplinaria.

### 3.4. Estudio de propiedades mecánicas en glóbulos rojos

Una condición muy común que afecta a las células vivas es el uso de medicamentos farmacológicos, que es de gran importancia para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades. En este sentido, es importante conocer la concentración exacta de las dosis del fármaco, así como los efectos secundarios asociados a un tratamiento particular basado en el fármaco. En esta tesis investigamos el efecto del resveratrol como agente antioxidante en glóbulos rojos individuales, con el objetivo de comprender el mecanismo de acción de esta molécula como antioxidante en las membranas biológicas. Los eritrocitos humanos fueron elegidos debido a su única membrana y que no presentan organelos internos, que constituyen un sistema celular ideal para estudiar las interacciones de los compuestos químicos con las membranas celulares [80–82]. Por otro lado, aunque menos especializadas que muchas otras membranas celulares, tienen suficientes funciones en común con ellas, como el transporte activo y pasivo, y la producción de gradientes iónicos y eléctricos para ser considerados representativos de la membrana plasmática en general.

En este trabajo se utilizó una técnica de pinzas ópticas débiles (OT) [83,84] para medir las fluctuaciones de la membrana celular con resveratrol y HClO. Las técnicas de microscopía óptica no son invasivas ni destructivas y, por lo tanto, son muy adecuadas para investigar sistemas biológicos [85]. La técnica basada en el uso de pinzas ópticas considera la detección de los cambios de posición de un láser colocado en el borde de la célula. La diferencia del índice de refracción entre el medio circundante y el interior de la célula hace que la trayectoria de la luz se desvíe a medida que la membrana fluctúa. Esto permite la medición directa de las fluctuaciones de la membrana alrededor de la posición de equilibrio y el análisis de la densidad espectral de potencia de la señal, que en conjunto con un modelo matemático de la membrana, permite la determinación de algunos parámetros mecánicos como la tensión de la membrana, la rigidez de flexión y la viscosidad efectiva [84,86–89]. Esta técnica ya se ha utilizado para obtener parámetros mecánicos de glóbulos rojos, membranas lipídicas [86,87] y neuronas de PC12 [88,89]. El resveratrol (RV, trans- 3, 5, 4'-trihidroxiestilbeno) es un compuesto polifenol no flavonoide, particularmente abundante en uvas rojas (*Vitis vinifera*), pero también está presente en vegetales y frutas altamente pigmentados [90]. Se ha demostrado que la RV es un potente agente antioxidante, anticáncer y antiinflamatorio [90–92]. En los glóbulos rojos se ha demostrado que el objetivo principal de la acción de RV es en la membrana celular [93]. El mecanismo molecular de los antioxidantes de polifenol depende de su estructura y de su capacidad para intercalarse en las membranas celulares, donde interactúan con las bicapas lipídicas, actuando como eliminadores de radicales y protegiendo así la membrana del estrés oxidativo [91,94,95]. A pesar de la importancia para la salud del RV, su efecto en las membranas celulares apenas se ha investigado. Las propiedades antioxidantes del RV se evaluaron en eritrocitos humanos in vitro expuestos al estrés oxidativo inducido por el ácido hipocloroso (HClO). HClO es un poderoso oxidante natural que daña las bacterias, las células endoteliales, las células tumorales y los eritrocitos [96,97].

### 3.5. Modelo matemático de membrana

Las membranas biológicas son de suma importancia para el correcto funcionamiento de las células vivas, ya que ellas son las responsables de separar espacialmente los compartimentos intracelulares, además de ser un obstáculo para el ambiente extra celular. Es justo en esta interfase donde las señales son transducidas [98], el material es tomado y liberado tanto por procesos activos como pasivos [99], y donde fuerzas mecánicas son realizadas entre la célula y su ambiente [100]. Para un correcto entendimiento de las células biológicas es necesario un entendimiento físico de la membrana

celular de bicapa lipídica y su mecanismo, lo que ha motivado una gran cantidad de investigaciones.

En sistemas de membrana bicapa como en multicapa las medidas de las fluctuaciones dinámicas conllevan a la derivación de parámetros mecánicos del sistema. Actualmente, es conocido que las propiedades mecánicas de la membrana bicapa, tales como rigidez de flexión  $\kappa$  y tensión  $\sigma$ , juegan un rol fundamental en gran cantidad de procesos celulares como movilidad, proliferación y endo/exocitosis. Generalmente, es aceptado que la rigidez de flexión depende de la composición lipídica, mientras que la tensión es determinada por las fuerzas físicas presentes que experimenta la membrana, por ejemplo diferencias de presión osmótica.

Importantes sistemas modelo para membranas biológicas son los liposomas artificiales compuestos de moléculas anfifílicas auto-organizadas en bicapas lipídicas cerradas. Dependiendo del método de formación, estos liposomas pueden ser de distintos tamaños, desde pequeñas vesículas unilamelares (SUV, radio de  $100 - 500nm$ ) hasta vesículas unilamelares gigantes (GUV, radio hasta  $100\mu m$ ). En el contexto biológico es recomendado llamar a estas vesículas gigantes liposomas, ya que el término vesícula está reservado para vesículas intracelulares del tamaño de las SUVs. Estos liposomas han sido usados como sistema modelo de membrana y para imitar células.

El entendimiento físico del mecanismo de los liposomas se basa en la suposición de una fase líquida cristalina que exhibe elasticidad de flexión. Esto fue usado por Helfrich para describir la energía libre necesaria para curvar y extender una membrana [101]. La teoría de Helfrich fue exitosamente usada para modelar las propiedades estáticas de las membranas, y durante las últimas tres décadas varios métodos experimentales han sido desarrollados para medir las propiedades mecánicas de membrana. Un método consiste en medidas estáticas, como aspiración por micropipeta [102] o estiramiento de membrana mediante pinza óptica [103]. Para acceder a la dinámica de la membrana, la video microscopía ha permitido la medición de la evolución de las fluctuaciones con una resolución temporal típica de  $20ms$ , la cual está usualmente limitada por la velocidad de adquisición de video de  $\approx 50Hz$ . En estos estudios, el movimiento fuera del plano de la membrana es extraído directamente de las imágenes [104, 105] y las amplitudes de fluctuación generalmente no son accesibles bajo los  $10nm$  [105]. Recientemente ha sido introducido un método óptico para medir fluctuaciones de membrana de glóbulos rojos con resoluciones bajo  $nm$  y temporal de  $ms$  [84], permitiendo cubrir una escala temporal de hasta  $10kHz$ .

La primera descripción teórica de la amplitud de fluctuación de una membrana y su dinámica fue desarrollada por Brochard and Lennon para el caso de membranas planas [106]. Este luego fue extendido a geometrías esféricas armónicas por Schneider et al. [107] y Milner y Safran [108], quienes incluyeron la tensión y la curvatura espontánea en la descripción esférica. La dinámica de membrana es descrita a través de una función de autocorrelación  $S(q, t)$  de los modos de excitación de la membrana, los cuales representan el curso del tiempo de relajación para un modo excitado de número de onda  $q$ . La teoría clásica predice un decaimiento exponencial de la función de autocorrelación debido a la disipación de energía en el entorno líquido  $S(q, t) \propto \exp(-\omega_q t)$  con la tasa de relajación del modo dependiente  $\omega_q = \kappa q^3 / (4\eta)$ , donde  $\eta$  representa la viscosidad del medio. Otras fuentes de disipación como la fricción entre monocapas ha sido añadida posteriormente por Evans y Yeung [109] y Seifer y Langer [110], y han conllevado a una tasa de relajación que depende de  $q^2$ , en contraste con los procesos de relajación clásicos. Es importante notar que esta última fricción mencionada es sólo esperado que sea significativa a altas curvaturas correspondientes a  $q > 10^7 m^{-1}$ .

Varios otros modelos han sido propuestos por Zilman y Granek para explicar las medidas experimentales de la función de decaimiento exponencial del estiramiento en la función del factor de estructura, como fue encontrado en estudios experimentales [111, 112]. Este modelo encaja bien para membranas semiflexibles ( $\kappa > k_B T$ ) con pequeñas amplitudes de fluctuación. Un estudio experimen-

tal reciente investigó el decaimiento de modos de fluctuación directamente excitados en GUVs, y presentan una medición directa de los decaimientos exponenciales del estiramiento [114] dado por  $S(q, t) \propto \exp(-\omega t^\alpha)$ , el cual no está en acuerdo con la teoría clásica de fluctuación de membrana. Mecanismos disipativos adicionales como la mencionada fricción entre monocapas o modos híbridos son evocados para explicar este comportamiento [113–116]. Por todo lo anterior, la dinámica de las fluctuaciones de membrana continúa siendo un tema de investigación.

Aparte de estas descripciones habituales de la bicapa lipídica en términos del Hamiltoniano de Helfrich, existen descripciones más complejas derivadas de la teoría de cristal líquido smectic-A, las cuales han sido exitosamente aplicadas a membranas lipídicas de multicapa apiladas [117, 118]. El caso de membranas lipídicas de multicapa difiere del caso de bicapa única por la adición al módulo de curvatura un módulo de compresión que actúa a lo largo de la estructura de la capa. Sin embargo, este módulo de compresión adicional es generalmente irrelevante en el contexto de membranas de bicapa única. En ambos casos, bicapa única y multicapas apiladas, la fricción entre monocapas es asumida como el mecanismo disipador [110, 118], y no existe la disipación a través de entornos acuosos, mientras que resulta ser un término dominante para longitudes de onda larga en membranas de bicapa inmersas en agua.

Según los diversos trabajos mencionados anteriormente para una membrana plana la energía de fluctuación es descrita por un funcional de energía libre:

$$F = \int dA \left[ \frac{1}{2} \kappa (\nabla^2 h)^2 + \frac{1}{2} \sigma (\nabla h)^2 \right], \quad (3.22)$$

donde  $h$  es la extensión de la membrana, desde su posición de equilibrio, y la integral suma sobre toda la superficie. Usando el teorema de equipartición la función de correlación de la fluctuación corresponde a:

$$\langle h_q h'_q \rangle = \frac{k_B T}{\kappa q^4 + \sigma q^2} (2\pi)^2 \delta(q + q'). \quad (3.23)$$

Fluctuaciones de longitud de onda  $q$  se relajan a una tasa de  $\omega_q = (\kappa q^4 + \sigma q^2)/(4\eta q)$  para una membrana impermeable [119, 120], donde  $\eta$  es la viscosidad promedio de los dos fluidos separados por la membrana. Esto nos da como resultado la función de correlación dependiente del tiempo:

$$\langle h_q(t) h'_q(0) \rangle = (2\pi)^2 \sigma(q + q') \langle h_q h'_q \rangle \exp(-\omega_q t). \quad (3.24)$$

Tomando la transformada de Fourier e integrando sobre todos los modos  $q$  obtenemos la PSD para una membrana plana:

$$PSD = \int \frac{d^2 q}{(2\pi i)^2} \int_{-\infty}^{\infty} \langle h_q(t) h_{-q}(0) \rangle \exp(i\omega t) dt \quad (3.25)$$

$$= \frac{1}{\pi} \int_0^{\infty} q dq \langle h_q h_q \rangle \frac{\omega_q}{\omega_q^2 + \omega^2} \quad (3.26)$$

$$= \frac{4\eta k_B T}{\pi} \int \frac{dq}{(\kappa q^3 + \sigma q)^2 + (4\eta \omega)^2}. \quad (3.27)$$

En los casos limitados de bajas y altas frecuencias encontramos que cuando  $\omega \rightarrow \infty$ :

$$PSD = \frac{k_B T}{12\pi (2\eta^2 \kappa)^{\frac{1}{3}} \omega^{\frac{5}{3}}}, \quad (3.28)$$

y cuando  $\omega \rightarrow 0$

$$PSD = \frac{k_B T}{4\sigma\omega}. \quad (3.29)$$

De esta forma es posible analizar la PSD de una membrana según el rango de frecuencias necesarios.



# Capítulo 4

## Montaje Experimental

Los diseños experimentales de pinzas ópticas. Se pueden dividir en dos secciones, una asociada a preparar el haz con el cual se producirá la trampa y otra donde se genera, visualiza y detecta la trampa. En la primera sección el haz es expandido, filtrado y colimado, de esta forma cumplirá con las características necesarias para generar la trampa (explicadas en las secciones anteriores). En la segunda sección se tendrá un sistema de microscopio óptico en conjunto a detectores de posición, en esta parte del montaje se podrá generar, visualizar y detectar la trampa. Dentro de los diseños de pinzas ópticas se tendrán montajes con distinta complejidad, dependiendo del control, resolución espacial y temporal a la cual sea necesario llegar. Ejemplo de ello es el sistema de doble pinza óptica, con el cual se logra obtener hasta el doble de resolución espacial que un sistema de pinzas ópticas simple [26, 39, 121].

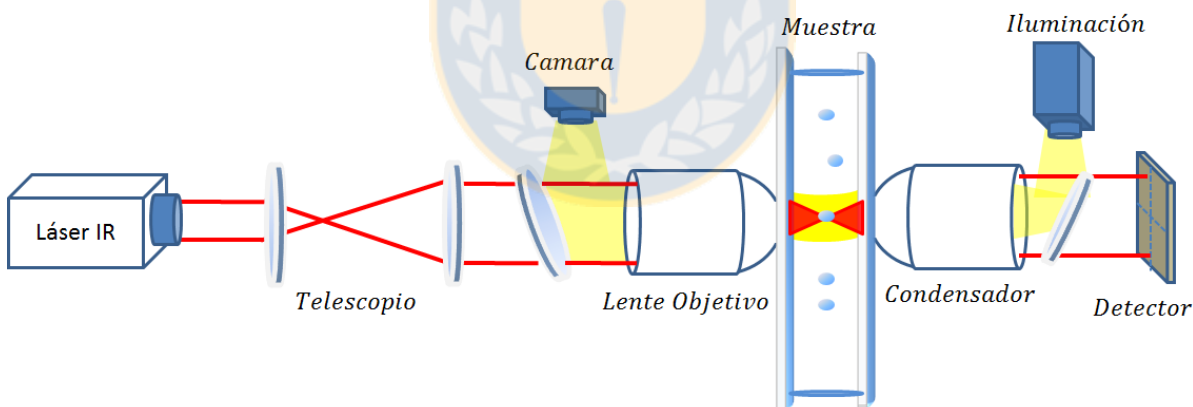


Figura 4.1: Sistema de pinzas ópticas simple. El láser IR es expandido, filtrado y colimado en el telescopio, luego es focalizado por un lente objetivo sobre la muestra, produciendo la trampa óptica. Posterior el lente condensador colecta la luz láser y desvía hacia el detector, a su vez ilumina la muestra para visualizar la muestra en vivo en la cámara. Fuente: Elaboración propia.

## 4.1. Adaptación instrumental

La implementación de pinzas ópticas en diversas áreas de la ciencias a llevado a este instrumento a sufrir distintas modificaciones según lo requiera la investigación. El desarrollo de la presente tesis tiene como uno de sus objetivos, realizar modificaciones a un sistema de pinzas ópticas(ver Fig.4.2) con la finalidad de estudiar fluctuaciones de membrana y propiedades mecánicas de glóbulos rojos bajo distintas condiciones.

La primera modificación corresponde al control de potencia del láser, debido a que si la trampa óptica actúa como tal, las fluctuaciones de la membrana se verían afectadas por la fuerza de la trampa óptica sobre esta. Como el láser utilizado en el montaje (Ventus HP,  $5000mW$ ,  $\lambda = 1064nm$ ) actúa de forma optima sobre  $1W$  de potencia de salida (descrito por el fabricante) es necesario disminuir la potencia del láser de tal forma que este actué en su rango operativo optimo y que a su vez no genere fuerza o daño sobre la muestra. La segunda modificación corresponde al control de los desplazamientos del láser sobre la muestra, debido a que el piezo-eléctrico posee un recorrido angular de  $\pm 73\mu rad$  lo que es equivalente a  $600nm$  en el plano de la muestra. Esto es insuficiente para estudiar glóbulos rojos ya que para ello es necesario tener un desplazamiento mínimo de  $1,5\mu m$ .

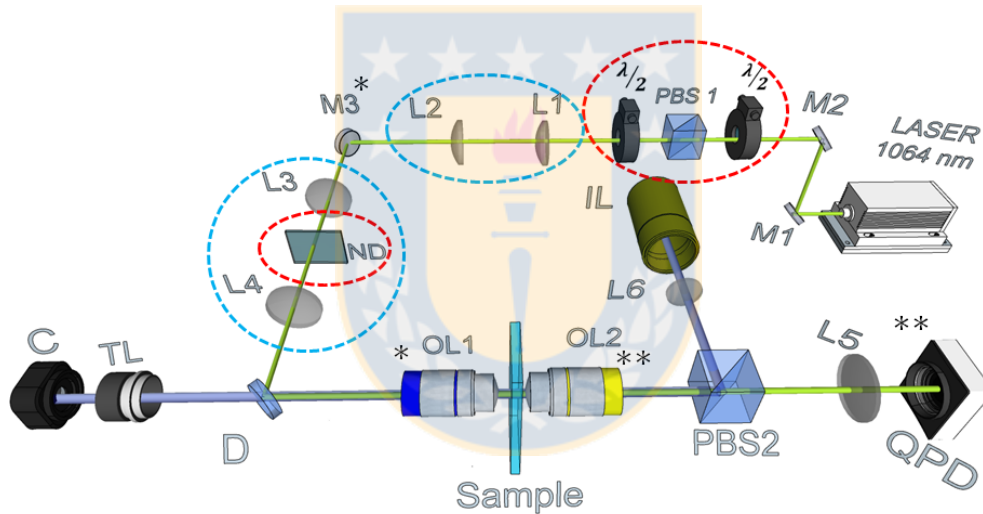


Figura 4.2: Configuración de pinzas ópticas débiles. El láser infrarrojo (Ventus HP,  $\lambda = 1064nm$ ) pasa a través de diferentes componentes relevantes antes de llegar al plano de la muestra(sample). Por medio de estos componentes es posible controlar la potencia del láser hasta llegar a  $0,9mW$  en el plano de la muestra. Para obtener desplazamientos superiores a  $2\mu m$  y escanear la totalidad de la zona lineal de un glóbulo rojo, se utiliza un espejo piezoeléctrico ( $PZM$ ) en conjunto a un sistema de expansor y uno reductor del haz (lentes  $L1-L2$  y  $L3-L4$ ), permitiendo alcanzar un desplazamiento de  $2,2\mu m$ . En el plano de la muestra, el láser se enfoca mediante la lente de objetivo de inmersión en agua (OL1) y se dispersa parcialmente fuera del borde de la célula. La luz láser que sale del plano de la muestra se recoge mediante una lente objetivo condensadora (OL2) y se proyecta en un detector cuatro cuadrantes (QPD) colocada en un plano conjugado del sistema mediante el cual se miden los cambios en la posición de la luz láser. Fuente: Elaboración Propia.

## Control de potencia

En el montaje (Ver Fig.4.2.) el láser infrarrojo Ventus de longitud de onda de 1064 nm es operado a 40 % de su capacidad lo que es equivalente a una potencia de salida de 1W. Inicialmente pasa por un sistema de espejos  $M1$  y  $M2$  en arreglo de periscopio, elevando la altura del haz. El arreglo de placas (lambda medio)  $\frac{\lambda}{2}$ - $PBS1$ - $\frac{\lambda}{2}$  es utilizado para controlar la potencia del láser sin tener que modificar la corriente con que se alimenta el láser (40 % opera estable). El láser se encuentra polarizado verticalmente, al rotar la primera placa  $\frac{\lambda}{2}$ , esta rota la polarización del láser, cambiando las proporciones de luz polarizada horizontal o verticalmente. El cubo polarizador divisor de haz  $PBS1$  divide la luz polarizada, reflejando la luz polarizada horizontal y transmitiendo la componente vertical. La componente reflejada del haz es desviada hacia un bloqueador mientras que la componente transmitida incide sobre la segunda placa  $\frac{\lambda}{2}$  la cual permite rotar libremente la polarización vertical que sale del  $PBS1$ . Por medio de este sistema en conjunto a un filtro ND se podrá controlar la potencia del haz llegando a 0,9mW sobre el lente objetivo y con el láser operando en un régimen estable de potencia.

## Control de desplazamientos

El sistema de lentes  $L1$  y  $L2$  expanden el diámetro del haz con la finalidad de conjugar (ver sección 4.2) el espejo  $M3$  controlado por un piezo-eléctrico con el plano de entrada del lente objetivo  $OL1$  sin reducir considerablemente el tamaño del haz. Los lentes  $L3$  y  $L4$  son utilizados para conjugar el plano de PZM con el plano del lente objetivo. además en conjunto con  $L5$  hacen que el espejo  $M3$  y el fotodetector estén en planos conjugados. De esta forma la posición del haz en  $M3$  será un punto pivote del láser a medida que se propaga, entonces las deflexiones angulares del láser al mover el espejo  $M3$  casi no serán detectadas en el fotodetector, así la señal que se detecta es predominantemente la producida por la muestra. Es decir, sobre el QPD el láser apenas se traslada al rotar el piezo eléctrico, cambiando poco los voltajes que entrega para eje  $x$  o  $y$ . Además la configuración de lentes  $L3$  y  $L4$ , también permiten controlar horizontalmente (sin cambiar la posición del foco) la posición de la trampa óptica (rotando  $M3$  con el piezo), debido a que  $M3$  y  $OL1$  se encuentran conjugados.

### 4.1.1. Sistema de visualización

La luz azul proveniente de la fuente de iluminación  $IL$  es enfocada sobre el lente colector  $OL2$  por medio de la lente  $L6$  y el  $PBS2$ , luego la luz es colectada por  $OL1$  y dirigida hacia la cámara  $C$  por medio del dicróico  $D$  que desvía el láser y solo transmite la luz azul. Para hacer imagen sobre  $C$  se utiliza un lente de tubo  $TL$  que corrige las aberración esférica que producen las lentes objetivos. Finalmente, es posible visualizar la muestra de glóbulos.



## 4.2. Planos conjugados

Dos puntos de un sistema óptico se encuentran en planos conjugados, entonces deflecciones angulares del haz en el primer punto, solo producirán un cambio en el ángulo del haz ubicado en el segundo punto, y no un movimiento con respecto al eje óptico. Esto se puede demostrar considerando un sistema óptico de 2 lentes delgadas (Ver Fig.4.3.)

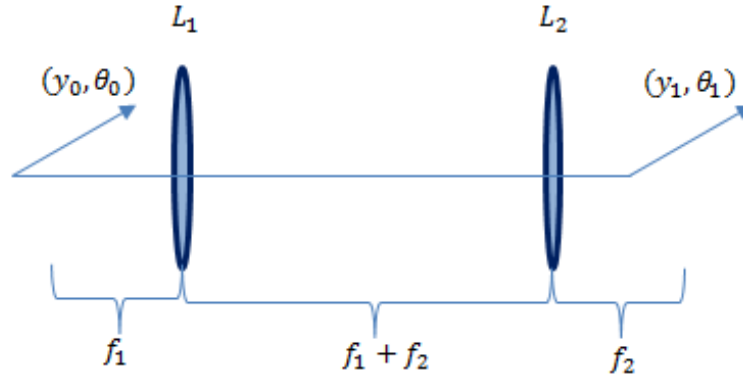


Figura 4.3: Representación de un rayo en sistema de planos conjugados utilizando lentes delgadas  $L_1$  y  $L_2$  de distancias focales  $f_1$  y  $f_2$  Fuente: Elaboración Propia.

La matriz característica de un haz en propagación en el espacio libre corresponde a:

$$\begin{bmatrix} 1 & d \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (4.1)$$

Mientras que la que caracteriza a una lente delgada es:

$$\begin{bmatrix} 1 & 0 \\ -\frac{1}{f} & 1 \end{bmatrix} \quad (4.2)$$

Considerando ambas matrices el sistema óptico formado por dos lentes (ver Fig.4.3) será:

$$M = \begin{bmatrix} 1 & f_1 \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ -\frac{1}{f_1} & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & f_1 + f_2 \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ -\frac{1}{f_2} & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & f_2 \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (4.3)$$

Obteniendo  $y_f = -\frac{f_1}{f_2}y_0$  y  $\theta_f = -\frac{f_1}{f_2}\theta_0$ . De esta forma manteniendo las distancias fijas se obtendrá que cualquier variación del ángulo asociada al rayo de entrada tendrá como respuesta en el rayo final solo una desviación angular de este, y no producirá un desplazamiento del eje óptico.

En pinzas ópticas es de suma importancia realizar movimientos traslacionales en el plano de la muestra, y al mismo tiempo que estos movimientos no generen aberraciones en las trampas y pérdidas de potencia debido a desplazamientos fuera de la apertura del lente objetivo. Esto no se logra solo con el PZM (ver Fig4.2) ya que este genera deflexiones angulares en el láser que no serán equivalentes a desplazamientos traslacionales en la muestra. Sin embargo, según lo descrito anteriormente, las deflexiones asociadas al PZM2 se pueden convertir en movimientos traslacionales sobre la muestra por medio de la configuración de un sistema 4f [121, 122]. Este es un sistema de 2 lentes que genera planos conjugados denotados por \* y se encuentran asociados a los planos en PZM\* y la apertura de LO1 (ver Fig4.4.), al conjugarlos se tendrá que desviaciones angulares del haz producidas por PZM2 generan desplazamientos traslacionales sobre la muestra, de esta forma los planos PZM y el de la apertura trasera del lente objetivo son conjugados de tal forma que el haz incida en LO1 en el mismo punto independiente del ángulo de deflexión producido por PZM.

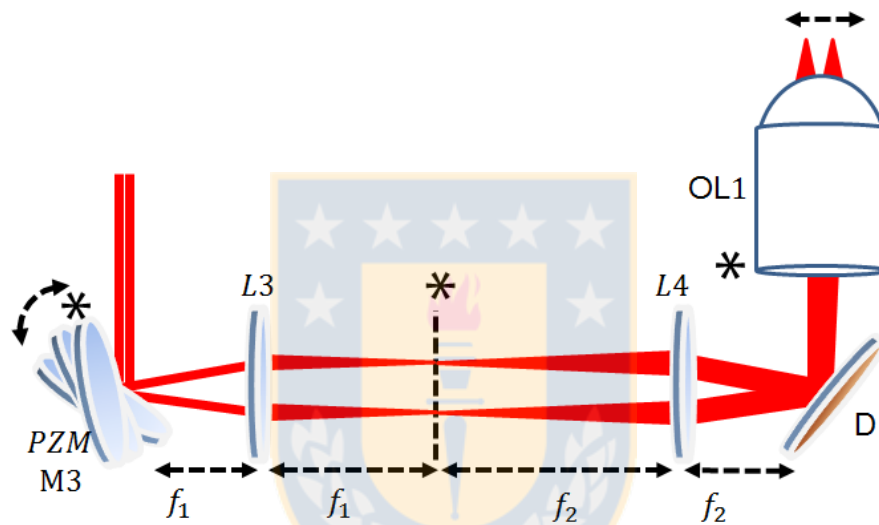


Figura 4.4: Diagrama de rayos para configuración de planos conjugados (denotados por \*) mediante la utilización de sistema de lentes 4f. Este sistema convierte deflexiones angulares del haz en PZM a desplazamientos traslacionales sobre la muestra en LO1. Fuente: Elaboración propia.

La misma configuración es utilizada para conjugar la apertura del lente colector OL2 y el fotodetector QPD con el lente Colector actúa como lente de distancia focal  $f_1$  y una segunda lente de distancia focal  $f_2$  es ubicada luego de este. Utilizando esta configuración es posible obtener que las deflecciones del haz debido al PZM no se vean en el QPD.

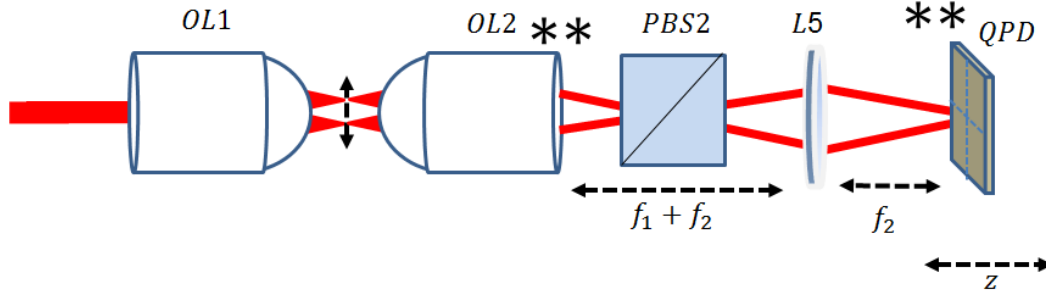


Figura 4.5: Diagrama de rayos para configuración de planos conjugados (denotados por \*\*) mediante la utilización de sistema de lentes 4f. Este sistema recupera la posición del láser en el PZM con la finalidad de que el haz no se desplace del eje óptico para adquirir las señales de voltaje con el QPD . Fuente: Elaboración propia.

Para visualizar que el QPD se encuentra conjugado es necesario realizar un barrido de las posiciones en  $z$  de este (ver Fig.4.5). Para ello se generan oscilaciones del PZM de 0V a 150V, a medida que estas ocurren se realiza un desplazamiento medido en  $z$ , registrando la oscilación con el QPD. A medida que uno se aproxima al plano conjugado se tendrá que la oscilación comienza a disminuir.

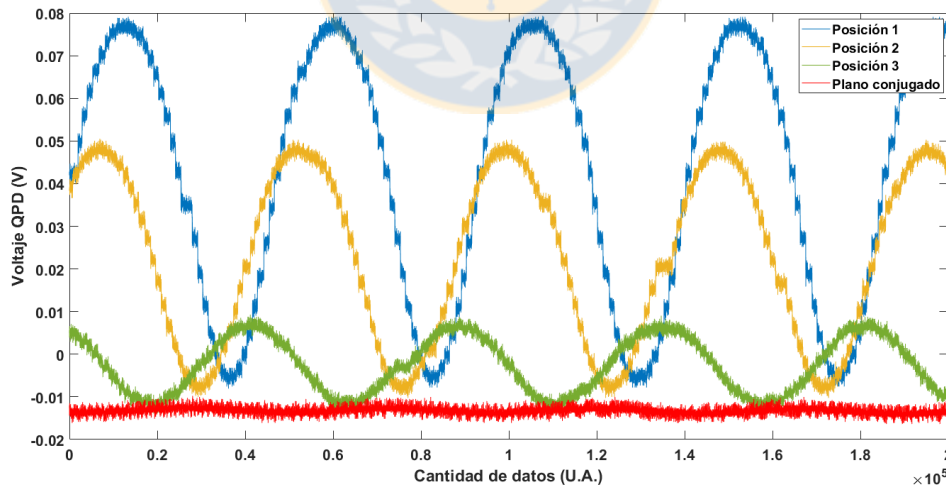


Figura 4.6: Determinación de plano conjugado para QPD utilizando oscilaciones de PZM. Con la oscilación fija del PZM a medida la posición del QPD se acerca al plano conjugado la oscilación comienza a disminuir Fuente: Elaboración propia.

### 4.3. Caracterización láser

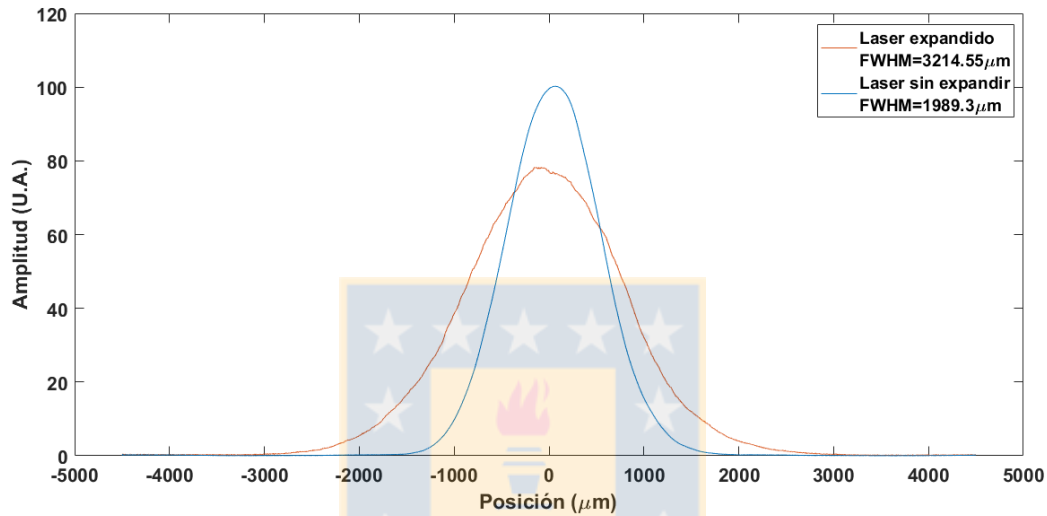
El láser es la pieza fundamental de la implementación del sistema de pinzas ópticas, ya que según lo descrito en capítulos anteriores, este debe cumplir con características especiales para un buen funcionamiento de la trampa (Longitud de onda,  $TEM_{00}$ , estabilidad). Sin embargo, para realizar el estudio de glóbulos rojos es necesario aplicar modificaciones al setup, de tal forma de obtener un control sobre la potencia y el ancho del haz (descrito en la sección adaptación instrumental). Bajo estas modificaciones es necesario caracterizar el láser del sistema. El láser utilizado en el montaje experimental es un láser Ventus, infrarrojo ( $\lambda = 1064nm$ ), cuyas especificaciones técnicas indican potencia máxima de salida de  $5w$  y perfil del haz  $TEM_{00}$  de ancho  $2,40 \pm 0,20mm$ . Según lo señalado previamente es necesario disminuir la potencia del láser a  $0,9mw$  de llegada al lente objetivo y además realizar una modificación en el tamaño del spot con la finalidad de obtener un mayor rango de desplazamiento en el plano de la muestra. Las caracterizaciones del perfil y potencia del láser son presentadas en el siguiente capítulo.



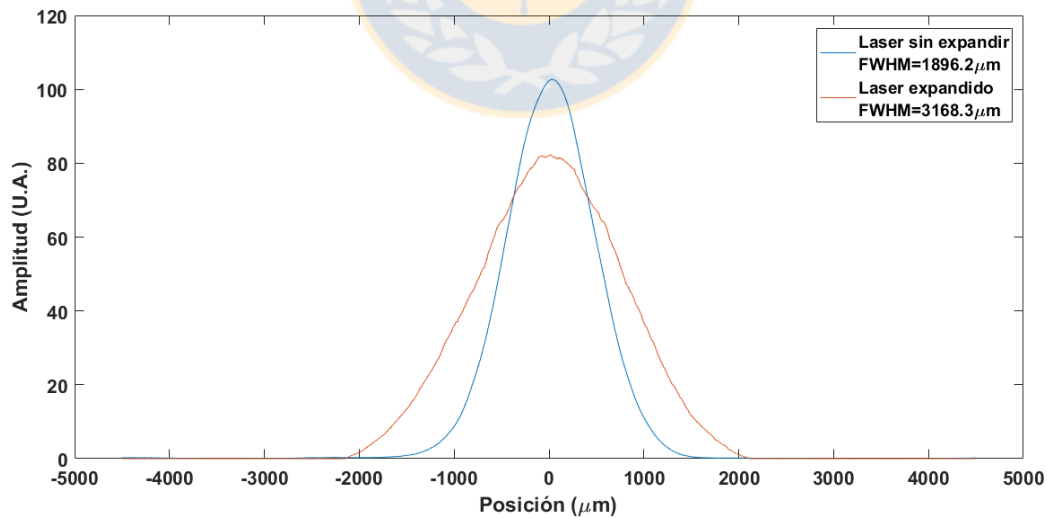
### 4.3.1. Perfil de intensidad

La caracterización se realiza utilizando un Beam Profiler (Thorlabs:BP109-UV) cuya sensibilidad del instrumento es de  $0,001\mu\text{m}$ . Las medidas son realizadas posicionado el instrumento a una distancia de  $50\text{cm}$  de cada punto de medición. Los datos son obtenidos mediante el programa de análisis (Thorlabs Beam 6.2) y luego son procesados utilizando Matlab.

El análisis del perfil de intensidad del láser es interpretado mediante los parámetros ancho medio de la función gaussiana (FWHM) y eficiencia del ajuste ( $R^2$ ). En base a estos parámetros cuando el láser opera a una corriente de  $40\%$  se presenta un notorio perfil gaussiano (ver Fig.4.7).



(a) Perfil de intensidad en el eje  $x$



(b) Perfil de intensidad en el eje  $y$

Figura 4.7: Perfiles de intensidad a  $40\%$  de potencia del láser en la salida de este, y a la entrada del lente objetivo. El desplazamiento del eje  $x$  pudo ser producido por movimientos del instrumento de medida en el mismo eje. Fuente: Elaboración propia.

Los valores de ajustes gaussianos para los perfiles del láser son presentados en la tabla 4.1, en ella es posible observar los valores del ancho de cada perfil y la diferencia porcentual. El parámetro de ajuste  $R^2$  no es incluido debido que para los cuatro casos el valor solo presenta variación en la milésima.

Perfil	$FWHM_x(mm)$	$FWHM_y(mm)$	Diferencia %
Sin expandir	1989,3	1896,2	4,7
Expandido	3214,5	3128,3	1,4

Cuadro 4.1: Valores de ancho y  $R^2$  para distintas potencias del láser. Fuente: Elaboración propia.

Utilizando la configuración de sistema expansor y reductor fue posible corregir en gran parte la diferencia en los anchos del haz. Además se puede apreciar en la figura 4.7 como los perfiles presentan visiblemente una forma gaussiana y ninguna deformación.

### 4.3.2. Respuesta corriente/potencia en láser

Debido a que la potencia del láser en la entrada del lente objetivo debe ser de aproximadamente  $0,9mw$ , es necesario conocer la respuesta del láser en función a la corriente que se le suministra, de esta forma se podrá conocer si existe algún régimen de corrientes bajo el cual el láser no tenga respuesta en potencia lineal. Para realizar este procedimiento fue necesario utilizar un filtro ND 1.0 con la finalidad de reducir la potencia del láser incidente sobre el power meter.

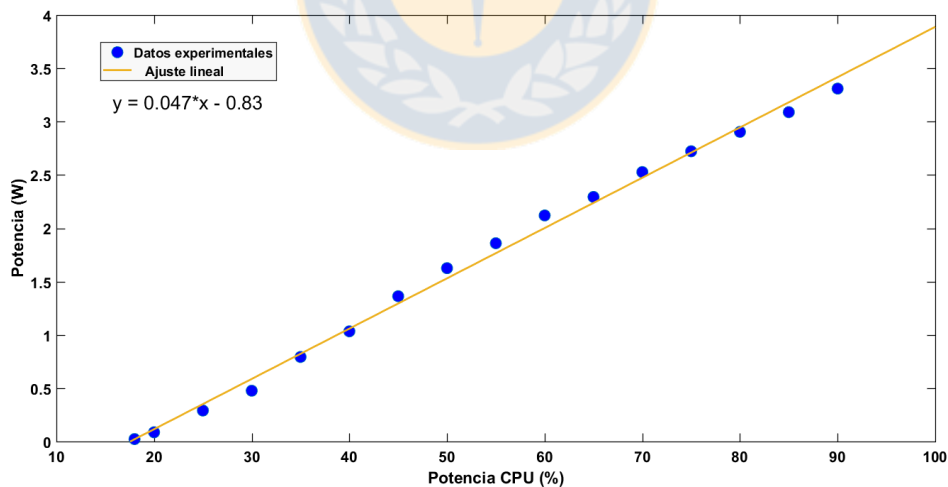


Figura 4.8: Respuesta en potencia láser Ventus. Fuente: Elaboración propia.

Del ajuste gráfico a los valores experimentales (ver Fig.4.8) es posible analizar el comportamiento lineal en potencia del láser, ya que el valor de ajuste  $R^2$  fue de 0,9984. De lo cual es posible concluir que el láser otorga una respuesta lineal en potencia.

### 4.3.3. Estabilidad en potencia

La estabilidad en potencia del láser se midió utilizando el beam profiler durante 22 min con el láser operando a 40 % y controlando la potencia de llegada del láser sobre el sensor por medio del sistema de placas  $\lambda/2$  medio y PBS. Esto entrego como resultados, que el láser opera completamente de manera estable (ver Fig.4.9).

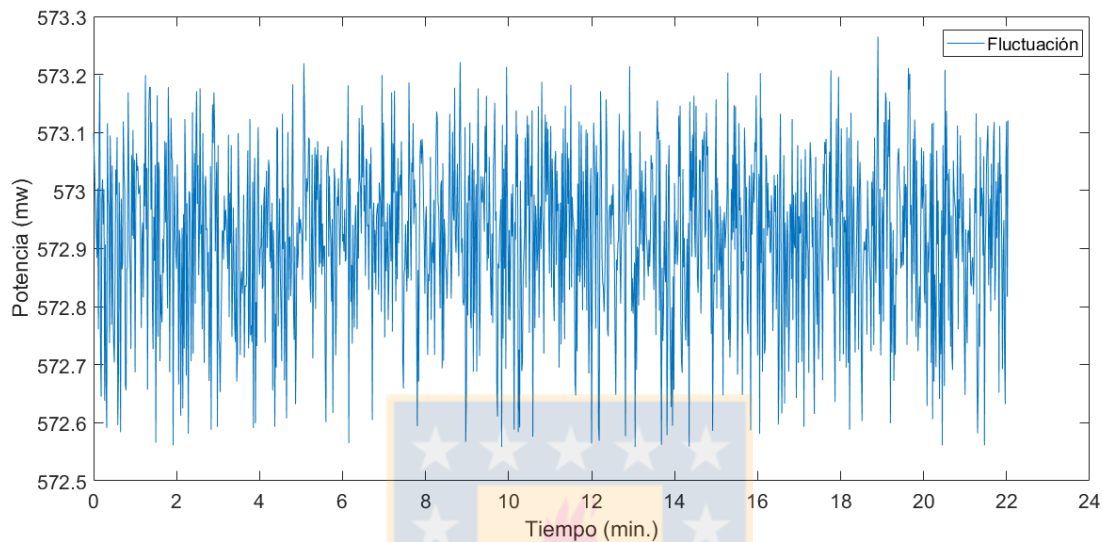


Figura 4.9: Estabilidad del láser en potencia funcionando a 40 % y con potencia de llegada al lente objetivo de 572,9mw. Fuente: Elaboración propia.

En la figura (4.9) es posible observar estabilidad temporal del láser representada por la variación en potencia de aproximadamente 0,1mw para un intervalo de 22 minutos. La estabilidad temporal en potencia, de acuerdo a los datos presentados, indica que, para nuestro caso particular, el láser sera utilizado a 40 % de su rendimiento y su potencia sera controlada utilizando el sistema de placas  $\lambda/2$  y PBS. Así, es posible concluir que el láser opera de manera estable bajo la configuración utilizada y que la variación temporal en su potencia no afectara las medidas dado a que estas duran 2 minutos.

## 4.4. Adquisición de datos

Para adquirir los datos de fluctuaciones de glóbulos rojos es necesario tener control sobre el piezo eléctrico en el cual se encuentra el M3 (ver Fig.4.2) y tener control del QPD. Para esto se implementó un programa en Labview (ver Fig.4.10) con el cual es posible controlar las señales de voltaje del piezo eléctrico mediante la conexión al controlador del PZM. Mientras que los datos son extraídos por el programa mediante la conexión del QPD a una tarjeta de adquisición (natural instrument) que convierte la señal de analógica a digital.

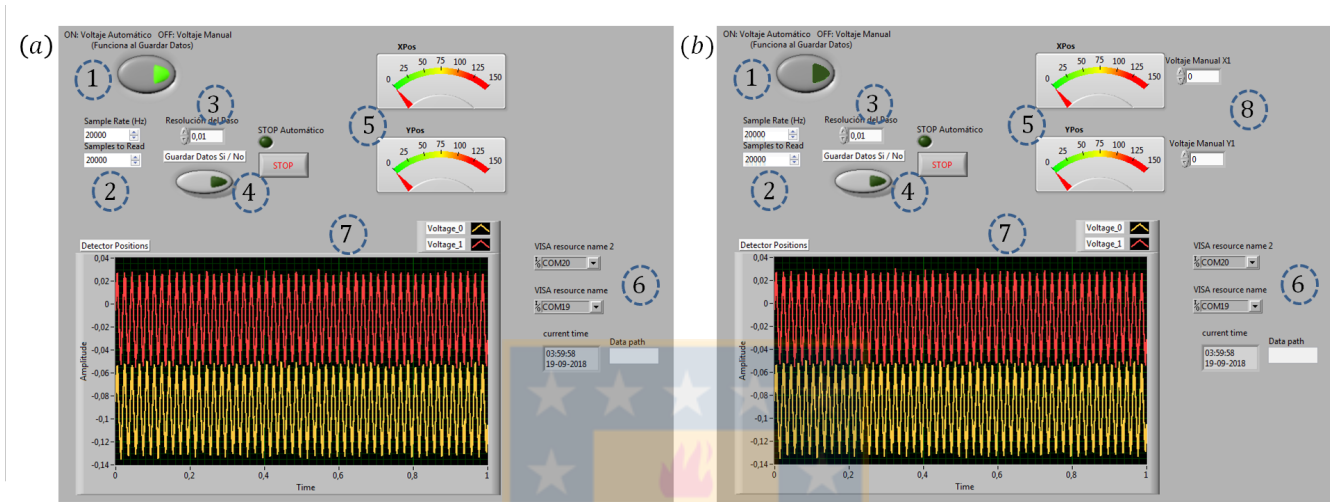


Figura 4.10: Visualización de programa de adquisición de datos en modo automático (a) y modo manual (b) para medidas de fluctuaciones en globulos rojos. Fuente: Elaboración propia.

Cuando el interruptor en (1) se encuentra encendido el programa permite realizar un barrido de 0V a 150 V determinando la resolución del paso que se desea utilizar(3) y visualizando el paso del voltaje (5), este barrido sera el utilizado para obtener la zona lineal sobre los glóbulos. Además, es posible seleccionar la cantidad de datos y tiempo que se dese realizar la medida (2) y si estos valores desean ser almacenados o no (4). Cuando el interruptor se encuentra apagado el programa muestra dos cuadros de selección de voltaje para  $x$  e  $y$  (8) de esta forma se puede realizar un control manual de la posición del haz sobre la muestra. Además el programa consta del selector de puerto (6) y de la visualización en tiempo real de la señal.

### 4.4.1. Fotodetección

El método de fotodetección utiliza el mismo haz láser con el que se generan las trampas para realizar el registro de las las señales biológicas. Para ello es necesario detectar la interferencia producida entre la luz dispersada el globo y la no dispersada por este, la señal de interferencia será colectada por el lente condensador y dirigida hacia el fotodetector (ver Fig.(4.2)). Cuando el haz incide sobre el fotodetector (ver Fig.(4.11b)), la intensidad del haz se encontrará distribuida entre los 4 cuadrantes (ver Fig.(4.11b)) del detector, esto producirá voltajes proporcionales al número de fotones que inciden sobre la superficie. Las señales de posición X-Y que otorga el detector serán combinaciones lineales de los voltajes en cada cuadrante:



$$X = \frac{(Q_2 + Q_3) - (Q_1 + Q_4)}{(Q_1 + Q_2 + Q_3 + Q_4)} \quad (4.4)$$

$$Y = \frac{(Q_1 + Q_2) - (Q_3 + Q_4)}{(Q_1 + Q_2 + Q_3 + Q_4)} \quad (4.5)$$

$$Sum = Q_1 + Q_2 + Q_3 + Q_4 \quad (4.6)$$

La señal  $Sum$  será utilizada para normalizar las respectivas señales. La respuesta del detector a los desplazamientos del haz serán tratados en el siguiente capítulo.

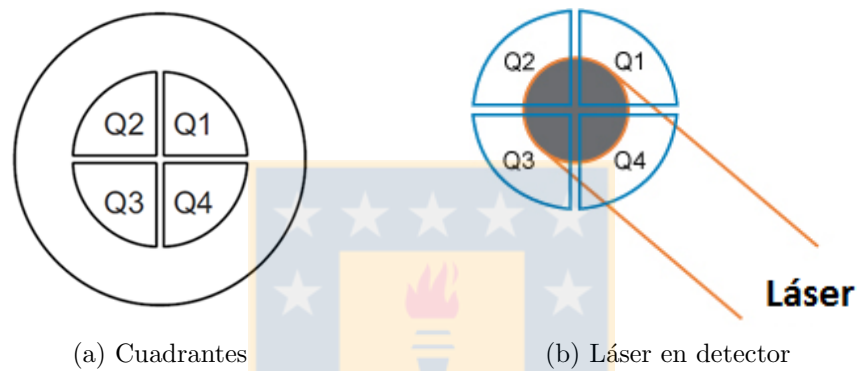


Figura 4.11: Fotodetector. (a) Cuadrantes del fotodetector. (b) Láser incidiendo sobre fotodetector. Fuente: [https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfmobjectgroup\\_id=4400pn=PDQ80A](https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfmobjectgroup_id=4400pn=PDQ80A)

# Capítulo 5

## Desarrollo experimental

El análisis de glóbulos rojos requiere de una secuencia de pasos que deben de ser desarrollados antes y después de comenzar las medidas, estos consisten en:

1. Calibración de los desplazamientos del láser a escala real.
2. Preparación de la muestra.
3. Curvas de calibración.
4. Adquisición de datos

En el siguiente capítulo se describirá cada uno de los pasos realizados para la obtención de parámetros mecánicos es glóbulos rojos



## 5.1. Calibración de los desplazamientos del láser

La calibración de los desplazamientos del láser de voltaje ( $V$ ) a micrómetros ( $\mu m$ ) requiere de una calibración del tamaño de pixel, en la cual se utiliza el test target USAF 1951, este posee grupos de elementos con dimensiones reales conocidas. Para esto es necesario posicionar el test target en el plano muestra del montaje experimental y visualizar algún grupo para medir el ancho en pixel de uno de sus elementos (ver Fig.5.1). Cuando se obtiene la imagen de un grupo (utilizado en el experimento grupo 7-1) y en función del valor real del ancho de cada figura (otorgado por el fabricante) es posible determinar el tamaño de pixel en escala real para el setup (El tamaño de pixel fue verificado en diversas ocasiones durante el desarrollo experimental)

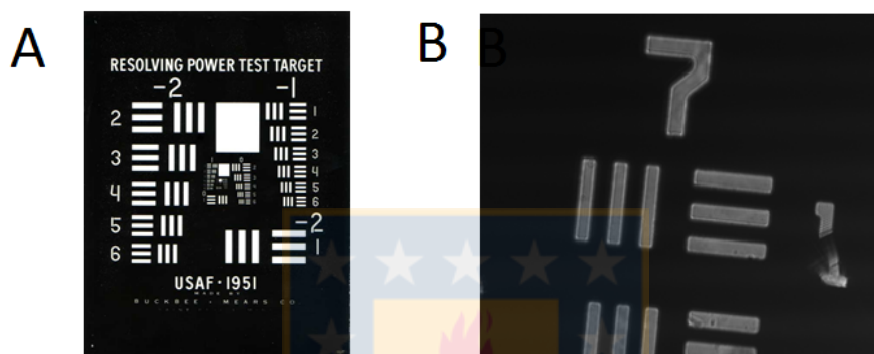


Figura 5.1: A) Familia de figuras en test target USAF 1951. B) Visualización de grupo 7-1 del test target en montaje experimental. Elaboración Propia.

Luego de que el tamaño de pixel es determinado, es posible reescalar los desplazamientos del láser en voltaje ( $V$ ) a  $\mu m$ . Esto se realiza mediante desplazamientos del láser desde  $0V$  a  $150V$ , registrando por medio del sistema de visualización cuanto es el desplazamiento en pixeles del láser (ver Fig.5.2)

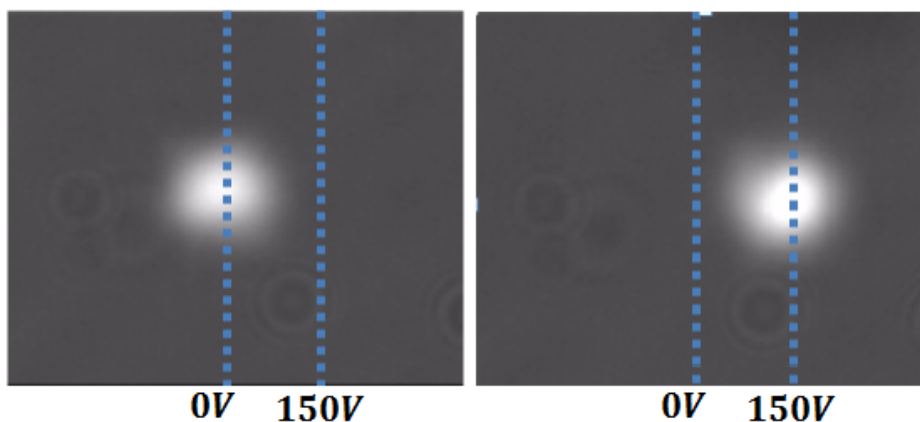


Figura 5.2: Desplazamiento de haz láser por medio de PZM para calibración en escala real de los desplazamientos. Elaboración Propia.

## 5.2. Preparación de la muestra

La preparación de la muestra consta de dos etapas, la primera consiste en preparar la cámara en la cual los glóbulos serán colocados para realizar el estudio, mientras que la segunda etapa consiste en la preparación de los glóbulos bajo las condiciones que se desean estudiar.

### 5.2.1. Preparación cámara

La preparación de la cámara en la cual los glóbulos serán colocados, se realiza utilizando cubre objetos de vidrio (Hirshchman  $24 \times 100 \text{mm}$ ) y papel Parafilm, para ello se corta una sección de papel del tamaño del cubre objeto y en forma de u, esta sección en forma de u se ubica sobre el cubre objetos para luego colocar otro cubre objetos sobre ella (cubre objeto, para film, cubre objeto) una vez realizado esto el sistema cubre objeto Parafilm es posicionado durante 10 segundos sobre una plancha de calor, con esto el Parafilm se derrite quedando los canales sellados en las zonas laterales y abiertos en la parte superior (ver Fig.5.3) luego se deja enfriar durante 2 horas (con la finalidad de que la cámara se ventile de los gases debido al derretimiento del para film) para ser utilizada. Cuando el fluido con los glóbulos es introducido en la cámara, el proceso de sellado consta solo de colocar papel Parafilm en la arte superior de los canales.

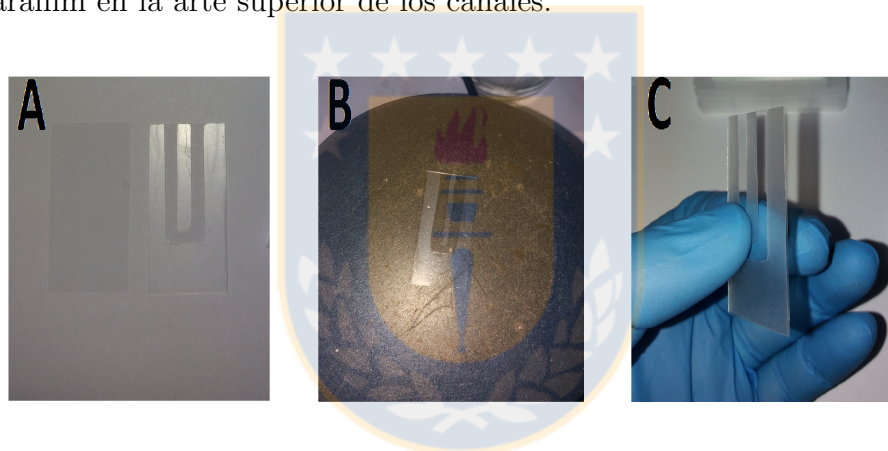


Figura 5.3: A) El Parafilm cortado en forma de u es ubicado entre dos cubre objetos el tipo de corte se debe a que por un lado ingresa el fluido mientras que por el otro sale el aire desplazado, de esta forma la cámara queda llena de forma uniforme y sin burbujas de aire. B) Proceso de sellado de los cubre objetos mediante calor. C) cámara sellada luego del proceso de calor. Fuente: Elaboración Propia.

### 5.2.2. Glóbulos rojos normales

Todas las muestras de glóbulos rojos humanos se prepararon antes de cada experimento pinchando el dedo a un donante sano, que siempre fue el mismo. Para preparar la solución, se utilizó un primer tubo (tubo Eppendorf), se diluyeron  $10 \mu\text{l}$  de sangre en  $1 \text{ml}$  de Buffer de PBS (mezclado con  $0,04 \text{gr}$ s de BSA). De esta solución se tomaron  $50 \mu\text{l}$  que se diluyeron en  $1 \text{ml}$  en un segundo tubo. Esta última solución contiene el número apropiado de glóbulos rojos sanos. Para cada preparación, y antes de su uso, se verificó a simple vista en un microscopio que la población de glóbulos rojos estaba sana para luego preparar la muestra. De hecho, el Buffer se filtró cada vez que se utilizó mediante el uso de filtros de  $0,2 \mu\text{m}$ .

### 5.2.3. Glóbulos rojos con hipoclorito de sodio (HClO)

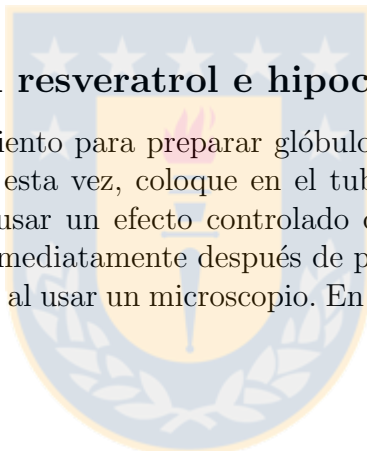
El objetivo es lograr una muestra que contenga glóbulos con una concentración de  $HClO$   $2mM$ . Usando la solución del segundo tubo para RBC normales, extraiga de él  $56\mu l$ , y coloque en el tubo  $6\mu l$  de  $HClO$  extraído de  $HClO$   $34mM$ . Esta cantidad corresponde a generar una concentración final de  $2mM$  de  $HClO$ . Verifique a simple vista con un microscopio, que si los glóbulos rojos aún están sanos. La idea es causar un efecto controlado de manera que no afecte de manera significativa al glóbulo rojo, es decir, los glóbulos rojos aún parecen sanos. Verificado este punto, prepare una muestra.

### 5.2.4. Glóbulos rojos con resveratrol.

El objetivo es lograr una muestra que contenga glóbulos con una concentración de resveratrol  $2mM$ . Usando la solución del segundo tubo para glóbulos rojos normales, extraiga  $232\mu l$  y coloque en el tubo  $182\mu l$  de resveratrol extraído de  $0,25mg$  de resveratrol de manera que genere una concentración final de resveratrol  $2mM$  en el tubo con glóbulos rojos sanos. Verifique a simple vista en un microscopio, de la misma manera que antes, si los glóbulos rojos están sanos. Verificado este punto, prepare una muestra.

### 5.2.5. Glóbulos rojos con resveratrol e hipoclorito de sodio.

En este caso, repita el procedimiento para preparar glóbulos rojos con resveratrol. Incubar esta solución durante 1 hora. Cumplida esta vez, coloque en el tubo  $6\mu l$  de  $HClO$  extraído de  $34mM$   $HClO$ . Debido a que la idea es causar un efecto controlado de manera que no afecte de manera significativa al RBC, como antes, inmediatamente después de preparar la solución, se corrobora que los glóbulos rojos parecen saludables al usar un microscopio. En este punto, se puede usar la muestra.



### 5.3. Curvas de calibración

Las curvas de calibración son realizadas posicionando el glóbulo rojo a un borde del haz láser, para esto es necesario realizar desplazamientos mecánicos con el porta muestra ubicando el glóbulo en el borde del haz (Debido a que el movimiento del piezo es limitado a  $2,2\mu m$ ) una vez realizado esto se procede a generar desplazamientos del haz por medio del PZM. Estos desplazamientos son controlados por medio del programa de Labview con el cual se generan cambios de voltaje que van desde  $0V$  a  $150V$  en el PZM con pasos de  $2$  volt. Los desplazamientos del láser son captados por el QPD que por medio de un sistema de adquisición de datos guarda estas señales en función de los voltajes que se generan en el QPD. Una vez realizado el barrido los datos son graficados para obtener la zona lineal en la cual se posicionara la trampa.

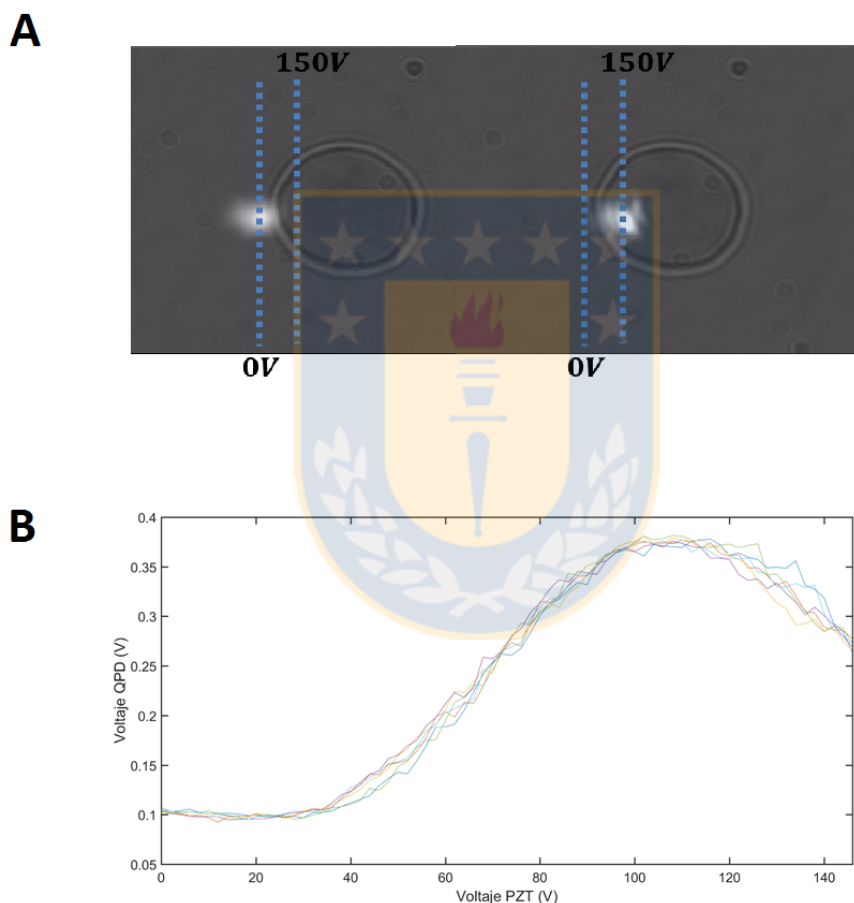


Figura 5.4: A) Barrido del láser de  $0V$  a  $150V$ , sobre el glóbulo rojo. B) triplicado de curva de calibración en función del voltaje del PZM y QPD. Es posible observar que en el tramo entre  $0V$  y  $35V$  del PZT, la señal se mantiene plana debido a que el láser aun no tiene contacto con la membrana, sin embargo pasado este tramo comienza a aparecer la zona lineal hasta los  $95V$ . Fuente: Elaboración Propia.

De la curva de calibración (ver Fig.5.4) se extrae el factor de conversión para realizar el reescalado de las señales del QPD de voltaje a micrómetros. Esto se realiza considerando la calibración del tamaño de pixel, es decir la curva de calibración puede representarse mediante desplazamientos en micrómetros del láser y no en función del voltaje, ya que, previamente se caracterizó el desplazamiento del láser en micrómetros.

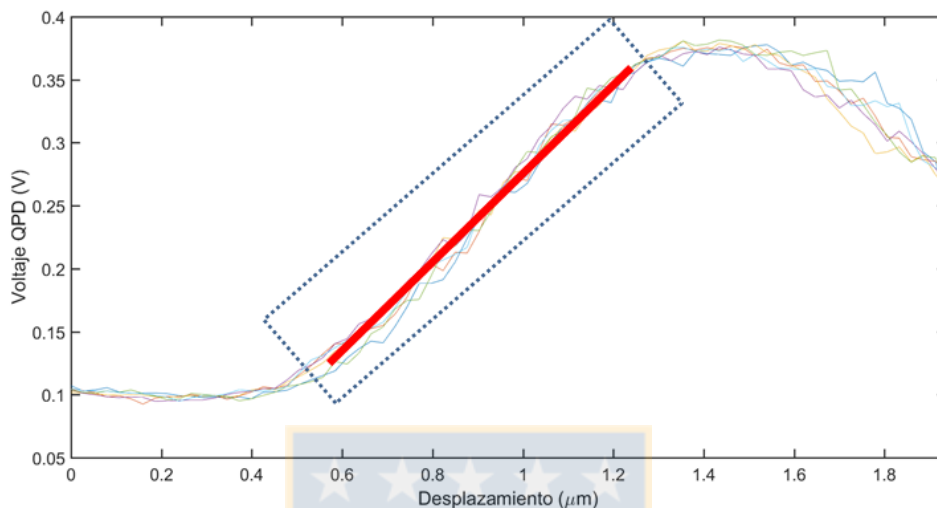


Figura 5.5: Ajuste de recta en zona lineal para curva de caracterización. Fuente: Elaboración Propia.

Tras realizar el cambio de voltaje a micrómetros para la curva del PZM, mediante un programa de análisis en Matlab se selecciona la zona lineal de la gráfica. El programa realiza un ajuste lineal de la zona seleccionada (ver Fig.5.5), del cual se extrae la pendiente con la cual se podrá escribir el factor de conversión como:

$$F_{conversion} = \frac{1}{m} = \frac{Desplazamiento(\mu m)}{V_{QPD}} \quad (5.1)$$

Luego de determinado el factor de conversión los datos en voltaje obtenidos a partir del fotodetector son multiplicados por el factor de conversión 5.1, de esta forma las señales de voltaje del fotodetector son convertidas a micrómetros:

$$Medida_{\mu m} = F \times V_{QPD} \quad (5.2)$$

Este procedimiento fue realizado para cada glóbulo rojo, tanto al inicio, en la fase intermedia y al final de las medidas de fluctuaciones. Con estas tres curvas se obtuvo una pendiente por cada una y luego un promedio de estas. Este promedio fue el utilizado para convertir las señales del QPD a  $\mu m$ . Además estas curvas son de suma importancia debido a que si alguna de ellas presenta un desplazamiento respecto a otra significa los glóbulos sufrieron algún tipo de desplazamiento descartando de esta forma ese set de datos.

## 5.4. Análisis de datos

### 5.4.1. PSD

Para determinar los parámetros mecánicos de la membrana de RBC, se determina la PSD de las fluctuaciones temporales de la membrana, mediante Matlab como el cuadrado de la transformada rápida de Fourier (*FFT*) de las series de tiempo grabadas y:

$$Y = FFT(y) \quad (5.3)$$

$$PSD = \frac{Y \times Y}{PS} \quad (5.4)$$

Aquí,  $Y^*$  denota el complejo conjugado de  $Y$ ,  $P$  es el número de datos en  $y$ , y  $S$  es la tasa de muestra de  $y$  en  $Hz$ . Cada valor de la *PSD* corresponde a la frecuencia  $f$  desde 0 a la frecuencia de Nyquist  $\frac{S}{2}$  con un incremento de  $\Delta f = \frac{S}{P}$ . Luego se ajusta el modelo de membrana plana descrito en el capítulo 1. La PSD es obtenida mediante los valores las fluctuaciones de la membrana de cada RBC. Estas fluctuaciones se registraron durante un total de 200 segundos en intervalos de 10 segundos a una frecuencia de adquisición de 20 kHz. Antes de determinar la desviación estandar media (STD) de la membrana alrededor de su posición de equilibrio, a cada señal de 10 segundos se le resta su valor medio para centrar las amplitudes de fluctuación en cero. Antes de promediar, los datos se filtraron eliminando cualquier punto de datos (refiriéndose al valor STD para datos de 10 segundos) cuyo valor de amplitud STD estaba a 3 desviaciones estándar del valor medio. Sin embargo, para cada RBC se descarta un máximo de 4 conjuntos de datos. La amplitud STD final y su error estándar para cualquiera de las cuatro condiciones estudiadas se calcula promediando el valor total obtenido de cada medición de RBC individual. Para determinar la rigidez a la flexión de los RBC individuales, se calculó la Densidad Espectral de Potencia (PSD) (con el algoritmo FFT, Matlab) para cada conjunto de datos de 10 segundos. El PSD experimental que se ajustará corresponde al valor promedio de las mediciones de 20-10 segundos. La Figura 5.6 muestra la PSD media para un RBC medido y una curva con la pendiente esperada para comparación.



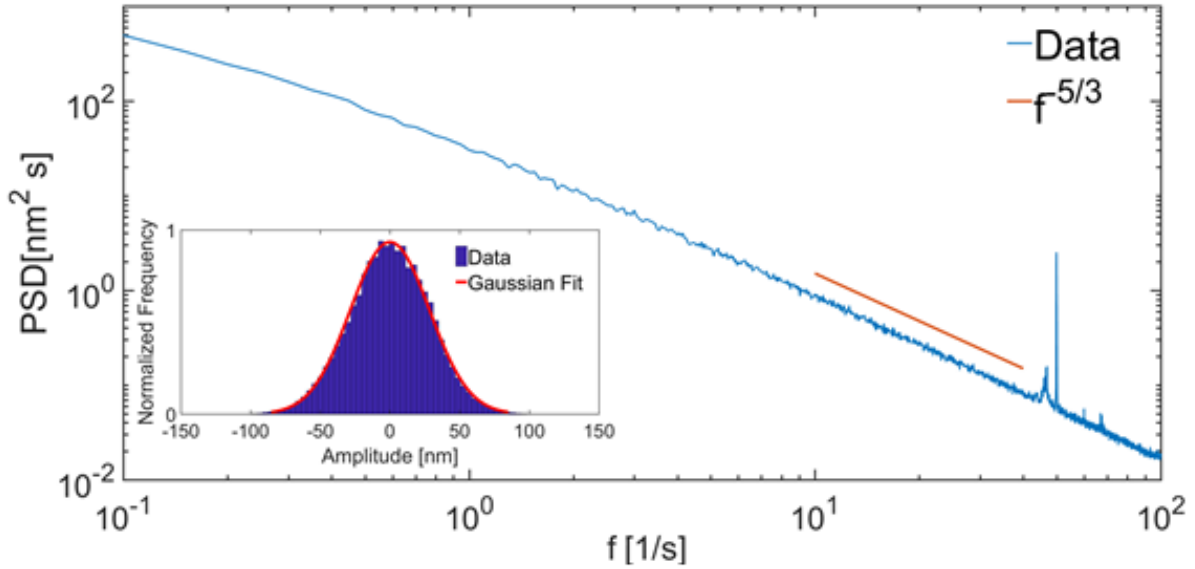


Figura 5.6: Análisis de PSD y modelo matemático. La PSD media correspondiente a una medición completa de 200s sobre un RBC, la línea naranja tiene la pendiente teórica esperada  $f^{(-5/3)}$  en el régimen de alta frecuencia. También indica los rangos de frecuencia donde se ajustó Eq.3,29 para determinar  $\kappa$ . El recuadro muestra el histograma distribuido de Gauss de amplitudes de fluctuaciones para el mismo RBC. Fuente: Elaboración propia.

#### 5.4.2. Análisis estadístico

Los datos que se muestran en la tesis son la media  $\pm$  SEM del número de experimentos independientes ( $n$ ) y representan experimentos realizados en al menos tres ocasiones diferentes con resultados similares. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías, y las comparaciones entre los grupos se realizaron mediante una prueba de Tukey protegida. La significación estadística se definió como  $p < 0,01$ .

# Capítulo 6

## Discusión y análisis de resultados

En este capítulo se presentan los resultados de fluctuaciones y parámetros mecánicos obtenidos para glóbulos rojos mediante distintas condiciones experimentales. Realizando un análisis de estos resultados y su posible interpretación.

### 6.1. Análisis de resultados

Con el fin de dilucidar el mecanismo por el cual el resveratrol actúa como un agente antioxidante en la membrana celular, determinamos la fluctuación media del borde en cien glóbulos rojos (RBC) sanos. La fluctuación media del borde es equivalente a obtener la STD a partir de un histograma de fluctuación (figura 5.6). Para los RBC normales, se ha encontrado una fluctuación media de  $28,4 \pm 2,9nm$ , que es consistente con los valores reportados en la literatura usando varias técnicas [83, 84, 86, 123], como se muestra en la tabla 6.1

STD ( <i>nm</i> )	Numero de muestras <i>n</i>	técnica	Referencia
$28,4 \pm 2,9$	100	Basada en pinzas ópticas	este trabajo
$33,0 \pm 1,3$	21	Basada en pinzas ópticas	[84]
$23,6 \pm 0,6$	94	procesamiento de videos	[123]
$30,0 \pm 5$	—	procesamiento de videos	[86]
$39,6 \pm 6,8$	16	Basada en pinzas ópticas	[83]
$36,3 \pm 12$	—	Teórico	[84]

Cuadro 6.1: Comparación de los valores medios de fluctuaciones (STD) de los glóbulos rojos sanos. Fuente: Elaboración propia.

Para investigar el efecto protector del resveratrol sobre las propiedades mecánicas de los glóbulos rojos, estos se prepararon bajo diferentes condiciones. En la figura 6.1 se muestran los resultados estadísticos de esta investigación, que se analizaron utilizando la prueba ANOVA de dos vías. Debido a este análisis, es posible mostrar en la figura 6.1 que no hay una diferencia estadística significativa entre las fluctuaciones medias de los RBC de control en comparación con los RBC incubados solo con resveratrol. Los valores muestran, al principio, que el resveratrol no produce rigidez en la membrana. En contraste, las fluctuaciones medias disminuyen para los RBC en presencia de un HClO de  $0,2\mu M$  y para los RBC en presencia de Resveratrol más HClO. Aunque, es posible apreciar una diferencia estadística significativa entre la fluctuación media de los glóbulos rojos en presencia de HClO en

comparación con la fluctuación media de los glóbulos rojos en presencia de resveratrol con HClO. Diferencia estadística entre ambos casos, indican el efecto protector de resveratrol. En relación con este resultado, es necesario pensar cómo funciona el mecanismo de protección del resveratrol.

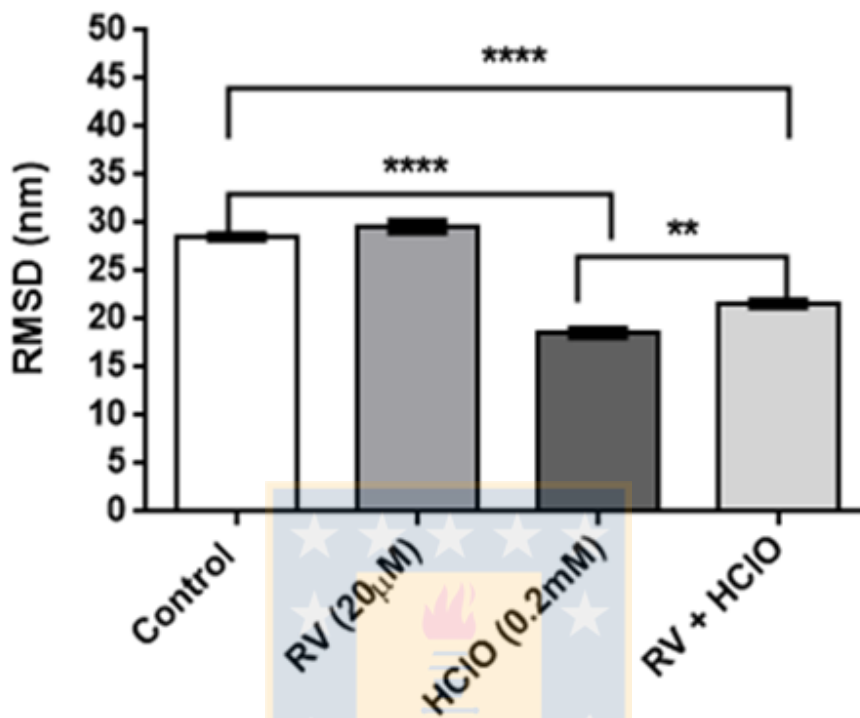


Figura 6.1: Valores de STD de las fluctuaciones de RBC en diferentes condiciones. RBC normal (control,  $n = 100$ ), RBC con  $20\mu M$  de resveratrol (RV,  $n = 20$ ), RBC con  $0,2mM$  de HClO (HClO,  $n = 20$ ) y RBC preincubados con resveratrol y luego expuestos a  $0,2mM$  de HClO (RV + HClO,  $n = 20$ ). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías, las comparaciones entre los grupos se realizaron mediante una prueba de Tukey protegida. La significación estadística se definió como  $P < 0,01$ . Fuente: Elaboración propia.

Como se mencionó antes, el análisis de fluctuación da una primera indicación sobre el comportamiento de la membrana de RBC en diferentes condiciones. Con el objetivo de obtener las propiedades mecánicas de la membrana, se realizó un análisis más específico. El módulo de flexión  $\kappa$  y la viscosidad efectiva  $\eta_{effect}$  se obtuvieron a partir de la densidad del espectro de potencia (Tabla 6.2). La viscosidad efectiva corresponde a un valor medio entre la viscosidad dentro y fuera del glóbulo. No hubo una diferencia significativa en el efecto de  $\eta$  bajo ninguna condición analizada, obteniendo como resultado un valor  $\approx 85,9 \pm 1,0Pas$  para cada caso. Por otro lado, el valor del módulo de flexión varió para diferentes condiciones en comparación con los RBC normales (control). De hecho, los valores de  $\kappa$  para los RBC tratados con RV fueron más bajos que los de las células de control, incluso cuando las fluctuaciones no fueron significativamente diferentes. Los RBC solo en presencia de HClO tuvieron el valor de  $\kappa$  más alto, lo que indicó una mayor rigidez de la membrana de RBC que en cualquier otro caso. Sin embargo, cuando los RBC se incubaron previamente con RV y luego se incubaron con la misma concentración de HClO, la rigidez no disminuyó mucho, efecto que indicaba un efecto protector de RV en los RBC contra HClO.

	$C(n = 100)$	$H^+ (n = 20)$	$RV(n = 20)$	$RV + H^+ (n = 20)$
STD ( $nm$ )	$28,6 \pm 2,6$	$18,6 \pm 1,7$	$29,6 \pm 2,5$	$21,7 \pm 1,4$
$\kappa (E - 19j)$	$2,2 \pm 0,4$	$3,6 \pm 0,5$	$1,2 \pm 0,3$	$2,9 \pm 0,6$
$\eta(E - 3Pa \cdot s)$	$86,3 \pm 0,8$	$85,1 \pm 0,9$	$85,9 \pm 1,0$	$83,1 \pm 1,1$

Cuadro 6.2: Tabla 2. Parámetros mecánicos de membrana para glóbulos rojos para diferentes condiciones. Resumen de todos los parámetros relevantes de los RBC para diferentes condiciones. En la primera fila se muestran las fluctuaciones de membrana (STDs) para cada condición. Segunda y tercera fila, contienen el módulo de flexión  $\kappa$ . El valor del módulo de flexión varía para diferentes condiciones en comparación con la situación normal para RBC. Los valores de  $\kappa$  asociados con el control y la presencia de resveratrol son más bajos incluso cuando las std son iguales en ambos casos (no tienen una diferencia estadística significativa). Revela menos rigidez que otros casos, pero la presencia de resveratrol disminuye aún más el valor de este parámetro. Por otro lado, los RBCs solo en presencia de  $H^+$  (HClO), adquirieron el valor más alto de  $\kappa$ , lo que indica una mayor rigidez de la membrana que en cualquier otro caso. Sin embargo, cuando el RBC se incubaba previamente con resveratrol y luego se pone en contacto con la misma concentración de  $H^+$  previamente, la rigidez no disminuye tanto. Revela un efecto protector del resveratrol en el RBC, lo protege de los efectos causados por  $H^+$ . Fuente: Elaboración propia.

### 6.1.1. Discusión

Las observaciones de microscopia óptica mostraron que el resveratrol indujo alteraciones morfológicas de los glóbulos rojos de su forma discoide normal a los equinocitos. Según la hipótesis de bicapa [124, 125], los cambios de forma inducidos en eritrocitos por moléculas extrañas se deben a la expansión diferencial de las dos monocapas de la membrana de los glóbulos rojos. Por lo tanto, los estomatocitos (células en forma de copa) se forman cuando el compuesto se inserta en la monocapa interna, mientras que los equinocitos (células con una configuración espinosa con ampollas en sus superficies) se producen cuando se localiza en el resto exterior. Según informes anteriores sobre los efectos del RV en la fluidez de las bicapas lipídicas [94, 98, 126], Su efecto protector sobre los glóbulos rojos se explica por el hecho de que a bajas concentraciones se intercala en las membranas de los glóbulos rojos. La caída en el módulo de flexión producida por  $20\mu M$  RV puede deberse al hecho de que a esta concentración las moléculas de RV tienden a ubicarse en los grupos polares de la membrana [94]. Según Neves et al. [126], esto resulta en un aumento de la fluidez de la membrana, disminuyendo su viscosidad y por lo tanto disminuyendo el módulo de flexión. Por otro lado, los RBC expuestos a HClO alcanzaron la máxima disminución de la fluctuación, es decir, en una mayor rigidez. Esto debería ser causado por la intercalación de moléculas de HClO dentro de la bicapa. Como consecuencia, al incubarse el RBC con RV se generaría el efecto protector porque las moléculas de HClO no podrían intercalarse en las zonas donde ya se encuentran las moléculas de RV. Además, las condiciones de fluidez iniciales de la membrana de RBC son relevantes para la interacción que tendrá con el RV [127]. Si la membrana o la bicapa lipídica tiene inicialmente una alta organización estructural, las moléculas de RV tendrán dificultades para intercalarse y solo se depositarán superficialmente. A la inversa, si la membrana antes de interactuar con el RV tiene una mayor fluidez o desorganización estructural, las moléculas del RV se intercalarán más fácilmente y, por lo tanto, generarán una mayor rigidez. Uno de los factores que pueden influir en esta organización estructural inicial de la membrana puede ser su temperatura inicial [127].

# Capítulo 7

## Conclusión y proyecciones

En la presente tesis se desarrollo e implemento un sistema de pinzas ópticas débiles con la finalidad de estudiar propiedades mecánicas en glóbulos rojos, si bien se logro realizar el estudio, con resultados positivos, también se puede señalar que el montaje puede ser mayormente mejorado, considerando que se presentaron fallas mecánicas durante las mediciones que obligaban a reiterar las medidas, estas fallas eran atribuibles principalmente al porta muestra el cual en reiteradas veces presentaba desplazamientos mecánicos por esta razón es recomendable utilizar un sistema porta muestra que sea controlable mediante motores. otra de las posibles modificaciones es considerar un piezo eléctrico de mayor recorrido, de esta forma no seria necesario incluir un sistema reductor para aumentar el rango de desplazamiento del haz láser y esta modificación también tendría como consecuencia aumentar el área de sensado en el plano de la muestra.

En el contexto del sensado de propiedades mecánicas de sistemas bilógicos, las pinzas ópticas débiles cómo herramienta para la caracterización del comportamiento de los glóbulos rojos, se presenta como una herramienta flexible para este fin. Su uso, en principio, estudia el comportamiento que tienen los góbulos rojos u otras células tales como neuronitas en función del medio que las rodea. Es así cómo se ha podido medir los niveles de fluctuación de los góbulos rojos en función de concentraciones de resveratrol, y mediante el uso de esta información, se ha podido extraer el valor del módulo de flexión asociado. Sin embargo, este estudio presentó desafíos técnicos a superar para acceder a más y mejor información como también, abrió interrogantes acerca de los sistemas bilógicos. Lo anterior, nos permite hacer proyecciones acerca de trabajos futuros en base a esta técnica de sensado. Una de las dificultades y desafíos presentes en la técnica, es tener un sistema estable mecánicamente y con los filtros adecuados de frecuencias bajas (0- 30 Hz) de manera de aislar la medición de oscilaciones indeseadas no relacionadas con las frecuencias del sistema biológico, que por su naturaleza, son frecuencias en este orden. Lo anterior, permitirá que al aplicar el modelo de membrana, se pueda extraer no solo el módulo de flexión sino que también el módulo de cizalle el cual se encuentra asociado a las frecuencias bajas mencionadas. Por su parte, los desafíos y proyecciones de la técnica aplicada en el estudio de glóbulos rojos surgen de las siguientes preguntas:¿ La medición local de fluctuación de membrana es la misma en cualquier punto de la superficie?;¿Si existe correlación entre las fluctuaciones de diferentes puntos de la membrana, cuáles son los mecanismos asociados que conectan estos dos puntos?. Lo anterior nos plantea como primer desafío el implementar una segunda pinza óptica débil. Esto, nos permitirá medir simultáneamente las fluctuaciones entre por ejemplo dos polos y realizar estudios de correlación para responder la pregunta planteada. En este mismo sentido, una proyección desafiante será tratar de generar múltiples pinzas a través del uso, por ejemplo, de fibras ópticas mono modos multi núcleo. Esto permitiría realizar estudios de correlación entre múltiples puntos de un glóbulo rojo lo cual permitiría mejorar el modelamiento de las membranas.

# Bibliografía

- [1] Zernike, F. (1955). How I discovered phase contrast. *Science*, 121(3141), 345-349.
- [2] Zernike, F. (1942). Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects part I. *Physica*, 9(7), 686-698.
- [3] Zernike, F. (1942). Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects part II. *Physica*, 9(10), 974-986.
- [4] Murphy, D., & Davidson, M. W. (2001). Phase contrast microscopy in Differential interference contrast (DIC) microscopy and modulation contrast microscopy. *Fundamentals of light microscopy and digital imaging*, 153-168.
- [5] Richards, O. W. (1956). Phase Microscopy 1954-56. *Science*, 124(3226), 810-814.
- [6] Frohlich, V. C. (2008). Phase contrast and differential interference contrast (DIC) microscopy. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (17).
- [7] Hostounsky, Z., & Pelc, R. (2007). Phase-contrast versus off-axis illumination: is a more complex microscope always more powerful?. *Advances in physiology education*, 31(2), 232-235.
- [8] Huang, B. (2010). Super-resolution optical microscopy: multiple choices. *Current opinion in chemical biology*, 14(1), 10-14.
- [9] Heintzmann, R., & Ficz, G. (2006). Breaking the resolution limit in light microscopy. *Briefings in Functional Genomics*, 5(4), 289-301.
- [10] Heintzmann, R., & Gustafsson, M. G. (2009). Subdiffraction resolution in continuous samples. *Nature Photonics*, 3(7), 362.
- [11] Lippincott-Schwartz, J., & Manley, S. (2009). Putting super-resolution fluorescence microscopy to work. *Nature methods*, 6(EPFL-ARTICLE-182475), 21-23.
- [12] Kamiyama, D., & Huang, B. (2012). Development in the STORM. *Developmental cell*, 23(6), 1103-1110.
- [13] Bates, M., Huang, B., Dempsey, G. T., & Zhuang, X. (2007). Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes. *Science*, 317(5845), 1749-1753.
- [14] Bates, M., Huang, B., & Zhuang, X. (2008). Super-resolution microscopy by nanoscale localization of photo-switchable fluorescent probes. *Current opinion in chemical biology*, 12(5), 505-514.

- [15] Huang, B., Jones, S. A., Brandenburg, B., & Zhuang, X. (2008). Whole-cell 3D STORM reveals interactions between cellular structures with nanometer-scale resolution. *Nature methods*, 5(12), 1047.
- [16] Rust, M. J., Bates, M., & Zhuang, X. (2006). Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature methods*, 3(10), 793.
- [17] Zhuang, X. (2009). Nano-imaging with STORM. *Nature photonics*, 3(7), 365.
- [18] Henriques, R., & Mhlanga, M. M. (2009). PALM and STORM: What hides beyond the Rayleigh limit?. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 4(6), 846-857.
- [19] Hell, S. W., & Wichmann, J. (1994). Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics letters*, 19(11), 780-782.
- [20] Klar, T. A., Engel, E., & Hell, S. W. (2001). Breaking Abbe's diffraction resolution limit in fluorescence microscopy with stimulated emission depletion beams of various shapes. *Physical Review E*, 64(6), 066613.
- [21] Klar, T. A., Jakobs, S., Dyba, M., Egner, A., & Hell, S. W. (2000). Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(15), 8206-8210.
- [22] Moneron, G., & Hell, S. W. (2009). Two-photon excitation STED microscopy. *Optics express*, 17(17), 14567-14573.
- [23] Ono, T., Okamoto, R., & Takeuchi, S. (2013). An entanglement-enhanced microscope. *Nature communications*, 4, ncomms3426.
- [24] Moffitt, J. R., Chemla, Y. R., Smith, S. B., & Bustamante, C. (2008). Recent advances in optical tweezers. *Annual review of biochemistry*, 77.
- [25] Bustamante, C., Chemla, Y. R., Forde, N. R., & Izhaky, D. (2004). Mechanical processes in biochemistry. *Annual review of biochemistry*, 73(1), 705-748.
- [26] Moffitt, J. R., Chemla, Y. R., Izhaky, D., & Bustamante, C. (2006). Differential detection of dual traps improves the spatial resolution of optical tweezers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(24), 9006-9011.
- [27] Araneda, G., San Martín, N. C., & Staforelli, J. P. (2011, April). An Approach to Selective Optical Isolation and Cloning of Cyanobacterias of Atacama Desert. In *Novel Techniques in Microscopy* (p. JTUA33). Optical Society of America.
- [28] Gallardo, M. J., Staforelli, J. P., Meza, P., Bordeu, I., & Torres, S. (2014). Characterization of *Chromobacterium violaceum* pigment through a hyperspectral imaging system. *AMB Express*, 4(1), 4.
- [29] Staforelli, J. P., Gallardo, M. J., Meza, P., Torres, S., Mella, H., & Reyes, C. (2014, March). Non-contact measurement technique for enzymatic reaction of glucokinase. In *Optical Methods in Developmental Biology II* (Vol. 8953, p. 89530L). International Society for Optics and Photonics.

- [30] Torres, S., Mella, H., Reyes, C., Meza, P., Gallardo, M. J., & Staforelli, J. P. (2015). Features for instantaneous emissions of low-level infrared signals of glucokinase enzyme from *pyrococcus furiosus*. *Applied optics*, 54(8), 2057-2065.
- [31] Staforelli, J. P., Vera, E., Brito, J. M., Solano, P., Torres, S., & Saavedra, C. (2010). Superresolution imaging in optical tweezers using high-speed cameras. *Optics Express*, 18(4), 3322-3331.
- [32] Staforelli, J. P., Brito, J. M., Vera, E., Solano, P., & Lencina, A. (2010). A clustered speckle approach to optical trapping. *Optics Communications*, 283(23), 4722-4726.
- [33] Lencina, A., Solano, P., Staforelli, J. P., Brito, J. M., Tebaldi, M., & Bolognini, N. (2012). Three-dimensional clustered speckle fields: theory, simulations and experimental verification. *Optics Express*, 20(19), 21145-21159.
- [34] Arias, A., Etcheverry, S., Solano, P., Staforelli, J. P., Gallardo, M. J., Rubinsztein-Dunlop, H., & Saavedra, C. (2013). Simultaneous rotation, orientation and displacement control of birefringent microparticles in holographic optical tweezers. *Optics express*, 21(1), 102-111.
- [35] Suwalsky, M., Jemiola-Rzeminska, M., Astudillo, C., Gallardo, M. J., Staforelli, J. P., Villena, F., & Strzalka, K. (2015). An in vitro study on the antioxidant capacity of usnic acid on human erythrocytes and molecular models of its membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1848(11), 2829-2838.
- [36] Bordeu, I., Volpe, G., & Staforelli, J. P. (2013, November). Spatial measurement of spurious forces with optical tweezers. In *8th Iberoamerican Optics Meeting and 11th Latin American Meeting on Optics, Lasers, and Applications* (Vol. 8785, p. 878509). International Society for Optics and Photonics.
- [37] Magazzù, A., Callegari, A., Staforelli, J. P., Gambassi, A., Dietrich, S., & Volpe, G. (2018). Controlling the dynamics of colloidal particles by critical Casimir forces. *arXiv preprint arXiv:1806.11403*.
- [38] Ashkin, A. (1970). Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Physical review letters*, 24(4), 156.
- [39] Ashkin, A., Dziedzic, J. M., Bjorkholm, J. E., & Chu, S. (1986). Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Optics letters*, 11(5), 288-290.
- [40] Ashkin, A., & Dziedzic, J. M. (1987). Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science*, 235(4795), 1517-1520.
- [41] Ashkin, A., Dziedzic, J. M., & Yamane, T. (1987). Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature*, 330(6150), 769-771.
- [42] Ghislain, L. P., Switz, N. A., & Webb, W. W. (1994). Measurement of small forces using an optical trap. *Review of Scientific Instruments*, 65(9), 2762-2768.
- [43] Zhang, X., Ma, L., & Zhang, Y. (2013). High-resolution optical tweezers for single-molecule manipulation. *The Yale journal of biology and medicine*, 86(3), 367.



- [44] Neuman, K. C., & Nagy, A. (2008). Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nature methods*, 5(6), 491-505.
- [45] Bustamante, C., Cheng, W., & Mejia, Y. X. (2011). Revisiting the central dogma one molecule at a time. *Cell*, 144(4), 480-497.
- [46] Merz, A. J., So, M., & Sheetz, M. P. (2000). Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature*, 407(6800), 98.
- [47] Chemla, Y. R., Aathavan, K., Michaelis, J., Grimes, S., Jardine, P. J., Anderson, D. L., & Bustamante, C. (2005). Mechanism of force generation of a viral DNA packaging motor. *Cell*, 122(5), 683-692.
- [48] Smith, D. E., Tans, S. J., Smith, S. B., & Grimes, S. (2001). The bacteriophage phi29 portal motor can package DNA against a large internal force. *Nature*, 413(6857), 748.
- [49] Ashkin, A. (1992). Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Biophysical journal*, 61(2), 569-582.
- [50] Wright, W. H., Sonek, G. J., & Berns, M. W. (1994). Parametric study of the forces on microspheres held by optical tweezers. *Applied optics*, 33(9), 1735-1748.
- [51] Harada, Y., & Asakura, T. (1996). Radiation forces on a dielectric sphere in the Rayleigh scattering regime. *Optics communications*, 124(5-6), 529-541.
- [52] W... T. Coffey, Yu... P. Kalmykov, & J... T. Waldron. (1996). *The Langevin equation: with applications in physics, chemistry and electrical engineering*. World Scientific.
- [53] Deng, Y., Bechhoefer, J., & Forde, N. R. (2007). Brownian motion in a modulated optical trap. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*, 9(8), S256.
- [54] Berg-Sorensen, K., & Flyvbjerg, H. (2004). Power spectrum analysis for optical tweezers. *Review of Scientific Instruments*, 75(3), 594-612.
- [55] Ashkin, A. and Dziedzic, J.M. (1989) Internal cell manipulation using infrared laser traps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 7914-7918].
- [56] Ashkin, A., Schütze, K., Dziedzic, J. M., Euteneuer, U., & Schliwa, M. (1990). Force generation of organelle transport measured in vivo by an infrared laser trap. *Nature*, 348(6299), 346.
- [57] Smith, S. B., Cui, Y., & Bustamante, C. (1996). Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules. *Science*, 271(5250), 795-799.
- [58] Svoboda, K., Schmidt, C. F., Branton, D., & Block, S. M. (1992). Conformation and elasticity of the isolated red blood cell membrane skeleton. *Biophysical journal*, 63(3), 784-793.
- [59] Bronkhorst, P. J., Streekstra, G. J., Grimbergen, J., Nijhof, E. J., Sixma, J. J., & Brakenhoff, G. J. (1995). A new method to study shape recovery of red blood cells using multiple optical trapping. *Biophysical journal*, 69(5), 1666.
- [60] Tadir, Y., Wright, W. H., Vafa, O., Ord, T., Asch, R. H., & Berns, M. W. (1989). Micromanipulation of sperm by a laser generated optical trap.

- [61] Berns, M. W., Wright, W. H., Tromberg, B. J., Profeta, G. A., Andrews, J. J., & Walter, R. J. (1989). Use of a laser-induced optical force trap to study chromosome movement on the mitotic spindle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(12), 4539-4543.
- [62] Liang, H., Wright, W. H., Cheng, S., He, W., & Berns, M. W. (1993). Micromanipulation of chromosomes in PTK2 cells using laser microsurgery (optical scalpel) in combination with laser-induced optical force (optical tweezers). *Experimental cell research*, 204(1), 110-120.
- [63] Vorobjev, I. A., Liang, H., Wright, W. H., & Berns, M. W. (1993). Optical trapping for chromosome manipulation: a wavelength dependence of induced chromosome bridges. *Biophysical journal*, 64(2), 533-538.
- [64] Seeger, S., Monajembashi, S., Hutter, K. J., Futterman, G., Wolfrum, J., & Greulich, K. O. (1991). Application of laser optical tweezers in immunology and molecular genetics. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 12(6), 497-504.
- [65] Dai, J., & Sheetz, M. P. (1995). Mechanical properties of neuronal growth cone membranes studied by tether formation with laser optical tweezers. *Biophysical journal*, 68(3), 988-996.
- [66] Edidin, M., Kuo, S. C., & Sheetz, M. P. (1991). Lateral movements of membrane glycoproteins restricted by dynamic cytoplasmic barriers. *Science*, 254(5036), 1379-1382.
- [67] Kusumi, A., Sako, Y., Fujiwara, T., & Tomishige, M. (1997). Application of laser tweezers to studies of the fences and tethers of the membrane skeleton that regulate the movements of plasma membrane proteins. In *Methods in cell biology* (Vol. 55, pp. 173-194). Academic Press.
- [68] Sako, Y., Nagafuchi, A., Tsukita, S., Takeichi, M., & Kusumi, A. (1998). Cytoplasmic regulation of the movement of E-cadherin on the free cell surface as studied by optical tweezers and single particle tracking: corraling and tethering by the membrane skeleton. *The Journal of cell biology*, 140(5), 1227-1240.
- [69] Helfrich, W. (1973). Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 28(11-12), 693-703.
- [70] Helfrich, W. S. R. M., & Servuss, R. M. (1984). Undulations, steric interaction and cohesion of fluid membranes. *Il Nuovo Cimento D*, 3(1), 137-151.
- [71] Mutz, M., & Helfrich, W. (1990). Bending rigidities of some biological model membranes as obtained from the Fourier analysis of contour sections. *Journal de Physique*, 51(10), 991-1001.
- [72] Helfrich, W. (1978). Steric interaction of fluid membranes in multilayer systems. *Zeitschrift für Naturforschung A*, 33(3), 305-315.
- [73] Monzel, C., & Sengupta, K. (2016). Measuring shape fluctuations in biological membranes. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 49(24), 243002.
- [74] Svetina, S., & Zeks, B. (1983). Bilayer couple hypothesis of red cell shape transformations and osmotic hemolysis. *Biomed. Biochim. Acta*, 42(86), 1983.
- [75] Milner, S. T., & Safran, S. A. (1987). Dynamical fluctuations of droplet microemulsions and vesicles. *Physical Review A*, 36(9), 4371.

- [76] Lipowsky, R. (1991). The conformation of membranes. *Nature*, 349(6309), 475.
- [77] Seifert, U. (1997). Configurations of fluid membranes and vesicles. *Advances in physics*, 46(1), 13-137.
- [78] Brochard, F., & Lennon, J. F. (1975). Frequency spectrum of the flicker phenomenon in erythrocytes. *Journal de Physique*, 36(11), 1035-1047.
- [79] Zilker, A., Ziegler, M., & Sackmann, E. (1992). Spectral analysis of erythrocyte flickering in the  $0.374 - \mu m^2$  regime by microinterferometry combined with fast image processing. *Physical Review A*, 46(12), 7998.
- [80] Chen, J. Y., & Huestis, W. H. (1997). Role of membrane lipid distribution in chlorpromazine-induced shape change of human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1323(2), 299-309.
- [81] Boon, J. M., & Smith, B. D. (2002). Chemical control of phospholipid distribution across bilayer membranes. *Medicinal research reviews*, 22(3), 251-281.
- [82] Devaux, P. F., & Zachowski, A. (1994). Maintenance and consequences of membrane phospholipid asymmetry. *Chemistry and Physics of Lipids*, 73(1-2), 107-120.
- [83] Gogler, M., Betz, T., & Kas, J. A. (2007). Simultaneous manipulation and detection of living cell membrane dynamics. *Optics letters*, 32(13), 1893-1895.
- [84] Betz, T., Lenz, M., Joanny, J. F., & Sykes, C. (2009). ATP-dependent mechanics of red blood cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(36), 15320-15325.
- [85] Monzel, C., & Sengupta, K. (2016). Measuring shape fluctuations in biological membranes. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 49(24), 243002.
- [86] Strey, H., Peterson, M., & Sackmann, E. (1995). Measurement of erythrocyte membrane elasticity by flicker eigenmode decomposition. *Biophysical Journal*, 69(2), 478-488.
- [87] Betz, T., & Sykes, C. (2012). Time resolved membrane fluctuation spectroscopy. *Soft Matter*, 8(19), 5317-5326.
- [88] Gárate, F., Betz, T., Pertusa, M., & Bernal, R. (2015). Time-resolved neurite mechanics by thermal fluctuation assessments. *Physical biology*, 12(6), 066020.
- [89] Gárate, F., Pertusa, M., Arana, Y., & Bernal, R. A. (2018). Non-invasive neurite mechanics in differentiated PC12 cells. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 194.
- [90] Frémont, L. (2000). Biological effects of resveratrol. *Life sciences*, 66(8), 663-673.
- [91] Gulcin, ?. (2010). Antioxidant properties of resveratrol: a structure?activity insight. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 210-218.
- [92] Bai, Y., Mao, Q. Q., Qin, J., Zheng, X. Y., Wang, Y. B., Yang, K., ... & Xie, L. P. (2010). Resveratrol induces apoptosis and cell cycle arrest of human T24 bladder cancer cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Cancer science*, 101(2), 488-493.

- [93] Milardi, G. L., Stringaro, A., Colone, M., Bonincontro, A., & Risuleo, G. (2014). The cell membrane is the main target of resveratrol as shown by interdisciplinary biomolecular/cellular and biophysical approaches. *The Journal of membrane biology*, 247(1), 1-8.
- [94] Selvaraj, S., Mohan, A., Narayanan, S., Sethuraman, S., & Krishnan, U. M. (2013). Dose-dependent interaction of trans-resveratrol with biomembranes: effects on antioxidant property. *Journal of medicinal chemistry*, 56(3), 970-981.
- [95] Leonard, S. S., Xia, C., Jiang, B. H., Stinefelt, B., Klandorf, H., Harris, G. K., & Shi, X. (2003). Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochemical and biophysical research communications*, 309(4), 1017-1026.
- [96] Zavodnik, I. B., Lapshina, E. A., Zavodnik, L. B., Bartosz, G., Soszynski, M., & Bryszewska, M. (2001). Hypochlorous acid damages erythrocyte membrane proteins and alters lipid bilayer structure and fluidity. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(4), 363-369.
- [97] Suwalsky, M., Villena, F., & Gallardo, M. J. (2015). In vitro protective effects of resveratrol against oxidative damage in human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1848(1), 76-82.
- [98] Grecco, H. E., Schmick, M., & Bastiaens, P. I. (2011). Signaling from the living plasma membrane. *Cell*, 144(6), 897-909.
- [99] Doherty, G. J., & McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annual review of biochemistry*, 78, 857-902.
- [100] Sinha, B., Köster, D., Ruez, R., Gonnord, P., Bastiani, M., Abankwa, D., ... & Morone, N. (2011). Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell*, 144(3), 402-413.
- [101] Helfrich, W. (1973). Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 28(11-12), 693-703.
- [102] Evans, E., & Rawicz, W. (1990). Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes. *Physical Review Letters*, 64(17), 2094.
- [103] Bo, L., & Waugh, R. E. (1989). Determination of bilayer membrane bending stiffness by tether formation from giant, thin-walled vesicles. *Biophysical Journal*, 55(3), 509-517.
- [104] Duwe, H. P., Kaes, J., & Sackmann, E. (1990). Bending elastic moduli of lipid bilayers: modulation by solutes. *Journal de Physique*, 51(10), 945-961.
- [105] Pécrciaux, J., Dobreiner, H. G., Prost, J., Joanny, J. F., & Bassereau, P. (2004). Refined contour analysis of giant unilamellar vesicles. *The European Physical Journal E*, 13(3), 277-290.
- [106] Brochard, F., & Lennon, J. F. (1975). Frequency spectrum of the flicker phenomenon in erythrocytes. *Journal de Physique*, 36(11), 1035-1047.
- [107] Schneider, M. B., Jenkins, J. T., & Webb, W. W. (1984). Thermal fluctuations of large quasi-spherical bimolecular phospholipid vesicles. *Journal de Physique*, 45(9), 1457-1472.
- [108] Milner, S. T. (1987). ST Milner and SA Safran, *Phys. Rev. A* 36, 4371 (1987). *Phys. Rev. A*, 36, 4371.

- [109] Evans, E. (1994). E. Evans and A. Yeung, *Chem. Phys. Lipids* 73, 39 (1994). *Chem. Phys. Lipids*, 73, 39.
- [110] Seifert, U. (1993). U. Seifert and SA Langer, *Europhys. Lett.* 23, 71 (1993). *Europhys. Lett.*, 23, 71.
- [111] Zilman, A. G. (1996). AG Zilman and R. Granek, *Phys. Rev. Lett.* 77, 4788 (1996). *Phys. Rev. Lett.*, 77, 4788.
- [112] Zilman, A. G., & Granek, R. (2002). Membrane dynamics and structure factor. *Chemical Physics*, 284(1-2), 195-204.
- [113] Arriaga, L. R., Rodriguez-Garcia, R., López-Montero, I., Farago, B., Hellweg, T., & Monroy, F. (2010). Dissipative curvature fluctuations in bilayer vesicles: Coexistence of pure-bending and hybrid curvature-compression modes. *The European Physical Journal E*, 31(1), 105-113.
- [114] Brown, A. T., Kotar, J., & Cicuta, P. (2011). Active rheology of phospholipid vesicles. *Physical Review E*, 84(2), 021930.
- [115] T. Pott & P. Mlard, *Europhys. Lett.*, 2002, 59, 7.
- [116] Rodríguez-García, R., Arriaga, L. R., Mell, M., Moleiro, L. H., López-Montero, I., & Monroy, F. (2009). Bimodal spectrum for the curvature fluctuations of bilayer vesicles: Pure bending plus hybrid curvature-dilation modes. *Physical review letters*, 102(12), 128101.
- [117] Sikharulidze, I., Farago, B., Dolbnya, I. P., Madsen, A., & de Jeu, W. H. (2003). Surface and bulk elasticity determined fluctuation regimes in smectic membranes. *Physical review letters*, 91(16), 165504.
- [118] Sikharulidze, I., & de Jeu, W. H. (2005). Dynamics of fluctuations in smectic membranes. *Physical Review E*, 72(1), 011704.
- [119] Prost, J., Manneville, J. B., & Bruinsma, R. (1998). Fluctuation-magnification of non-equilibrium membranes near a wall. *The European Physical Journal B-Condensed Matter and Complex Systems*, 1(4), 465-480.
- [120] Seifert, U. (1994). Dynamics of a bound membrane. *Physical Review E*, 49(4), 3124.
- [121] W. J. Smith, *Modern Optical Engineering* (McGraw-Hill, 2000), Chap. 13.
- [122] Fällman, E., & Axner, O. (1997). Design for fully steerable dual-trap optical tweezers. *Applied Optics*, 36(10), 2107-2113.
- [123] Evans, J., Gratzer, W., Mohandas, N., Parker, K., & Sleep, J. (2008). Fluctuations of the red blood cell membrane: relation to mechanical properties and lack of ATP dependence. *Biophysical journal*, 94(10), 4134-4144.
- [124] Sheetz, M. P., & Singer, S. J. (1974). Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(11), 4457-4461.

- [125] HW, G. L., Wortis, M., & Mukhopadhyay, R. (2002). Stomatocyte?discocyte?echinocyte sequence of the human red blood cell: Evidence for the bilayer?couple hypothesis from membrane mechanics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(26), 16766-16769.
- [126] Neves, A. R., Nunes, C., & Reis, S. (2015). New insights on the biophysical interaction of resveratrol with biomembrane models: relevance for its biological effects. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(35), 11664-11672.
- [127] Neves, A. R., Nunes, C., Amenitsch, H., & Reis, S. (2016). Effects of resveratrol on the structure and fluidity of lipid bilayers: A membrane biophysical study. *Soft matter*, 12(7), 2118-2126.

