

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICO MATEMÁTICAS

POSGRADO EN INGENIERÍA FÍSICA INDUSTRIAL



ESTUDIO MORFOLÓGICO Y VISCOELÁSTICO DE
CÉLULAS VIVAS: METODOLOGÍA Y PARÁMETROS
DE INTERÉS

POR

BERTHA GUADALUPE VÁZQUEZ CISNEROS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN INGENIERÍA FÍSICA INDUSTRIAL

JUNIO 2026

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICO MATEMÁTICAS

POSGRADO EN INGENIERÍA FÍSICA INDUSTRIAL



ESTUDIO MORFOLÓGICO Y VISCOELÁSTICO DE
CÉLULAS VIVAS: METODOLOGÍA Y PARÁMETROS
DE INTERÉS

POR

BERTHA GUADALUPE VÁZQUEZ CISNEROS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN INGENIERÍA FÍSICA INDUSTRIAL

JUNIO 2026



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICO MATEMÁTICAS
POSGRADO EN INGENIERÍA FÍSICA INDUSTRIAL

Los miembros del Comité recomendamos que la Tesis «Estudio morfológico y viscoelástico de células vivas: metodología y parámetros de interés», realizada por la Licenciada Bertha Guadalupe Vázquez Cisneros, con número de matrícula 1989953, sea aceptada para su defensa como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ingeniería Física Industrial.

El Comité de Tesis

Dra. Maricela Rodríguez Nieto
Asesor

Dr. Jorge Luis Menchaca Arredondo
Co-asesor

Dra. Diana Ginette Zárate Triviño
Revisor

Dr. Álvaro Eduardo Cordero Franco
Subdirector de Estudios de Posgrado

San Nicolás de los Garza, Nuevo León, junio 2026

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a las personas e instituciones que hicieron esta tesis posible.

A mis asesores de tesis, la Dra. Maricela Rodríguez Nieto y el Dr. Jorge Luis Menchaca Arredondo, cuya experiencia e instrucción fueron fundamentales para realizar este trabajo. Su motivación y su guía me impulsaron a afrontar desafíos y llevar a término esta investigación.

A mis compañeros de laboratorio y mis colegas, por apoyarme cada vez que tenían oportunidad y aportar su conocimiento y sus opiniones.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y a la Facultad de Ciencias Físico Matemáticas, por formarme como profesionista y permitirme crecer profesional y académicamente.

Al departamento de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, por brindarme uso de sus instalaciones y recursos para llevar a cabo esta investigación. Especialmente quiero reconocer a la MsC. Jennifer Leos Rivera, por su invaluable conocimiento y trabajo en el cultivo de todas las células utilizadas en los experimentos realizados en este trabajo.

Al SECIHTI, por beneficiar mi educación y mi proyecto por medio de una beca de tiempo completo y un apoyo complementario de movilidad en el extranjero (No. CVU: 2044134) y por beneficiar mi laboratorio con el proyecto de ciencia de frontera CF-2023-I-1865. Además agradezco a la Fundación UANL, por proveerme con fondos para conseguir boletos de avión y así realizar una estancia en el extranjero.

DEDICATORIA

*A mis padres y mi hermano
por nunca dejarme sola e impulsarme a llegar cada vez más lejos.*

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción	1
1.1. Planteamiento del problema	1
1.2. Antecedentes	2
1.3. Justificación	4
1.4. Hipótesis	5
1.5. Objetivos	5
1.5.1. General	5
1.5.2. Específicos	5
2. Marco Teórico	7
2.1. La célula	7
2.2. Propiedades físicas de las células	9
2.2.1. Propiedades físicas como biomarcadores	10
2.3. Descriptores geométricos de la morfología	12
2.3.1. Descriptores morfológicos convencionales	13

2.3.2. Descriptores morfológicos basados en el contorno	14
2.4. Técnicas para la observación morfológica de células adherentes	22
2.5. Propiedades mecánicas	23
2.5.1. Módulo de Young	24
2.5.2. Viscoelasticidad	27
2.5.3. Ensayos de relajación y fluencia	28
2.5.4. Modelos viscoelásticos	29
2.5.5. Curvas de fuerza-distancia y fuerza-relajación con AFM	32
3. Metodología general	36
3.1. Cultivo celular	36
3.2. Microscopías empleadas	37
3.2.1. Microscopía óptica	37
3.2.2. Microscopía de fuerza atómica	38
3.3. Adquisición de imágenes	39
3.4. Segmentación celular	40
3.5. Descriptores morfológicos y viscoelásticos	41
3.5.1. Descriptores morfológicos convencionales	41
3.5.2. Descriptores basados en contorno	42
3.5.3. Descriptores mecánicos y viscoelásticos	42
3.6. Análisis de resultados	42

4. Morfología celular: parámetros de interés y diagramas de fase	44
4.1. Diseño experimental	45
4.2. Análisis de descriptores morfológicos en figuras geométricas	46
4.2.1. Descriptores geométricos convencionales	46
4.2.2. Métricas derivadas de LOCO-EFA	47
4.2.3. Diagramas de fase	48
4.3. Influencia de la modalidad de microscopía en la caracterización morfológica de células MG63	50
4.3.1. Visualización de contornos celulares	51
4.3.2. Efecto de la modalidad de microscopía en las métricas morfológicas	51
4.3.3. Clasificación morfológica mediante SC y circularidad	53
4.3.4. Distribución morfológica mediante análisis KDE	54
4.4. Caracterización morfológica de líneas celulares humanas y murinas . .	55
4.4.1. Comparación de métricas morfológicas entre líneas celulares .	56
4.4.2. Discriminación de fenotipos morfológicos mediante diagramas de fase	58
4.4.3. Resumen estadístico de SC y circularidad	60
4.5. Conclusiones y perspectivas de la metodología propuesta	62
 5. Cambios morfológicos de células HUVEC: efecto de la concentración de miel	 64

5.1. Diseño experimental	65
5.2. Resultados y discusión	66
5.2.1. Cambios morfológicos derivados del tratamiento	66
5.2.2. Caracterización morfológica de células viables y no viables . .	70
5.3. Conclusiones y perspectivas del comportamiento morfológico	75
6. Estudio simultáneo de la morfología y viscoelasticidad de células MG63	76
6.1. Diseño experimental	77
6.2. Clasificación con métricas morfológicas	78
6.3. Influencia de la forma en las propiedades mecánicas	80
6.3.1. Modelo fraccional de Kelvin	80
6.3.2. Modelo fraccional de Zener	82
6.4. Influencia de la velocidad de indentación en las propiedades mecánicas	84
6.5. Discusión	87
6.6. Conclusiones y perspectivas de la integración entre morfología y viscoelasticidad	94
7. Conclusiones y perspectivas generales	96
7.1. Conclusiones	96
7.2. Perspectivas	98
A. Apéndice: Procedimiento utilizado para extraer morfométricas	101

ÍNDICE DE FIGURAS

2.1. Representación esquemática de los principales componentes estructurales de una célula animal.	8
2.2. Camino óptico y partes de un microscopio: a) campo claro y b) contraste de fases.	23
2.3. Representación mecánica del comportamiento a) elástico y b) viscoso; c) modelo de Maxwell y d) modelo de Kelvin.	29
2.4. Arreglo mecánico para a) el modelo SLS y b) el modelo generalizado de Maxwell.	30
2.5. Arreglo mecánico para el modelo fraccional de zenner.	31
2.6. Esquema de una curva típica de FDC en un material elástico. Se muestra la posición del cantilever en cada paso; se denota en rojo la aproximación y en azul la retracción.	33
2.7. Esquema de curvas típicas: a) curva fuerza-distancia y b) curva fuerza-relajación en una célula, respectivamente. Se muestra la posición del cantilever en cada paso; se denota en rojo la aproximación, en negro la relajación y en azul la retracción.	34
3.1. Diagrama esquemático del arreglo experimental para tomar las microfotografías	38

3.2. Arreglo experimental del microscopio óptico invertido acoplado al AFM.	39
3.3. a) Imagen con células tomadas con microscopía de contraste de fases, b) máscaras binarias segmentadas por el modelo entrenado y c) máscara de una célula individual.	40
3.4. Vista de células MG63. a) Imagen adquirida desde el microscopio del AFM, b) imagen obtenida por el microscopio óptico invertido, c) máscaras binarizadas de las células indentadas y d) máscara de una célula individual.	41
4.1. a) Figuras geométricas de dimensiones equivalentes utilizadas en el análisis. b) Mapa de calor de las métricas morfológicas convencionales: razón de aspecto, circularidad, redondez y solidez.	46
4.2. Polígonos regulares analizados con sus máscaras binarias sobrepuestas en los planos a) SC vs entropía y b) SC vs circularidad	49
4.3. Imágenes representativas de células MG63 obtenidas mediante a) microscopía de campo claro y b) microscopía de contraste de fases. . . .	51
4.4. Gráficos de caja y bigote de las métricas de a) área, b) perímetro, c) circularidad, d) SC, e) entropía y f) AR. Se muestran en azul las gráficas obtenidas mediante microscopía de campo claro y en naranja las de contraste de fases.	52
4.5. Gráficas de SC vs circularidad para a) microscopía de campo claro y b) microscopía de contraste de fase, con acercamientos en zonas de interés.	53
4.6. Histogramas KDE bidimensionales de a) microscopía de campo claro, b) microscopía de contraste de fases y c) datos filtrados entre los cuartiles Q1 y Q3.	54

4.7. Imágenes representativas de las líneas celulares humanas (MG63, HUVEC y HT29) y murinas (4T1, B16F10 y NIH3T3) analizadas en este estudio.	56
4.8. Gráfico de caja y bigote de las métricas de a) área, b) perímetro, c) AR, d) circularidad e) entropía y f) SC de las células humanas analizadas.	57
4.9. Gráfico de caja y bigote de las métricas de a) área, b) perímetro, c) AR, d) circularidad e) entropía y f) SC de las células murinas analizadas.	57
4.10. Diagramas de fase de líneas humanas y murinas analizadas.	59
4.11. Gráficas de densidad kernel (KDE) de las líneas celulares analizadas y sus correspondientes distribuciones filtradas mediante los cuartiles Q1–Q3. Se muestran a) líneas murinas y b) líneas humanas.	60
5.1. Imágenes representativas de células HUVEC tras 72 horas de exposición a miel en las siguientes concentraciones: a) 0.000 % (control), b) 0.250 %, c) 0.500 %, d) 0.750 %, e) 1.000 % y f) 1.500 %.	67
5.2. Gráficas de KDE de área vs circularidad tras a) 0, b) 24, c) 48 y d) 72 horas y gráficas SC vs circularidad tras e) 0, f) 24, g) 48 y h) 72 horas de tratamiento. Se filtraron los datos para mostrar los cuartiles Q1–Q3.	69
5.3. Imágenes representativas de células HUVEC teñidas con azul tripán tras 72 horas de tratamiento con miel en concentraciones de: a) 0.000 % (Control), b) 0.250 %, c) 0.500 %, d) 0.750 %, e) 1.000 % y f) 1.500 %. Los círculos resaltan ejemplos de células positivas al azul tripán. . . .	71

5.4. Gráficas de área vs circularidad tras a) 24, b) 48 y c) 72 horas y gráficas SC vs circularidad tras d) 24, e) 48 y f) 72 horas de células vivas y muertas de cada concentración. Se filtraron los datos para mostrar los cuartiles Q1-Q3.	72
5.5. Gráficas de SC vs Circularidad para todas las células HUVEC y muertas para concentraciones de miel de a) 0.000 %, b) 0.250 %, c) 0.500 %, d) 0.750 %, e) 1.000 % y f) 1.500 %.	74
6.1. Contorno de las células MG63 observadas, ordenadas por su SC y clasificadas con colores $SC < 60$ (azul), $60 < SC < 90$ (verde), y $SC > 90$ (rojo).	79
6.2. Gráficas de las a) curvas de Fuerza-Distancia y b) de Fuerza-Relajación obtenidas a las velocidades de indentación utilizadas en este trabajo; la región sombreada representa todas las curvas y la curva resaltada la mediana.	81
6.3. Gráficas de barras de las medianas del módulo de Young de cada célula identificada, para las tres velocidades de indentación con colores indicando el grupo como en la Figura 6.1. Se indica la velocidad de indentación correspondiente en la parte inferior de la gráfica.	81
6.4. Gráficas de barras de las medianas de los valores obtenidos por medio del ajuste de las curvas al modelo FK para cada grupo de células identificado, para las tres velocidades de indentación con colores indicando el grupo como en la Figura 6.1. Se indica la velocidad de indentación correspondiente en la parte inferior de la gráfica.	82

6.5. Gráficas de barras de las medianas de los valores obtenidos por medio del ajuste de las curvas al modelo FZ para cada grupo de células identificado, para las tres velocidades de indentación con colores indicando el grupo como en la Figura 6.1. Se indica la velocidad de indentación correspondiente en la parte inferior de la gráfica	83
6.6. Gráficas de barras de los valores promedio del módulo de Young y de los parámetros elásticos en los modelos FK y FZ, obtenidos de toda la población de células para las indentaciones obtenidas a las velocidades de 3 $\mu\text{m/s}$ (azul), 12 $\mu\text{m/s}$ (beige) y 3 $\mu\text{m/s}$ (verde).	86
6.7. Valores promedio de los parámetros viscosos en los modelos FK y FZ, obtenidos de toda la población de células para las indentaciones obtenidas a las velocidades de 3 $\mu\text{m/s}$ (azul), 12 $\mu\text{m/s}$ (beige) y 3 $\mu\text{m/s}$ (verde).	87
6.8. Diagrama de fases SC vs Circularidad dividido por los grupos identificados en la Figura 6.1.	88
6.9. Medianas de los valores de profundidad de indentación máxima para cada grupo identificado en la Figura 6.1, para cada velocidad de indentación . Se indica la velocidad en la parte inferior de la gráfica .	91
6.10. Valores promedio del número de Deborah obtenidos de todas las células en la muestra para tres indentaciones realizadas a velocidades de 3 $\mu\text{m/s}$ (azul), 12 $\mu\text{m/s}$ (beige), y 3 $\mu\text{m/s}$ (verde).	93
A.1. Diagrama de flujo con el procedimiento realizado para el análisis morfológico. Se señalan en verde los procesos realizados en Cellpose, en rojo los de FIJI y en azul los de LOCO-EFA.	102

ÍNDICE DE TABLAS

4.1. Valores estadísticos de SC las líneas celulares analizadas.	61
4.2. Valores estadísticos de circularidad las líneas celulares analizadas. . .	61
5.1. Métricas promedio de área, circularidad y SC de cada concentración a través del tiempo. Se indica el nivel de significancia de los cambios respecto al control.	68
5.2. Porcentaje de células positivas al azul tripán para cada concentración de miel y tiempo de exposición.	71
6.1. Aumento ($\uparrow$) o disminución ($\downarrow$) porcentual en parámetros mecánicos para la segunda y tercera curva de cada grupo de células relativo a la mediana de los valores para la primera indentación. Los valores con un aumento o disminución de más del 25 % se marcaron de la siguiente manera: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$	84

ABREVIATURAS Y SIGLAS

4T1: Línea celular de cáncer de mama murino altamente metastásico.

AFM: Microscopio de fuerza atómica.

ATCC: American Type Culture Collection.

AR: Razón de aspecto.

B16F10: Línea celular de cáncer murino de piel del tipo melanoma.

BI: Índice de bipolaridad.

CD: Diferencia acumulada.

CP: Punto de contacto.

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium.

DP: Índice de dispersión.

EFA: Análisis de Fourier elíptico.

EL: Índice de elongación.

EMT: Transición epitelial a mesenquimal.

FDC: Curva fuerza-distancia.

FRC: Curva fuerza-relajación.

FK: Modelo fraccional de Kelvin.

FZ: Modelo fraccional de Zener.

HT29: Línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano del tipo epitelial.

HUVEC: Línea celular endotelial sana extraída de los vasos sanguíneos del cordón umbilical humano.

KDE: Estimación de densidad kernel.

LOCO-EFA: Análisis de Fourier elíptico con contribución de lóbulos.

Máx: Máximo.

MG63: Línea celular humana de osteosarcoma del tipo fibroblasto.

Mín: Mínimo.

NIH3T3: Línea celular murina sana del tipo fibroblasto.

PCA: Análisis de componentes principales.

SC: Complejidad de forma.

SLS: Sólido lineal estándar.

Std. dev.: Desviación estándar.

RESUMEN

Las características físicas de las células vivas, en particular su morfología y su respuesta mecánica, proporcionan información relevante sobre sus procesos bioquímicos internos y su interacción con su microambiente. Existe un creciente interés por cuantificar estas propiedades y relacionarlas con procesos biológicos y patológicos de interés biomédico. Sin embargo, para establecer estas relaciones, es necesario desarrollar metodologías que permitan caracterizar estas propiedades e identificar los parámetros que mejor describen el estado físico de las células.

En esta tesis se desarrolló una metodología para la caracterización morfológica de células adherentes, basada en microscopía óptica, segmentación celular y análisis cuantitativo de descriptores de forma. Entre las métricas evaluadas, la complejidad de forma (SC) y la circularidad resultaron ser las más informativas para describir la variabilidad morfológica observada en distintas poblaciones celulares. La combinación de estas métricas permitió identificar fenotipos morfológicos predominantes, comparar diferentes poblaciones celulares e identificar células con características morfológicas asociadas con alteraciones en su estado fisiológico.

Un resultado relevante de este trabajo fue el desarrollo de diagramas de fase contruidos a partir de SC y circularidad, los cuales permitieron representar simultáneamente información cuantitativa y cualitativa de poblaciones celulares. Esto facilitó la visualización de cambios inducidos por tratamientos experimentales y permitió identificar fenotipos morfológicos asociados con distintos estados celulares. Su aplicación al estudio de células HUVEC tratadas con miel hizo posible distinguir

morfologías compatibles con una respuesta proangiogénica y fenotipos asociados con una disminución de la viabilidad celular, incluyendo la identificación de una morfología característica de células no viables.

La metodología desarrollada fue integrada posteriormente con experimentos simultáneos de microscopía óptica y microscopía de fuerza atómica para obtener de manera conjunta características morfológicas y viscoelásticas en células individuales. Esta aproximación permitió comparar distintos modelos mecánicos para describir la respuesta viscoelástica celular y explorar la relación entre la complejidad morfológica y la rigidez celular. En conjunto, los resultados obtenidos muestran que la metodología propuesta constituye una herramienta accesible para el estudio de células vivas y puede complementar investigaciones relacionadas con migración, adhesión celular, respuesta a tratamientos y caracterización biomecánica. Trabajos futuros deberán evaluar su aplicabilidad en otras líneas celulares y profundizar en la relación entre la morfología, las propiedades mecánicas y el estado biológico de las células.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

En este capítulo se presenta el planteamiento general de la investigación. Primero, se describe la importancia de analizar cuantitativamente las propiedades físicas de las células y la necesidad de contar con metodologías que permitan estudiar de manera conjunta su morfología y respuesta mecánica. Posteriormente, se revisan antecedentes relacionados con el uso simultáneo de microscopía óptica y microscopía de fuerza atómica, destacando sus alcances y limitaciones. Finalmente, se establece la justificación del trabajo, la hipótesis y los objetivos que guían el desarrollo de esta tesis.

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las células son consideradas la unidad más pequeña de vida, son organismos capaces de moverse, alimentarse y reproducirse por si mismas. A su vez tienen propiedades emergentes que les otorgan la capacidad de formar sistemas complejos para llevar a cabo funciones que mantienen a los organismos multicelulares vivos, los cuales requieren de células especializadas que desarrollen funciones específicas [1]. Esta especialización hace que las células hayan desarrollado características físicas particulares con base en su función [2].

Las propiedades físicas de las células, como su morfología, respuesta mecánica, organización del citoesqueleto y capacidad de migración, dependen tanto de sus procesos bioquímicos internos como de su interacción con el microambiente. Por ello, pueden utilizarse como *biomarcadores* para obtener información sobre procesos clínicamente relevantes, como la progresión de una enfermedad, la respuesta a un tratamiento o la malignidad de una neoplasia [3, 4].

A pesar de los avances en biofísica celular, el análisis cuantitativo de las propiedades físicas de las células aún presenta retos metodológicos. La morfología celular se ha estudiado mediante descriptores geométricos y herramientas matemáticas basadas en el contorno, mientras que la respuesta mecánica se ha analizado desde el enfoque de la materia suave y mediante técnicas como la microscopía de fuerza atómica [5, 6]. Sin embargo, no existe una metodología completamente estandarizada que permita analizar de manera conjunta la forma celular y su respuesta mecánica en células vivas.

Por ello, existe la necesidad de definir parámetros cuantitativos que describan con precisión las propiedades físicas de las células y permitan realizar inferencias biológicas a partir de ellas. La delimitación de estos parámetros puede facilitar la comparación entre poblaciones celulares, la identificación de células con características anormales o potencialmente malignas, y el seguimiento de cambios asociados con tratamientos o estímulos externos.

1.2 ANTECEDENTES

En la literatura, son escasos los estudios que combinan de manera simultánea microscopía de fuerza atómica con microscopía óptica o de fluorescencia. No obstante, esta aproximación resulta de interés, ya que permite estudiar de forma conjunta la respuesta mecánica de las células y sus características morfológicas u ópticas. A pesar de este potencial, las metodologías reportadas no son homogéneas y difieren

principalmente en la forma en que se obtiene la información mecánica. Algunos estudios han utilizado técnicas de nanoindentación [7, 8, 9], mientras que otros han empleado mapas viscoelásticos obtenidos mediante las técnicas *Force-clamp-force mapping* [10] y *Peak-force tapping* [11]. No obstante, solo algunos de estos trabajos consideran a la célula como un material viscoelástico. En la mayoría de los casos, la respuesta mecánica se caracteriza mediante modelos puramente elásticos, lo que limita la descripción de fenómenos dependientes del tiempo, como la viscosidad y la relajación. Además, varias de estas metodologías se realizan en muestras secas, por lo que las células deben someterse a procesos de preparación que comprometen su viabilidad. En consecuencia, las propiedades medidas pueden no representar adecuadamente el comportamiento físico de células vivas, reduciendo su relevancia biológica y clínica.

A esta limitación mecánica se suma una limitación en la caracterización morfológica. En general, estos trabajos no emplean métricas morfológicas cuantitativas como biomarcadores, sino que recurren a descriptores cualitativos para separar las células, trabajar con poblaciones heterogéneas o localizar componentes del citoesqueleto. Asimismo, los estudios que utilizan la morfología para caracterizar etapas de desarrollo del cáncer suelen centrarse únicamente en la descripción morfológica, sin incorporar el análisis de las propiedades mecánicas celulares [12].

En estudios recientes, Yang et al. [13, 14] proponen una metodología para observar el proceso de indentación de las células en tiempo real al momento de obtener el módulo de Young. En estos experimentos, el microscopio óptico se coloca lateralmente, de manera que se tiene una vista de la sección efectiva sobre la cual se aplica la fuerza uniaxial del cantilever. Sin embargo, a pesar de añadir el microscopio, no se realiza un análisis morfológico cuantitativo.

En otra aproximación, Guan et al. [15] proponen una metodología para caracterizar células de cáncer por medio de un estudio en el que se obtiene la rugosidad, la ondulación, entre otras métricas topográficas de la superficie. Debido al uso de

las técnicas *PeakForce* y *Force-Volume* [16], los autores lograron estimar el módulo de Young en distintas regiones de la célula [17]. Si bien este estudio permite obtener una resolución de imagen nanométrica, extraer información sobre la corteza extracelular y obtener datos precisos sobre el módulo de Young, las células no pudieron ser escaneadas por completo debido a su tamaño, por lo que no es posible evaluar la morfología del contorno.

Finalmente, Young et al. [18] emplean microscopía óptica y microscopía de fuerza atómica de manera simultánea en células vivas mantenidas en celda líquida. Mediante este arreglo, los autores analizaron propiedades mecánicas y morfológicas en distintas líneas celulares, así como su correlación con la expresión de genes asociados con mayor invasividad. Sin embargo, la metodología descrita utiliza únicamente descriptores convencionales derivados de aproximaciones elípticas, lo cual podría omitir información relevante del contorno celular para diferenciar con mayor precisión entre una línea celular y otra.

En este contexto, la integración simultánea de microscopía óptica y microscopía de fuerza atómica representa una alternativa relevante para mejorar la caracterización celular. Esta aproximación puede contribuir a obtener una clasificación más precisa, estudiar la relación entre distintas propiedades físicas de las células y generar un volumen considerable de datos en un intervalo de tiempo reducido.

1.3 JUSTIFICACIÓN

Las propiedades físicas de las células (forma, propiedades mecánicas, arquitectura del citoesqueleto, potencial de migración, adhesión, etc.) pueden aportar información sobre su función, su fisiología, su etapa en el ciclo celular y su estado de salud. Este último es de vital importancia al estudiar el progreso de enfermedades y evaluar la efectividad de tratamientos en desarrollo.

Cuantificar la morfología de las células e identificar las características que per-

mitan distinguir entre diferentes fenotipos y/o evaluar el estado de salud de células vivas, así como su correlación con la respuesta mecánica llenaría una brecha de conocimiento y permitiría estudiar diferentes sistemas celulares bajo los mismos criterios.

1.4 HIPÓTESIS

Es posible desarrollar una metodología para obtener métricas que permitan estudiar el comportamiento de las propiedades morfológicas y viscoelásticas de células vivas.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 GENERAL

Desarrollar un método de caracterización de propiedades morfológicas y viscoelásticas de las células basado en métricas cuantitativas que funja como herramienta de clasificación para evaluar el estado de salud de las células o su respuesta a un estímulo.

1.5.2 ESPECÍFICOS

- Establecer una metodología experimental para estudiar la morfología de las células.
- Determinar las métricas que describen la morfología de las células adecuadamente.
- Comparar las propiedades morfológicas de diferentes líneas celulares, tanto

humanas como murinas, utilizando los parámetros definidos.

- Identificar la presencia de células con comportamientos inusuales dentro de una muestra por medio de los parámetros establecidos.
- Analizar la correlación entre las propiedades morfológicas y viscoelásticas de las células vivas.
- Estudiar el comportamiento de los parámetros viscoelásticos y morfológicos de células de manera simultánea bajo diferentes condiciones experimentales.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1 LA CÉLULA

La célula se considera la unidad fundamental de los organismos vivos. A diferencia de las bacterias o los protozoarios, el ser humano está formado por múltiples células eucariotas con funciones especializadas y características que las diferencian para realizar actividades que nos mantienen vivos. Un grupo de células de la misma función forma un tejido, un grupo de tejidos con funciones similares forma un órgano y un grupo de órganos cuyas funciones están ligadas a un mismo proceso forman los sistemas del cuerpo humano [19, 20].

La estructura de la célula animal está formada por los siguientes componentes [19]:

- Membrana: bicapa fosfolipídica con proteínas incrustadas que protege la integridad de la célula. Regula el intercambio de sustancias entre la célula y el medio.
- Núcleo: centro de control de la célula que contiene el ADN; determina su función y estructura básica a partir de su material genético.
- Citoplasma: medio en el que se contienen todos los organelos y en el que se

realizan algunas reacciones químicas. Mueve materiales por medio de difusión y regula los procesos de crecimiento y división.

- **Organelos:** son a la célula lo que los órganos son al cuerpo humano. Cada organelo tiene una estructura y función específica para realizar diversas tareas dentro de la célula. Algunos de los organelos más importantes son las mitocondrias, lisosomas, aparatos de Golgi, ribosomas y los retículos endoplasmáticos.
- **Citoesqueleto:** red de proteínas interconectadas que da estructura a la célula y rigen sus propiedades físicas.

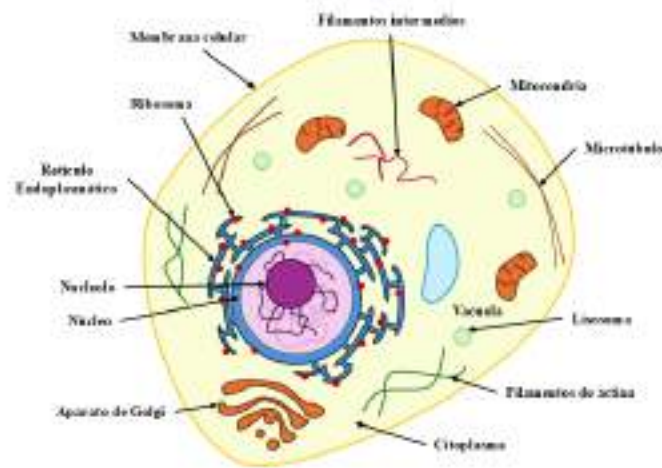


FIGURA 2.1: Representación esquemática de los principales componentes estructurales de una célula animal.

El citoesqueleto es una parte fundamental de las células eucariotas; es la red interconectada de polímeros y proteínas que le da estructura a la célula. Esta estructura tiene tres funciones principales: organizar un componente fundamental espacialmente los componentes de la célula, conectar la célula física y bioquímicamente con su entorno y generar fuerzas coordinadas que le otorgan a la célula forma y movimiento. Tanto fuerzas internas como externas actúan a través del citoesqueleto y afectan sus propiedades o el comportamiento de la célula [21, 22].

Los principales componentes del citoesqueleto son los filamentos de actina, vimentina y microtúbulos. La comunicación entre estos tres componentes, junto con

distintas señales bioquímicas, altera la organización de la estructura del citoesqueleto y permite la interacción de la célula con su entorno. En células adheridas a un sustrato, esa reorganización se refleja en la cantidad y la forma de los lóbulos, unas protuberancias que las células estiran y contraen para desplazarse, adherirse a superficies e interactuar con otros tejidos. Todas estas acciones producen cambios en la morfología celular. Para que estos lóbulos crezcan y se muevan, es necesario que el citoesqueleto se despolimerice y se reconstruya en una configuración distinta, lo cual implica cambios en las propiedades mecánicas de la célula [23].

2.2 PROPIEDADES FÍSICAS DE LAS CÉLULAS

Las células suelen estudiarse principalmente a partir de sus procesos bioquímicos; sin embargo, también pueden analizarse desde el punto de vista de sus propiedades físicas. Bajo esta perspectiva, al igual que otros materiales, pueden caracterizarse mediante propiedades mecánicas como la elasticidad y la viscosidad. Además, pueden responder a distintos tipos de sollicitación mecánica, como tensión, compresión y cizalladura, por lo que su estudio se relaciona con el campo de la materia suave [5, 24, 25]. Asimismo, es posible evaluar otras propiedades físicas, como el tamaño, la forma, la textura, la arquitectura de los componentes internos y los patrones de movimiento celular. Estas características dependen de los procesos internos de la célula y de su interacción con el microambiente. Por ello, la morfología y las propiedades mecánicas pueden emplearse como *biomarcadores*, entendidos como indicadores objetivos, medibles y reproducibles del estado fisiológico o patológico de una célula o tejido [3].

2.2.1 PROPIEDADES FÍSICAS COMO BIOMARCADORES

Aunque las células están en constante cambio y movimiento, existen fenotipos claros basados en su función dentro del órgano o tejido en el que se encuentran. Un fenotipo se refiere a las características observables de la célula como resultado de su genética y su ambiente [26]. Por ejemplo, las células del tipo epitelial son planas y alargadas; se agrupan para formar mono-capas, lo cual corresponde con su función de formar barreras; por otra parte, las células de tejido muscular del corazón tienden a formar “ramas” para entrelazarse entre ellas y contraer el músculo de manera uniforme al momento de bombear sangre [27].

El ciclo celular y sus etapas también están caracterizados por cambios en propiedades físicas. Durante la mitosis, las células eucariotas adquieren una morfología esférica tanto en cultivos en 2D como en 3D [28]. Estos cambios en forma vienen acompañados de cambios en la adhesión al sustrato y en las propiedades mecánicas; se ha reportado que las células en etapa mitótica aumentan su módulo elástico aparente de manera significativa en comparación con las células en interfase [29].

Estas características pueden cambiar como una reacción a su microambiente. Por ejemplo, las células madre tienen la capacidad de pasar por un proceso de diferenciación, es decir, convertirse en una célula específica del cuerpo humano. Este proceso puede ser inducido en laboratorio por medios físicos, como la implementación de micropatrones que fuerzan a la célula a adquirir una forma específica [30], o el diseño de sustratos y geles con diferentes propiedades mecánicas que simulan tejidos en el cuerpo [31, 32]. En general, las células tienen una capacidad de mecanosensado, es decir, convierten señales mecánicas de su ambiente en señales bioquímicas para activar procesos biológicos como la migración, la adhesión y la reorganización de los componentes de su citoesqueleto [33, 34].

La morfología celular también es un indicio del estado de salud de la célula. Las células sufren alteraciones significativas en su forma cuando reciben un daño

considerable o expira su tiempo de vida y recurren a un proceso llamado muerte celular programada [35]. Este es un proceso estrictamente regulado que previene la proliferación de células defectuosas o con daño irreparable a su ADN que puedan convertirse en células cancerosas. Los diferentes tipos de muerte celular se caracterizan por sus mecanismos bioquímicos y sus cambios morfológicos. En el caso de la apoptosis, la célula se deslinda del resto del tejido, se contrae su citoplasma, se reduce en volumen, se observan gránulos en su membrana y se desintegra en cuerpos apoptóticos [36]. Existen otros procesos de muerte celular, como la necroptosis, que se caracteriza por un aumento de volumen, ruptura de la membrana celular y colapso súbito de los organelos [35].

Las células muertas o dañadas también demuestran cambios significativos en sus propiedades mecánicas. Se ha reportado que el modulo de Young aparente, asociado a la rigidez, disminuye cuando las células entran en contacto con sustancias citotóxicas [29]. En otro estudio, se encontró que al exponer neuronas a sustancias citotóxicas y condiciones osmóticas adversas, experimentan una disminución en su módulo elástico y comportamientos erráticos en sus parámetros viscosos [37].

En el caso de diferentes enfermedades, las células también experimentan cambios significativos. La alteración de la morfología en neuronas puede ser un indicio de la presencia o el progreso de diversas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson o el daño a las neuronas por abuso de sustancias [38, 39, 40]. En glóbulos rojos, ciertos tipos de anemia se pueden diagnosticar por el cambio en su forma [27, 26]. Pero en particular, el cáncer ha mostrado correlaciones importantes entre su malignidad y los cambios físicos radicales que causa en las células.

Algunas de las diferencias entre células sanas y cancerosas provienen de la división descontrolada que caracteriza a la enfermedad, mientras que otras son adaptaciones necesarias para sobrevivir por periodos indefinidos o migrar a un tejido diferente al de su origen. Entre los cambios más prominentes se observan núcleos anormalmente grandes, irregularidades en el color y la forma del citoplasma y hete-

rogeneidad morfológica en las células de un mismo tejido [41, 42]. Se ha demostrado en trabajos anteriores que las células cancerosas presentan mayor movilidad, lo cual se ve reflejado en el número y el tamaño de lóbulos que pueden presentar [6]. Estos cambios en morfología y comportamiento pueden ser indicadores de la presencia, etapa e invasividad del cáncer [43, 44, 45, 46].

Además de cambios morfológicos, las células de cáncer presentan cambios en sus propiedades mecánicas que las hacen significativamente más suaves que las células sanas [47, 48], pero mucho más rígidas al formar tumores [49]. Esta cualidad les permite infiltrarse entre las uniones de las células que forman los vasos sanguíneos y utilizar el sistema circulatorio para migrar a otros órganos. Por este motivo, la pérdida de rigidez puede ser un indicador del potencial metastásico de una célula.

Por lo tanto, profundizar en el estudio de la morfología y su vínculo con las propiedades mecánicas de la célula es de gran importancia en la delimitación de biomarcadores para la detección temprana de enfermedades y la evaluación de tratamientos.

2.3 DESCRIPTORES GEOMÉTRICOS DE LA MORFOLOGÍA

La morfología celular está estrechamente relacionada con la función biológica de cada tipo celular. De manera cualitativa, las células poligonales y de tamaño relativamente uniforme suelen asociarse con fenotipos epiteliales; las células alargadas y multipolares, con fenotipos fibroblásticos; y las células esféricas en suspensión, con fenotipos linfoblásticos. No obstante, estas categorías descriptivas son limitadas, ya que no permiten caracterizar con precisión la diversidad morfológica de los tipos celulares presentes en el organismo humano [50].

Para superar esta limitación, se han propuesto diversos parámetros cuantitativos, conocidos como descriptores morfométricos, que permiten caracterizar la forma celular a partir de mediciones geométricas y matemáticas. Entre ellos se encuentran

descriptores convencionales, como el área, el perímetro y la circularidad, así como descriptores más avanzados, como la dimensión fractal, los polinomios de Zernike y los descriptores basados en análisis de Fourier [45].

2.3.1 DESCRIPTORES MORFOLÓGICOS CONVENCIONALES

Los descriptores morfológicos convencionales corresponden a parámetros geométricos obtenidos a partir de operaciones directas sobre el contorno o la máscara binaria de la célula. Estos descriptores permiten cuantificar propiedades básicas de la forma celular, como el tamaño, la elongación y la compacidad.

Entre los parámetros más utilizados se encuentra la razón de aspecto (AR), la cual describe la relación entre el eje mayor (a) y el eje menor (b) de una elipse ajustada al objeto analizado. Esta métrica permite estimar el grado de elongación celular y se define como

$$\text{AR} = \frac{a}{b}. \quad (2.1)$$

De manera similar, la razón axial o índice de bipolaridad (BI) cuantifica la relación entre la longitud (l) y la anchura (w) de la célula, por lo que también puede emplearse como una medida de elongación.

Otra métrica comúnmente utilizada es la circularidad, con la cual se evalúa una figura en una escala del 0 al 1, siendo el cero una línea recta y el 1 un círculo perfecto. Esta métrica está dada por la siguiente relación entre área (A) y perímetro (P)

$$\text{Circularidad} = 4\pi \frac{A}{P^2}. \quad (2.2)$$

La redondez es otro descriptor geométrico basado en el área y el perímetro. En esta métrica un valor cercano a 1 también se asemeja a una figura compacta,

mientras que un valor cercano a cero representa una figura irregular o alargada

$$\text{Redondez} = \frac{P}{\sqrt{4\pi A}}. \quad (2.3)$$

La solidez, por otra parte, es la razón entre el área de un objeto y el área de su caparazón convexo A_c . Un valor cercano a uno corresponde a figuras convexas, es decir, que sus ángulos internos no suman más de 180° . Mientras que un valor cercano a cero indica concavidad, es decir, ángulos internos mayores a 180°

$$\text{Solidez} = \frac{A}{A_c}. \quad (2.4)$$

Existen también descriptores adaptados a un solo tipo de célula. Por ejemplo, el índice de elongación (EL) describe adecuadamente células epiteliales alargadas

$$\text{EL} = \log_2 \frac{a}{b}, \quad (2.5)$$

mientras que el índice de dispersión (DP) se utiliza únicamente con células altamente polares como las neuronas

$$\text{DP} = \log_2(\pi ab). \quad (2.6)$$

Existe una amplia variedad de descriptores convencionales para describir la forma de las células, sin embargo, en un estudio por Yu et al. [6] se realiza un análisis comparativo que demuestra que ninguno se puede utilizar de manera universal.

2.3.2 DESCRIPTORES MORFOLÓGICOS BASADOS EN EL CONTORNO

Los descriptores basados en contorno son aquellos que representan la forma de figuras bidimensionales utilizando funciones o series matemáticas.

Los polinomios de Zernike son conjuntos de polinomios de variables ρ y θ que provienen de una base ortogonal de un disco unitario. Cada polinomio de Zernike consta de una parte radial real $V_{(n,m)}(\rho, \theta)$ y de una parte azimutal compleja

$R_{(n,m)}(\rho)e^{im\theta}$ [51]. A los coeficientes de estos polinomios se les llaman momentos de Zernike. Los polinomios de Zernike tienen la ventaja de ser invariantes a la rotación y de no ser redundantes entre sus diferentes momentos. Sin embargo, se requieren polinomios de Zernike de alto orden para reproducir figuras complejas y mantener detalles pequeños en sus bordes; aunque han sido utilizados para análisis morfológico en células, su uso es más adecuado para el estudio de aberraciones ópticas [51].

El análisis de dimensión fractal, es otra forma de estudiar morfología que ha demostrado ser una herramienta poderosa para encontrar irregularidades en estructuras complejas. La geometría fractal es la rama de las matemáticas que busca describir figuras irregulares o que presentan auto-similitud a diferentes escalas [52]. Si bien el análisis de dimensión fractal ha demostrado resultados prometedores en el estudio de enfermedades neurodegenerativas, es altamente sensible a la calidad de imagen y está especializado en el estudio de células del sistema nervioso y estructuras máicroscópicas como las redes alveolares y capilares, por lo que no se considera un descriptor universal para la morfología de células individuales [53].

Para describir figuras complicadas en dos dimensiones se utiliza el método EFA (Elliptic Fourier Analysis) [54], el cual utiliza dos series elípticas de Fourier para reproducir el contorno de figuras irregulares y no holomorfas como las células

$$x(t) = \alpha_0 + \sum_{n=1}^{\infty} \left[\alpha_n \cos\left(\frac{2\pi nt}{T}\right) + \beta_n \sin\left(\frac{2\pi nt}{T}\right) \right], \quad (2.7)$$

$$y(t) = \gamma_0 + \sum_{n=1}^{\infty} \left[\gamma_n \cos\left(\frac{2\pi nt}{T}\right) + \delta_n \sin\left(\frac{2\pi nt}{T}\right) \right], \quad (2.8)$$

donde $\alpha_n, \beta_n, \gamma_n, \delta_n$ se denominan coeficientes EFA y (α_n, γ_n) la predicción del contorno.

Estos coeficientes se calculan con un número discreto de k puntos de un contorno cerrado. El tiempo en el que se reproduce el contorno está dado por T y el tiempo en el que se dibuja un segmento del contorno es (Δt_i)

$$T = \sum_{n=1}^k \Delta t_i,$$

$$\Delta t_i = (\sqrt{(x_i - x_{(i-1)})^2 - (y_i - y_{(i-1)})^2} = \sqrt{\Delta x_i^2 - \Delta y_i^2}.$$

De manera que los coeficientes EFA se escriben

$$\begin{aligned}\alpha_n &= \frac{T}{2n^2\pi^2} \sum_{n=1}^k \frac{\Delta x_i^2}{\Delta t_i^2} \left[\cos\left(\frac{2\pi nt}{T}\right) - \cos\left(\frac{2\pi nt}{T}\right) \right], \\ \gamma_n &= \frac{T}{2n^2\pi^2} \sum_{n=1}^k \frac{\Delta y_i^2}{\Delta t_i^2} \left[\cos\left(\frac{2\pi nt}{T}\right) - \cos\left(\frac{2\pi nt}{T}\right) \right], \\ \beta_n &= \frac{T}{2n^2\pi^2} \sum_{n=1}^k \frac{\Delta x_i^2}{\Delta t_i^2} \left[\sin\left(\frac{2\pi nt}{T}\right) + \sin\left(\frac{2\pi nt}{T}\right) \right], \\ \delta_n &= \frac{T}{2n^2\pi^2} \sum_{n=1}^k \frac{\Delta y_i^2}{\Delta t_i^2} \left[\sin\left(\frac{2\pi nt}{T}\right) + \sin\left(\frac{2\pi nt}{T}\right) \right], \\ \alpha_0 &= \frac{1}{T} \sum_{n=1}^k \frac{\Delta x_i}{2\Delta t_i} [(t_i^2 - t_{(i-1)}^2) - \epsilon(t_i^2 - t_{(i-1)}^2)] + x_0, \\ \gamma_0 &= \frac{1}{T} \sum_{n=1}^k \frac{\Delta y_i}{2\Delta t_i} [(t_i^2 - t_{(i-1)}^2) - \epsilon(t_i^2 - t_{(i-1)}^2)] + y_0,\end{aligned}$$

donde

$$\begin{aligned}\varepsilon_i &= \sum_{j=1}^{1-i} \Delta x_j - \frac{\Delta x_i}{\Delta t_i} \sum_{j=1}^{1-i} \Delta t_j, \\ \epsilon_i &= \sum_{j=1}^{1-i} \Delta y_j - \frac{\Delta y_i}{\Delta t_i} \sum_{j=1}^{1-i} \Delta t_j, \\ \varepsilon_1 &= \epsilon_1 = 0.\end{aligned}$$

Cada conjunto de coeficientes da una elipse (n -ésimo armónico elíptico o n -ésimo modo) con una cierta orientación y un centro específico. El contorno celular se puede interpretar como una suma infinita de elipses. El segundo armónico elíptico traza dos revoluciones horarias o antihorarias alrededor de la primera elipse. La tercera elipse traza tres revoluciones alrededor del camino dado por el segundo armónico. Así, el n -ésimo armónico traza n revoluciones alrededor del armónico anterior.

La dirección de la rotación de la n -ésima elipse está dada por la determinante

de la matriz de coeficientes EFA

$$r_n = \begin{vmatrix} \alpha_n & \beta_n \\ \gamma_n & \delta_n \end{vmatrix} = \alpha_n \delta_n - \beta_n \gamma_n,$$

si $r_n < 0$ la rotación es horario, si $r_n > 0$ la rotación es antihoraria.

2.3.2.1 MÉTODO LOCO-EFA

El método EFA presenta degeneraciones, por lo que la misma célula puede ser representada por diferentes series de Fourier. Para eliminar estas fuentes de degeneración, Sánchez-Corrales et al. [55] desarrollaron LOCO-EFA, una versión de análisis elíptico que toma en cuenta la contribución de los lóbulos de las células y las describe cuantitativamente por medio de métricas derivadas de los armónicos utilizados durante el análisis. Además de eliminar degeneraciones, el método no es sensible a la rotación, por lo que cada célula tiene una representación única. Además, como este método se desarrolló específicamente para células, sus métricas son adecuadas para la interpretación biológica de los resultados.

Existen tres fuentes de degeneración, la primera es que se puede iniciar la serie desde un punto arbitrario del contorno, por lo que para un contorno discreto de n puntos, existirían n series EFA que lo describan. Se puede restringir el inicio de la serie para que comience siempre en el punto que toca al semi-eje mayor de una elipse, sin embargo, esto da lugar a la segunda fuente de degeneraciones, pues cualquiera de los dos extremos del eje puede ser utilizado como punto de partida. La tercer fuente de degeneración es la dirección del giro de las elipses, pues existen descripciones diferentes para la misma figura si el giro es horario o anti-horario. Para superar estas limitantes. LOCO-EFA propone los siguientes cambios

El primer paso es reescribir las ecuaciones 2.7 y 2.8 en forma matricial

$$\begin{bmatrix} x(t) \\ y(t) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} a_0 \\ \gamma_0 \end{bmatrix} + \sum_{n=1}^N \begin{bmatrix} \alpha_n & \beta_n \\ \gamma_n & \delta_n \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \cos\left(\frac{2\pi n t}{T}\right) \\ \sin\left(\frac{2\pi n t}{T}\right) \end{bmatrix}. \quad (2.9)$$

Se trunca la serie infinita a un armónico de orden N , por lo que se puede escribir

$$[X(t)] = [A_0] + \sum_{n=1}^N [A_n] [M_n(t)]. \quad (2.10)$$

De manera que $[X(t)]$ representa el contorno, $[A_0]$ las coordenadas iniciales, $[A_n]$ los coeficientes EFA y $[M_n(t)]$ a la matriz de rotación.

En seguida, se fija el punto de inicio de la serie al semi-eje mayor de la célula

$$\begin{aligned} x_1(\tau) &= \alpha_1 \cos(\tau) + \beta_1 \sin(\tau), \\ y_1(\tau) &= \gamma_1 \cos(\tau) + \delta_1 \sin(\tau). \end{aligned}$$

Ahora que se tienen dos posibles puntos de inicio en cada extremo del eje mayor, se aplica una restricción para que el punto de inicio se encuentre únicamente en el primer o segundo cuadrante del plano cartesiano en el que se coloca la célula, de manera que la matriz $[A_n]$ se reescribe

$$\begin{aligned} \tau_1 &= \frac{2\pi t_1}{T}, \\ \tau_1^* &= \tau_1 + \pi, \\ \begin{bmatrix} \alpha_n^* & \beta_n^* \\ \gamma_n^* & \delta_n^* \end{bmatrix} &= \begin{bmatrix} \alpha_n & \beta_n \\ \gamma_n & \delta_n \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \cos(n\tau_1^*) & -\sin(n\tau_1^*) \\ \sin(n\tau_1^*) & \cos(n\tau_1^*) \end{bmatrix}. \end{aligned}$$

Finalmente, a partir de un punto de inicio fijo, se puede representar la célula mediante dos series, una en sentido horario y otra en sentido antihorario. Para eliminar esta última degeneración se aplica una restricción para que el giro de las elipses sea siempre antihorario

$$\begin{bmatrix} x(-t) \\ y(-t) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \alpha_n^* & \beta_n^* \\ \gamma_n^* & \delta_n^* \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \cos\left(\frac{2n\pi(-t)}{T}\right) \\ \sin\left(\frac{2n\pi(-t)}{T}\right) \end{bmatrix}$$

$$\begin{aligned} \begin{bmatrix} x(-t) \\ y(-t) \end{bmatrix} &= \begin{bmatrix} \alpha_n^* & \beta_n^* \\ \gamma_n^* & \delta_n^* \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \cos\left(\frac{2n\pi t}{T}\right) \\ -\sin\left(\frac{2n\pi t}{T}\right) \end{bmatrix} \\ \begin{bmatrix} x(-t) \\ y(-t) \end{bmatrix} &= \begin{bmatrix} \alpha_n^* & -\beta_n^* \\ \gamma_n^* & -\delta_n^* \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \cos\left(\frac{2n\pi t}{T}\right) \\ \sin\left(\frac{2n\pi t}{T}\right) \end{bmatrix}. \end{aligned}$$

En pocas palabras, si $r_1 < 0$ todos los índices β_n^* y γ_n^* serán cero. Por simplicidad los coeficientes efa se reescriben

$$[A_n] = \begin{bmatrix} \alpha_n^* & \beta_n^* \\ \gamma_n^* & -\delta_n^* \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} a_n & b_n \\ c_n & d_n \end{bmatrix}.$$

El siguiente paso que agrega LOCO-EFA es la descomposición de cada armónico elíptico en dos armónicos circulares.

Se introducen los operadores de giro espacial y temporal respectivamente

$$\begin{aligned} [\Psi_{Sn}] &= \begin{bmatrix} \cos(\theta_n) & -\sin(\theta_n) \\ \sin(\theta_n) & \cos(\theta_n) \end{bmatrix}, \\ [\Psi_{Tn}] &= \begin{bmatrix} \cos(\phi_n) & -\sin(\phi_n) \\ \sin(\phi_n) & \cos(\phi_n) \end{bmatrix}, \end{aligned}$$

donde θ_n y ϕ_n son los ángulos espacial y temporal.

Introducimos estos coeficientes la ecuación 2.10

$$[X(t)] = [A_0] + \sum_{n=1}^N [\Psi_{Sn}] [\Psi_{sn}]^{-1} [A_N] [\Psi_{Tn}] [\Psi_{Tn}]^{-1} [M_n(t)]. \quad (2.11)$$

Dado que $[\Psi_{Tn}]^{-1}[\Psi_{Tn}]$ y $[\Psi_{Sn}]^{-1}[\Psi_{Sn}]$ corresponden a la matriz identidad. También se puede reescribir 2.10 de manera que resalte unicamente la contribución del semi-eje menor y el semi-eje mayor

$$[X(t)] = [A_0] + \sum_{n=1}^N [\Psi_{Sn}] [\Lambda_N] [\Psi_{Tn}]^{-1} [M_n(t)]. \quad (2.12)$$

Combinando 2.11 y 2.12 obtenemos la matriz $[\Lambda_N]$, donde el semi-eje mayor y

menor de cada elipse de la serie se representa por λ_{1n} y λ_{2n}

$$[\Lambda_N] = [\Psi_{S_n}]^{-1} [A_N] [\Psi_{T_n}] = \begin{bmatrix} \lambda_{1n} & 0 \\ 0 & \lambda_{2n} \end{bmatrix}. \quad (2.13)$$

Sustituyendo 2.13 en 2.12 se tiene

$$\begin{aligned} \begin{bmatrix} x(t) \\ y(t) \end{bmatrix} &= |A_0| + \sum_{n=1}^N \begin{bmatrix} \cos(\theta_n) & -\sin(\theta_n) \\ \sin(\theta_n) & \cos(\theta_n) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \cos(\phi_n) & -\sin(\phi_n) \\ \sin(\phi_n) & \cos(\phi_n) \end{bmatrix} \\ &\quad \begin{bmatrix} \lambda_{1n} & 0 \\ 0 & \lambda_{2n} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \cos\left(\frac{2n\pi t}{T}\right) \\ \sin\left(\frac{2n\pi t}{T}\right) \end{bmatrix}, \\ \begin{bmatrix} x(t) \\ y(t) \end{bmatrix} &= |A_0| + \sum_{n=1}^N \begin{bmatrix} \cos(\theta_n) & -\sin(\theta_n) \\ \sin(\theta_n) & \cos(\theta_n) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \cos(\phi_n) & -\sin(\phi_n) \\ \sin(\phi_n) & \cos(\phi_n) \end{bmatrix} \\ &\quad \begin{bmatrix} \lambda_{+n} & 0 \\ 0 & \lambda_{+n} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \lambda_{-n} & 0 \\ 0 & -\lambda_{-n} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \cos\left(\frac{2n\pi t}{T}\right) \\ \sin\left(\frac{2n\pi t}{T}\right) \end{bmatrix}. \end{aligned}$$

Cada matriz diagonal corresponde a una órbita circular de radio λ_{+n} y λ_{-n} , ambas girando en direcciones opuestas.

Finalmente, el método LOCO-EFA condensa la información obtenida por la serie en cuatro coeficientes que pueden reconstruir el contorno celular; en base al centro de cada órbita circular y su centro, se puede definir cada modo con vector $\mathcal{L}_n = (\alpha_n, \beta_n, \gamma_n, \delta_n)$. A su vez, cada uno de estos modos se le asigna un escalar denominado L_n para representar su amplitud

$$L_n = \sqrt{\alpha_n^2 + \beta_n^2 + 2\alpha_n\beta_n \cos \gamma_n - \delta_n - 2\gamma_1}. \quad (2.14)$$

Este coeficiente no depende solamente del radio de los círculos, sino también de su posición relativa al punto de inicio de la serie.

Sanchez-Corralles et al. utilizan diferentes métricas derivadas de este método para cuantificar la morfología celular. Entre ellas se encuentran la entropía, la diferencia XOR y la diferencia acumulada (CD).

La **Entropía** se basa en el concepto de entropía de Shannon y representa la complejidad del contorno. Aumenta con la contribución simultánea de diferentes modos armónicos y se define como:

$$E = - \sum_{l=1}^N f_l \ln(f_l), \quad (2.15)$$

donde $f_l = L_l / \sum_{l=1}^N L_l$, para un número de modos dado N .

La Diferencia XOR utiliza un OR exclusivo para determinar la diferencia entre el contorno real y el contorno reconstruido por los modos de LOCO-EFA. A medida que el número de modos aumenta, la diferencia es menor y este valor disminuye.

La métrica CD es la suma de los valores de la diferencia XOR del modo $n = 2$ en adelante.

Además de utilizar las métricas sugeridas por Sánchez-Corrales et al. [55], se propone el uso de las amplitudes de los modos armónicos de Fourier denominadas L_n para describir la complejidad del contorno celular. Utilizando estos valores proponemos la métrica SC (Shape Complexity) la cual se calcula de la siguiente manera:

$$SC = \sum_{n=3}^{50} L_n. \quad (2.16)$$

Los valores de L_n correspondientes a modos superiores al 50 tienden a cero y, por lo tanto, se eliminaron de la ecuación. Por otra parte, los valores asociados a los dos primeros modos no se consideraron, ya que dependen principalmente del tamaño y presentan magnitudes considerablemente mayores que las de los modos subsecuentes, lo que reduce la contribución relativa de la complejidad en la métrica.

2.4 TÉCNICAS PARA LA OBSERVACIÓN MORFOLÓGICA DE CÉLULAS ADHERENTES

En el estudio de células adherentes vivas, el uso de un microscopio invertido resulta adecuado, ya que permite observar la muestra desde la parte inferior de la caja de Petri y facilita la alineación del plano focal con la superficie en la que las células están adheridas. Esta configuración favorece la adquisición de micrografías con calidad de imagen consistente y permite trabajar con volúmenes mayores de medio de cultivo, contribuyendo a preservar las condiciones fisiológicas de la muestra durante la observación [56]. Generalmente, se utiliza la microscopía de campo claro para observar células vivas y realizar evaluaciones cualitativas rápidas. Sin embargo, las células no teñidas absorben muy poca luz, lo que las hace semitransparentes. Esto dificulta distinguir células sin tinción en una micrografía de campo claro. Por este motivo, se utilizan técnicas y filtros especializados como en el caso de la microscopía de contraste de fases [57].

Un microscopio de contraste de fases comparte las mismas piezas que un microscopio de campo claro convencional; la diferencia radica en la implementación de un diafragma anular y una placa de fases. Se dirige un haz de luz coherente producido por una lámpara de halógeno y se enfoca mediante una lente al diafragma anular colocado en el plano focal del condensador. El diafragma introduce una diferencia de camino óptico en la luz que atraviesa la muestra, lo que genera un gradiente de fases en frentes de luz paralelos y desenfocados. Estos frentes de luz son segregados por la placa de difracción y, al llegar al ojo, se proyectan en dos planos diferentes, formando así la imagen de contraste de fases [57] como se muestra en la Figura 2.2.

Existen otras técnicas de microscopía que pueden utilizarse para observar células adherentes sin necesidad de añadir tinciones. Tal es el caso de la microscopía de campo oscuro [57], en la cual se coloca un filtro tipo “pinhole” entre la fuente de luz y la muestra. De esta manera se forma un cono de luz en el que los haces se difrac-

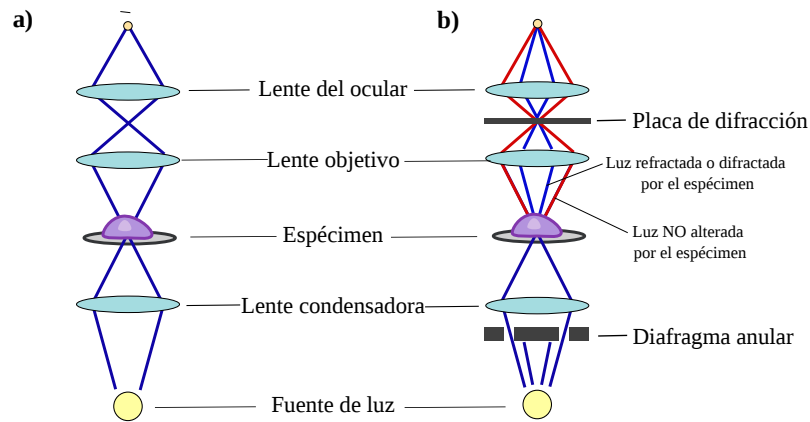


FIGURA 2.2: Camino óptico y partes de un microscopio: a) campo claro y b) contraste de fases.

tan, se reflejan y/o se refractan por el espécimen en diferentes ángulos. Esto crea un fondo oscuro y una imagen brillante del espécimen. La desventaja de usar esta técnica es que requiere una fuente de luz de mucha potencia, la cual puede quemar especímenes delicados si se utiliza durante periodos prolongados de tiempo.

2.5 PROPIEDADES MECÁNICAS

Las propiedades mecánicas de las células son atributos físicos que les permiten responder y/o adaptarse a estímulos externos, como esfuerzos o deformaciones. Entre las variables que pueden cuantificarse se incluyen el módulo de Young y diversos parámetros viscoelásticos.

Una de las técnicas más utilizadas para medir propiedades mecánicas es la microscopía de fuerza atómica (AFM) [58], gracias a su capacidad para estudiar materiales biológicos en condiciones fisiológicas [59]. El AFM está constituido por una punta ubicada en el extremo de un cantilever, acoplado a un sistema piezoeléctrico que controla el movimiento de aproximación y retracción de la punta respecto a la muestra, con resolución nanométrica.

El AFM puede operar en diferentes modos de trabajo, entre ellos el de es-

pectroscopía de fuerza, utilizado para estudiar las propiedades mecánicas de los materiales [60]. En este modo, durante la aproximación, la punta ejerce una fuerza sobre la superficie de la muestra, lo que produce una deformación como resultado de la interacción entre ambos cuerpos. Durante este proceso, se obtienen curvas de fuerza-indentación, las cuales contienen información sobre la respuesta mecánica de la muestra [61]. Para obtener parámetros mecánicos a partir de estas curvas, es necesario emplear modelos teóricos que relacionen la fuerza aplicada, la geometría de la punta y la deformación inducida en la muestra [62, 63, 64].

2.5.1 MÓDULO DE YOUNG

Apenas un par de años después de la creación del AFM por Binning et al. en 1986 [58], se propusieron las primeras alternativas para analizar material biológico [65] y se obtuvieron las primeras imágenes de topografía de tejidos blandos [66] y de monocapas celulares [67]. En 1996 Radmacher et al. [68] realizaron la primera caracterización de las propiedades mecánicas de células vivas mediante AFM, en la que midieron la rigidez de plaquetas humanas mediante el módulo de Young. El módulo de Young se define como la razón entre el esfuerzo ϵ y la deformación σ experimentada por un material y está dado por

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon}. \quad (2.17)$$

Este parámetro se considera de interés biológico en células vivas y ha cobrado relevancia como biomarcador desde que Lekka et al. [47]. Encontraron que el módulo de Young de las células cancerosas tiende a ser menor que el de las células sanas.

Para obtener el módulo de Young de los materiales a partir de las curvas fuerza-indentación, se emplean habitualmente modelos de mecánica de contacto. El primer modelo de este tipo fue propuesto por Heinrich Hertz en 1881, en su trabajo titulado *On the Contact of Elastic Solids* [69]. En dicho estudio, Hertz analizó el contacto elástico entre dos superficies esféricas, estableciendo el modelo que hoy

se conoce como modelo de Hertz. Más adelante, se desarrollaron otros modelos de contacto para abarcar distintas geometrías de indentación; entre ellos se encuentra el modelo de Ian Sneddon, que describe la interacción entre un indentador cónico y un semiespacio elástico semiinfinito [64].

2.5.1.1 MODELO DE HERTZ

El modelo de Hertz describe el contacto elástico entre dos cuerpos con superficies curvas sometidos a una fuerza normal. Bajo las hipótesis de pequeñas deformaciones, de materiales homogéneos e isotrópicos y de ausencia de adhesión, el contacto entre ambas superficies genera una región circular de radio a y una profundidad de indentación δ .

La relación entre el radio de contacto y la profundidad de indentación está dada por

$$a = \sqrt{R^* \delta}, \quad (2.18)$$

donde R^* es el radio efectivo del sistema, dado por

$$\frac{1}{R^*} = \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2}, \quad (2.19)$$

con R_1 y R_2 los radios de curvatura de ambos cuerpos en contacto.

A partir de la teoría de Hertz, el radio de contacto puede expresarse en función de la fuerza aplicada como

$$a = \left(\frac{3FR^*}{4E^*} \right)^{1/3}, \quad (2.20)$$

donde E^* corresponde al módulo elástico efectivo, dado por

$$\frac{1}{E^*} = \frac{1 - \nu_1^2}{E_1} + \frac{1 - \nu_2^2}{E_2}, \quad (2.21)$$

donde E_1 y E_2 corresponden a los módulos de Young, mientras que ν_1 y ν_2 son los coeficientes de Poisson de ambos cuerpos.

Combinando las expresiones anteriores del radio de contacto, se obtiene una expresión para la profundidad de indentación dada por:

$$\delta = \left(\frac{9F^2}{16R^*E^{*2}} \right)^{1/3}. \quad (2.22)$$

De esta forma, la fuerza aplicada puede relacionarse directamente con la profundidad de indentación mediante [69]:

$$F = \frac{4}{3}E^*\sqrt{R^*}\delta^{3/2}. \quad (2.23)$$

Cuando el contacto ocurre entre una punta esférica rígida ($E_1 \gg E_2$) y una muestra modelada como un semiespacio elástico semi-infinito ($R_2 \rightarrow \infty$), las cantidades efectivas pueden aproximarse como

$$R^* \approx R_1 = R, \quad (2.24)$$

y

$$E^* \approx \frac{E}{1 - \nu^2}, \quad (2.25)$$

donde E y ν corresponden al módulo de Young y a la razón de Poisson de la muestra, respectivamente.

Sustituyendo estas aproximaciones en la ecuación de Hertz, se obtiene

$$F = \frac{4}{3} \frac{E}{1 - \nu^2} \sqrt{R} \delta^{3/2}. \quad (2.26)$$

Esta expresión constituye la ecuación base empleada en AFM para estimar el módulo de Young de muestras biológicas a partir de curvas fuerza-indentación en AFM.

2.5.1.2 MODELO DE SNEDDON

Ian Sneddon extendió la teoría de Hertz para indentadores cónicos, piramidales y otras geometrías, modelos ampliamente utilizados en AFM para describir el contacto entre la punta y la muestra.

Para el contacto entre un indentador cónico de semiángulo de apertura α y un espacio elástico semi-infinito, la geometría del contacto establece la relación entre el radio de contacto a y la profundidad de indentación δ :

$$a = \delta \tan(\alpha). \quad (2.27)$$

Bajo las hipótesis de elasticidad lineal, pequeñas deformaciones y ausencia de adhesión, la relación fuerza-indentación está dada por

$$F = \frac{2}{\pi} E^* \tan(\alpha) \delta^2, \quad (2.28)$$

donde E^* corresponde al módulo elástico efectivo (ec. 2.21).

En AFM, la punta se considera considerablemente más rígida que la muestra ($E_1 \gg E_2$), por lo que

$$E^* \approx \frac{E}{1 - \nu^2}, \quad (2.29)$$

donde E y ν corresponden al módulo de Young y a la razón de Poisson de la muestra, respectivamente. Así, la ecuación de Sneddon toma la forma

$$F = \frac{2E}{\pi(1 - \nu^2)} \tan(\alpha) \delta^2. \quad (2.30)$$

2.5.2 VISCOELASTICIDAD

Los materiales viscoelásticos son aquellos cuya respuesta mecánica presenta simultáneamente características elásticas y viscosas. En un material puramente elástico, la deformación ocurre de manera instantánea y reversible al aplicar un esfuerzo, mientras que en un material puramente viscoso la deformación depende del tiempo y de la velocidad de aplicación de la carga. Los materiales viscoelásticos exhiben un comportamiento intermedio entre ambos casos, por lo que su respuesta mecánica depende tanto de la magnitud de la carga aplicada como del tiempo durante el cual ésta actúa.

Muchos materiales biológicos presentan un comportamiento viscoelástico debido a su estructura interna compleja y heterogénea. Entre ellos se encuentran células, tejidos, hidrogeles y biopolímeros [25]. En las células, este comportamiento se asocia principalmente a la organización del citoesqueleto, de la membrana celular y a las interacciones entre proteínas y organelos. Como consecuencia, las células pueden deformarse, disipar energía y recuperar parcialmente su forma original tras retirar la carga mecánica.

2.5.3 ENSAYOS DE RELAJACIÓN Y FLUENCIA

El comportamiento viscoelástico suele estudiarse mediante ensayos mecánicos de relajación y de fluencia. Estos experimentos permiten analizar cómo evoluciona la respuesta mecánica del material con el tiempo bajo distintas condiciones de carga.

En un ensayo de relajación, el material se somete a una deformación constante ($\epsilon(t) = \epsilon_0$) y se registra la evolución temporal del esfuerzo necesario para mantener dicha deformación. En materiales viscoelásticos, el esfuerzo disminuye progresivamente con el tiempo debido a procesos internos de reorganización y disipación de energía. Este fenómeno se conoce como *relajación de esfuerzos*.

Por otro lado, en un ensayo de fluencia, se aplica un esfuerzo constante ($\sigma(t) = \sigma_0$) y se analiza la evolución temporal de la deformación. Bajo estas condiciones, los materiales viscoelásticos presentan un incremento gradual de la deformación con el tiempo, un comportamiento conocido como *fluencia*.

Estos procesos pueden caracterizarse mediante la función de relajación y la función de fluencia, respectivamente, definidas como [70]:

$$E_{\text{rel}}(t) = \frac{\sigma(t)}{\epsilon_0} \quad \text{y} \quad J_{\text{creep}}(t) = \frac{\epsilon(t)}{\sigma_0}. \quad (2.31)$$

La función de relajación describe cómo disminuye el esfuerzo con el tiempo bajo una deformación constante, mientras que la función de fluencia describe la evolución de

la deformación cuando el esfuerzo permanece constante.

2.5.4 MODELOS VISCOELÁSTICOS

Las funciones de relajación y de fluencia suelen representarse mediante modelos mecánicos que combinan resortes y amortiguadores. En dichos modelos, el resorte describe la respuesta elástica del material y se rige por la ley de Hooke ($F = Ex$), mientras que el amortiguador caracteriza la respuesta viscosa y se modela mediante la ley de viscosidad de Newton ($F = \eta\dot{x}$).

MODELO DE MAXWELL Y MODELO DE KELVIN Los arreglos más simples para describir el comportamiento viscoelástico son el modelo de Maxwell, formado por un resorte y un amortiguador conectados en serie (véase Figura 2.3 a)), y el modelo de Kelvin, que consiste en un resorte conectado en paralelo con un amortiguador (véase Figura 2.3 b)). El modelo de Maxwell describe materiales con comportamiento de tipo fluido, mientras que el modelo de Kelvin representa materiales con comportamiento de tipo sólido [71].

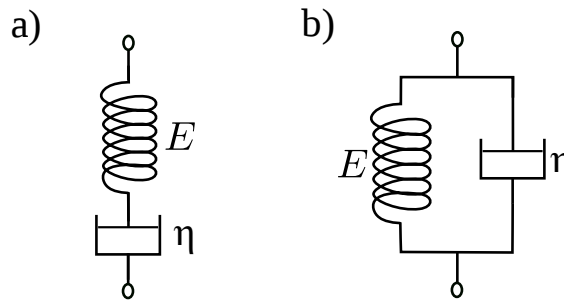


FIGURA 2.3: Representación mecánica del comportamiento a) elástico y b) viscoso; c) modelo de Maxwell y d) modelo de Kelvin.

MODELO DE SÓLIDO LINEAL ESTÁNDAR La complejidad de las células requiere arreglos con un mayor número de elementos [72], tales como el modelo Sólido Lineal

Estándar (SLS, por sus siglas en inglés), también conocido como modelo de Zener. Es un modelo viscoelástico constituido por un resorte en combinación con un elemento de Maxwell, el cual está formado por un resorte y un amortiguador conectados en serie, tal como se muestra en la Figura 2.4 a. La función de relajación esta dada por [70]:

$$E(t) = E_{\infty} + E_1 e^{-t/\tau}, \quad (2.32)$$

donde $\tau = E_1/\eta$, mientras que la función de fluencia es:

$$J_{\text{crp}}(t) = C_g + (C_r - C_g) (1 - e^{-t/\tau_c}), \quad (2.33)$$

donde

$$C_g = \frac{1}{E_0 + E_1}, \quad C_r = \frac{1}{E_0}, \quad \tau_c = \tau \left(\frac{E_0 + E_1}{E_0} \right) \quad (2.34)$$

este modelo contiene tres parámetros para describir el comportamiento viscoelástico de un material.

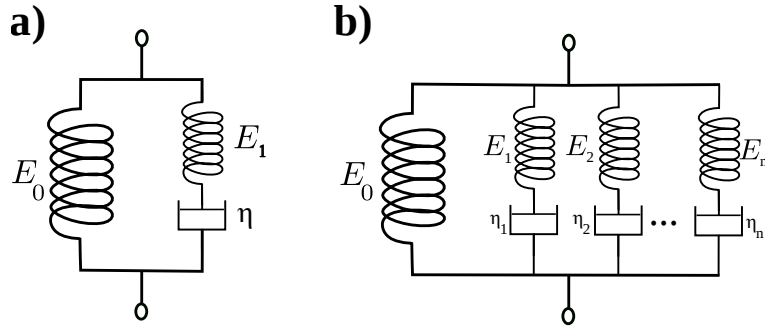


FIGURA 2.4: Arreglo mecánico para a) el modelo SLS y b) el modelo generalizado de Maxwell.

MODELO GENERALIZADO DE MAXWELL Existen modelos más complejos, como el modelo generalizado de Maxwell, que consiste en un resorte conectado a n “brazos de Maxwell” (Figura 2.4 b). Cada elemento de Maxwell está formado por un resorte y un amortiguador conectados en serie, lo que permite representar diferentes tiempos de

relajación del material. Este modelo puede describir adecuadamente la respuesta de relajación observada en materiales biológicos y células [72]. Sin embargo, el aumento del número de parámetros libres dificulta la interpretación física de cada uno de ellos y su asociación directa con componentes o estructuras celulares específicos.

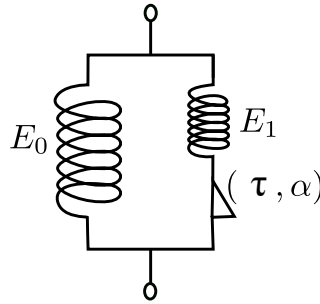


FIGURA 2.5: Arreglo mecánico para el modelo fraccional de Zener.

MODELO FRACCIONAL DE ZENER Existen modelos mecánicos basados en el cálculo fraccional que permiten describir adecuadamente fenómenos viscoelásticos observados en las células, como la relajación, con un menor número de parámetros libres. Estos modelos incluyen elementos fraccionales, los cuales representan un comportamiento intermedio entre un resorte elástico y un amortiguador viscoso. Desde el punto de vista matemático, dichos elementos se describen mediante derivadas fraccionales, es decir, derivadas de orden no entero. Entre ellos se encuentra el modelo fraccional de Zener, el cual se obtiene al reemplazar el amortiguador viscoso del modelo SLS por un elemento fraccional o *spring-pot*, como se muestra en la Figura 2.5. La función de relajación del modelo fraccional de Zener está dada por [73]:

$$E_{\text{rel}}(t) = E_0 + E_1 \xi_\alpha \left\{ - \left(\frac{E_1 t}{\eta} \right)^\alpha \right\}, \quad (2.35)$$

donde $\xi_\alpha(\cdot)$ corresponde a la función de Mittag-Leffler [74]. Cuando $\alpha = 1$, el modelo recupera el comportamiento clásico del modelo SLS.

MODELOS DE LEY DE POTENCIAS Además de los modelos basados en arreglos mecánicos, existen modelos empíricos que describen la respuesta viscoelástica de

materiales biológicos. Uno de los más utilizados es el modelo de ley de potencias, el cual describe la relajación mediante una dependencia temporal tipo potencia, dada por:

$$E_{rel}(t) = Et^{-\alpha}, \quad (2.36)$$

donde E es una constante relacionada con la parte elástica del material y α con la componente viscosa. Este modelo ha sido ampliamente utilizado para describir el comportamiento mecánico celular, ya que muchos materiales biológicos presentan respuestas que siguen leyes de escala temporal.

2.5.5 CURVAS DE FUERZA-DISTANCIA Y FUERZA-RELAJACIÓN CON AFM

En microscopía de fuerza atómica (AFM), el cantilever puede aproximarse, en primera instancia, a un elemento elástico de tipo resorte. Bajo esta consideración, la fuerza ejercida sobre la muestra durante el contacto puede estimarse mediante la ley de Hooke, a partir de la deflexión del cantilever y de su constante elástica. Esta relación permite cuantificar la interacción mecánica entre la punta y la muestra durante los ensayos de indentación. La constante elástica del cantilever, denotada como k_c , suele ser proporcionada por el fabricante; sin embargo, para mejorar la precisión de las mediciones, puede corroborarse experimentalmente mediante métodos de calibración, como el *thermal tuning*, desarrollado por Belikov et al. [75]. Entonces, al registrar la deflexión del cantilever d y conocer el valor de k_c , la fuerza aplicada sobre la muestra puede calcularse como

$$F = k_c d. \quad (2.37)$$

De esta manera, se pueden obtener curvas de fuerza-distancia (FDC) delimitando un parámetro de indentación o una fuerza máxima aplicados a la muestra. La curva tendrá dos caminos: una curva de aproximación, cuando el cantilever baja,

y una curva de retracción, cuando el cantilever sube. Por convención, la evaluación de las propiedades mecánicas del material a analizar se realiza mediante la curva de aproximación.

Una curva FDC puede determinar la respuesta mecánica de un material. En un material elástico, la aproximación y retracción se ven casi completamente alineadas, y se puede determinar un punto de contacto con facilidad. El punto de contacto CP es el desplazamiento del piezoeléctrico Z_p en el que el cantilever toca la muestra. Mientras el cantilever se aproxima y se aleja de la muestra, la célula se deforma y el cantilever se dobla. Se puede obtener la profundidad de indentación δ al restar la deformación del cantilever a su desplazamiento, de manera que en el punto de contacto $\delta = 0$ [61],

$$\delta = Z_p - Z_{CP} - (d - d_{CP}). \quad (2.38)$$

Si la muestra presenta adhesión o fuerza electrostática al interactuar con la punta, habrá una ligera diferencia entre la curva de aproximación y la retracción [76] como se muestra en la Figura 2.6.

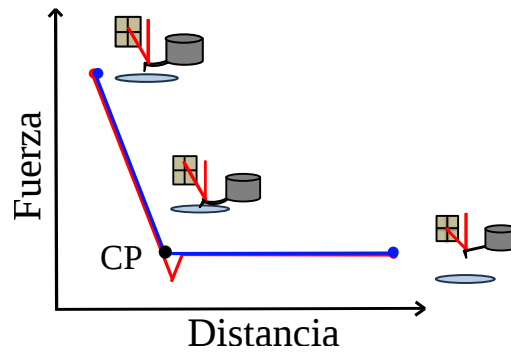


FIGURA 2.6: Esquema de una curva típica de FDC en un material elástico. Se muestra la posición del cantilever en cada paso; se denota en rojo la aproximación y en azul la retracción.

En cambio, un material con una respuesta viscoelástica mostrará una diferencia de camino mucho mayor entre la aproximación y la retracción; su curva FDC presentará histéresis, por lo que el material disipará energía durante la deformación [76] (véase Figura 2.7).

En una curva fuerza-relajación (FRC), el cantilever se aproxima a la muestra y se mantiene a una profundidad de indentación máxima δ_0 hasta alcanzar la fuerza máxima; dicha indentación se mantiene durante un tiempo determinado t . Pasado este tiempo, el cantilever se retira de la muestra a la misma velocidad con la que se aproximó (véase la Figura 2.7 b).

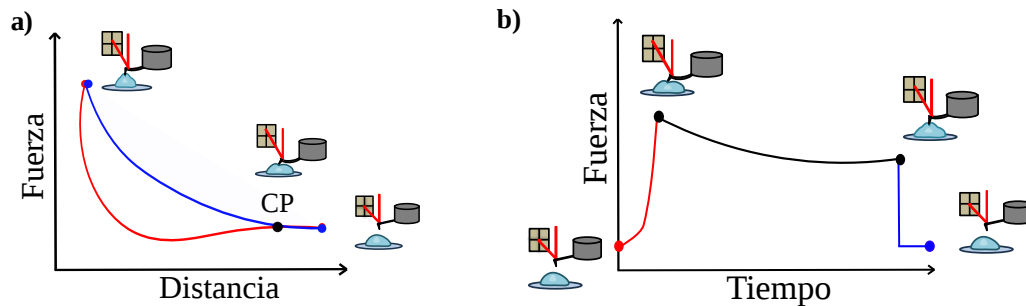


FIGURA 2.7: Esquema de curvas típicas: a) curva fuerza-distancia y b) curva fuerza-relajación en una célula, respectivamente. Se muestra la posición del cantilever en cada paso; se denota en rojo la aproximación, en negro la relajación y en azul la retracción.

A partir de la curva de fuerza-relajación es posible cuantificar la respuesta dependiente del tiempo de la muestra. En este tipo de ensayo, la disminución progresiva de la fuerza durante la etapa de indentación constante se asocia con la relajación viscoelástica del material. Por esta razón, las FRC obtenidas mediante AFM constituyen una herramienta útil para caracterizar las propiedades viscoelásticas de materiales biológicos.

Para analizar este comportamiento, frecuentemente se emplea la metodología propuesta por Darling et al. [77], la cual relaciona la fuerza de relajación con la función de relajación del material mediante

$$F(t) = \frac{C}{1 - \nu^2} E_{rel}(t), \quad (2.39)$$

donde $E_{rel}(t)$ representa la función de relajación del material, ν es el coeficiente de Poisson y C es un factor geométrico que depende de la forma de la punta. Para una punta cónica, este factor viene dado por $C = 2\pi^{-1} \tan(\theta) \delta_0^2$, donde θ es el semiángulo del cono y δ_0 es la profundidad de indentación máxima.

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA GENERAL

En este capítulo se describe la metodología general empleada para la caracterización morfológica y viscoelástica de células vivas. El propósito de esta sección es establecer el flujo de trabajo común empleado en la tesis: preparación de las muestras celulares, selección de técnicas de microscopía, adquisición de imágenes, segmentación celular, extracción de descriptores y análisis de resultados.

3.1 CULTIVO CELULAR

Se trabajó con líneas celulares adherentes utilizadas como modelos biológicos para el estudio de propiedades morfológicas y mecánicas. Las líneas celulares consideradas en la tesis fueron NIH3T3, B16F10, HT29, HUVEC, MG63 y 4T1, proporcionadas por el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Para el mantenimiento celular se utilizó medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), suplementado con suero fetal bovino al 5 % y antibiótico/antimicótico al 1 %. Las células se mantuvieron en condiciones controladas de cultivo a 37 °C, en atmósfera húmeda con 5 % de CO₂.

Antes de cada experimento, las células fueron sembradas en cajas de Petri de

35×10 mm. Se dejaron en incubación durante un mínimo de 24 horas para asegurar su adhesión al sustrato antes de proceder a la adquisición de imágenes o a la realización de mediciones mecánicas. Las condiciones específicas relativas al tipo de línea celular, el tratamiento aplicado y el tiempo de incubación se detallan en cada capítulo de resultados, de acuerdo con el objetivo experimental correspondiente.

3.2 MICROSCOPIAS EMPLEADAS

La metodología se apoyó principalmente en técnicas de microscopía óptica y, en los experimentos que lo requirieron, en microscopía de fuerza atómica (AFM). Estas técnicas permitieron obtener información complementaria sobre las células: la microscopía óptica permitió observar y cuantificar su morfología, mientras que el AFM permitió estudiar su respuesta mecánica mediante curvas de fuerza.

3.2.1 MICROSCOPIA ÓPTICA

La microscopía óptica se empleó como técnica principal para obtener micrografías de células vivas adherentes. Para este fin, se utilizó un microscopio óptico invertido Axio Observer (Zeiss).

Durante el desarrollo de la metodología, se exploraron dos modalidades de observación: campo claro y contraste de fases. La comparación entre ambas modalidades se presenta en el capítulo de resultados correspondiente, donde se analiza su efecto sobre la segmentación y los descriptores morfológicos obtenidos. Las imágenes fueron registradas con una cámara microscópica HAYEAR conectada a una computadora mediante el software S-EYE (véase Figura 3.1). Para alternar entre campo claro y contraste de fases en el microscopio Axio Observer (Zeiss), basta con mover los filtros y el condensador.

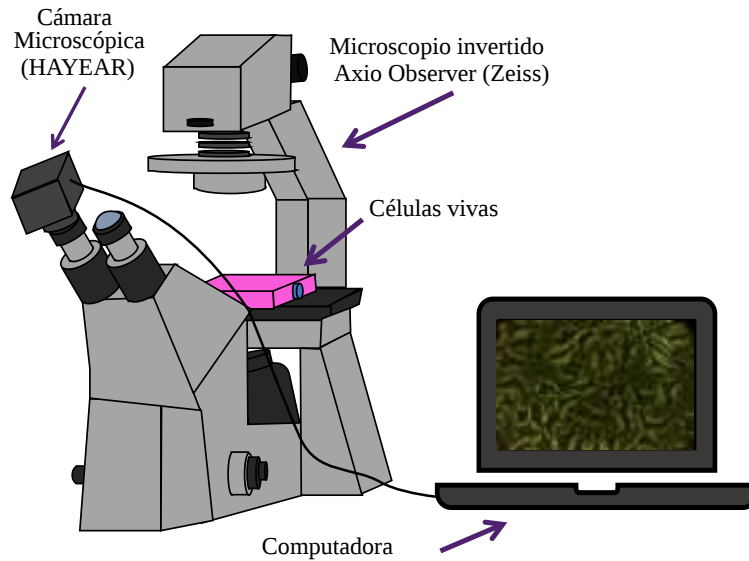


FIGURA 3.1: Diagrama esquemático del arreglo experimental para tomar las micrografías

3.2.2 MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA

En los experimentos destinados a relacionar la morfología con propiedades mecánicas, se empleó un microscopio de fuerza atómica NT-MDT modelo N-TEGRA. El AFM permitió obtener curvas de fuerza-distancia y de relajación, a partir de las cuales se estimaron parámetros elásticos y viscoelásticos de células vivas.

Para efectuar mediciones simultáneas de la morfología y de la respuesta mecánica, se integró el AFM en un microscopio óptico invertido (MOF-AFM), como se ilustra en la Figura 3.2. El MOF-AFM fue construido en nuestro laboratorio a partir de componentes de OpenFlexure [78]. Este acoplamiento permitió observar las células antes o durante la medición mecánica, identificar la célula analizada y asociar sus propiedades morfológicas con sus parámetros mecánicos.

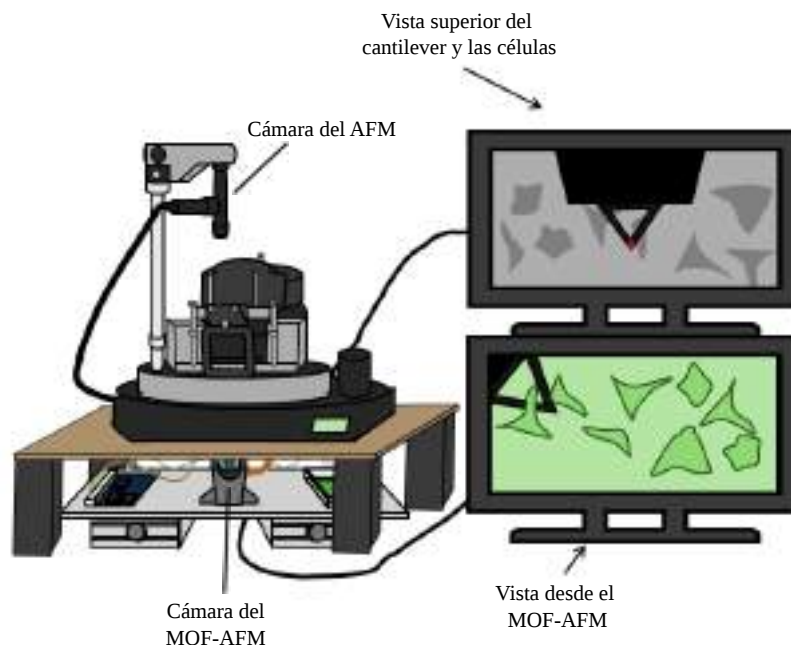


FIGURA 3.2: Arreglo experimental del microscopio óptico invertido acoplado al AFM.

3.3 ADQUISICIÓN DE IMÁGENES

En la adquisición de imágenes con el microscopio Axio Observer, se empleó un objetivo de 40x y se tomaron micrografías en distintas regiones de cada caja de Petri.

En los experimentos simultáneos con AFM, se obtuvo primero una imagen óptica de la región de interés utilizando el MOF-AFM con un objetivo de 20x. A continuación, se eligió una célula individual para llevar a cabo la medición mecánica correspondiente. Cada célula estudiada fue identificada y asociada con sus imágenes y curvas de fuerza, de manera que sus características morfológicas y mecánicas pudieran evaluarse de forma conjunta.

3.4 SEGMENTACIÓN CELULAR

La segmentación celular tuvo como objetivo delimitar el contorno de cada célula contenida en las micrografías para transformarlo en datos cuantitativos. El método de segmentación empleado dependió del sistema de adquisición de imágenes y del tamaño del conjunto de datos.

Para las imágenes obtenidas con el microscopio Zeiss, se utilizó Cellpose [79]. Inicialmente, se segmentó manualmente un conjunto reducido de imágenes representativas, que se utilizó para entrenar un modelo de segmentación automática basado en el modelo predefinido `cyto3`. Después de aplicar el modelo entrenado al conjunto de imágenes, las segmentaciones fueron revisadas y corregidas manualmente cuando fue necesario. Finalmente, se generaron archivos `.npy` con las máscaras correspondientes (véase Figura 3.3).



FIGURA 3.3: a) Imagen con células tomadas con microscopía de contraste de fases, b) máscaras binarias segmentadas por el modelo entrenado y c) máscara de una célula individual.

Los archivos `.npy` fueron procesados mediante rutinas desarrolladas en Python para separar las células individuales y convertirlas en máscaras binarias. Esta etapa permitió aislar cada célula de la imagen original y asociarla con un identificador único para su análisis posterior.

Respecto a las micrografías obtenidas con el MOF-AFM, estas fueron segmentadas en FIJI/ImageJ [80]. Las imágenes se convirtieron a escala de grises de 8

bits, se ajustó manualmente el umbral de segmentación, se rellenaron los huecos en las máscaras y se utilizó la función *watershed* para separar las células cercanas. La supervisión manual permitió asegurar que el contorno segmentado correspondiera adecuadamente al contorno real de la célula. Un ejemplo de las máscaras obtenidas se observa en la Figura 3.4 c) y d).

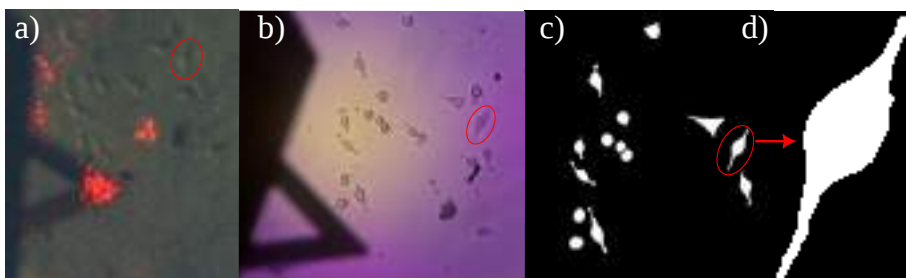


FIGURA 3.4: Vista de células MG63. a) Imagen adquirida desde el microscopio del AFM, b) imagen obtenida por el microscopio óptico invertido, c) máscaras binarizadas de las células indentadas y d) máscara de una célula individual.

3.5 DESCRIPTORES MORFOLÓGICOS Y VISCOELÁSTICOS

A partir de las máscaras binarias, se obtuvieron descriptores cuantitativos de la morfología celular. Estos descriptores permitieron transformar el contorno de cada célula en variables numéricas que permiten la comparación entre muestras, líneas celulares o condiciones experimentales.

3.5.1 DESCRIPTORES MORFOLÓGICOS CONVENCIONALES

Las máscaras binarias fueron analizadas en FIJI/ImageJ mediante la función *Analyze Particles*. De este análisis se obtuvieron descriptores convencionales, como el área, el perímetro, la circularidad y la razón de aspecto. Estos parámetros proporcionan información básica sobre el tamaño, la elongación y la compactación de

la célula.

3.5.2 DESCRIPTORES BASADOS EN CONTORNO

Además de los descriptores convencionales, se emplearon métricas derivadas del método LOCO-EFA, que permite describir el contorno celular a partir de contribuciones asociadas a lóbulos y variaciones locales de forma. Antes de este análisis, las máscaras se redimensionaron a 512×512 píxeles para normalizar el formato de entrada. A partir de LOCO-EFA se obtuvieron métricas como *Shape Complexity* (SC) y la entropía.

3.5.3 DESCRIPTORES MECÁNICOS Y VISCOELÁSTICOS

En los estudios con AFM, las curvas de fuerza se utilizaron para estimar propiedades mecánicas. Las curvas FDC se emplearon para estimar el módulo de Young, mientras que las curvas FRC permitieron obtener parámetros viscoelásticos. Para ello, las curvas se ajustaron mediante modelos matemáticos descritos en el marco teórico. Los ajustes se realizaron mediante herramientas computacionales de Python, en particular, la función `curve_fit` de `scipy.optimize` [81].

3.6 ANÁLISIS DE RESULTADOS

El análisis morfológico se realizó mediante gráficos de dispersión, diagramas de fase, histogramas, estimaciones de densidad tipo KDE y gráficos de caja. Cuando fue necesario, se aplicó un filtro entre los cuartiles Q1 y Q3 para visualizar la región central de la distribución y reducir el efecto de los valores extremos.

Para el análisis estadístico de parámetros morfológicos entre dos grupos inde-

pendientes, se utilizó la prueba de Welch, con un nivel de significancia de $p < 0.05$. La significancia estadística se indicó como *n.s.* para $p > 0.05$, * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$ y *** para $p < 0.001$.

En el caso de parámetros viscoelásticos, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar grupos independientes, cuando las variables no cumplían necesariamente con los supuestos de normalidad. La hipótesis nula consideró que las medianas de los grupos eran iguales, y se rechazó con $p < 0.05$.

CAPÍTULO 4

MORFOLOGÍA CELULAR: PARÁMETROS DE INTERÉS Y DIAGRAMAS DE FASE

La caracterización cuantitativa de la morfología celular podría verse beneficiada por el uso de descriptores que representen tanto propiedades geométricas globales como irregularidades complejas del contorno. Existe una amplia variedad de descriptores morfológicos para el análisis celular, desde métricas geométricas convencionales hasta métodos basados en la descomposición de contornos. Sin embargo, la utilidad y sensibilidad de cada descriptor dependen del tipo celular, su fenotipo y las características morfológicas de interés, por lo que no hay un conjunto universal de métricas válido para todos los sistemas biológicos [6, 12].

Con el propósito de definir una metodología para la caracterización morfológica de células adherentes y evaluar su capacidad para distinguir entre diferentes líneas celulares, en este capítulo se presenta un estudio estructurado en tres etapas, cada una orientada a abordar un objetivo específico:

- Identificar las métricas más representativas para describir cambios en la forma y complejidad del contorno.
- Comparar el desempeño de la microscopía de campo claro y de contraste de fases en los procesos de segmentación y caracterización morfológica.

- Explorar la capacidad de las métricas y de los diagramas de fase para identificar fenotipos morfológicos y establecer diferencias entre distintas líneas celulares.

4.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la primera etapa se estudiaron nueve figuras de geometría controlada: un cuadrado, un círculo, un triángulo, un pentágono, un hexágono y estrellas de tres, cuatro, cinco y seis picos, que fueron construidos en Inkscape. Estas figuras se analizaron conforme a lo descrito en las secciones 3.5.1 y 3.5.2 para obtener sus métricas convencionales y aquellas derivadas de LOCO-EFA. Posteriormente, las métricas se compararon entre sí con el fin de evaluar la información morfológica capturada por cada descriptor y su capacidad para discriminar entre diferentes geometrías.

Para la segunda etapa se utilizó la línea celular MG63 de osteosarcoma humano como base de estudio. Las células fueron sembradas e incubadas durante 24 horas para asegurar su adhesión. Después de ese tiempo, se tomaron micrografías de campo claro y de contraste de fase en la misma región. Se adquirieron diez imágenes en distintas zonas de la caja de Petri. Estas fueron segmentadas y analizadas conforme a lo descrito en las secciones 3.4, 3.5.1 y 3.5.2, con el fin de comparar las métricas obtenidas con las diferentes microscopias.

Finalmente, se estudiaron tres líneas celulares humanas: MG63, HUVEC, HT29, y tres líneas celulares murinas: 4T1, NIH3T3 y B16F10. Estas células fueron sembradas e incubadas durante 24 horas para asegurar la adhesión, bajo las condiciones de cultivo establecidas en 3.1. Posteriormente, se tomaron las micrografías correspondientes y se analizaron siguiendo la metodología descrita en las secciones 3.4, 3.5.1 y 3.5.2, con la finalidad de evaluar la capacidad de las métricas y de los diagramas de fase para discriminar diferentes fenotipos morfológicos.

4.2 ANÁLISIS DE DESCRIPTORES MORFOLÓGICOS EN FIGURAS GEOMÉTRICAS

Con el propósito de identificar los descriptores más adecuados para caracterizar la forma y complejidad del contorno, se realizó un análisis morfológico de nueve figuras geométricas con dimensiones equivalentes y distintas características geométricas.

4.2.1 DESCRIPTORES GEOMÉTRICOS CONVENCIONALES

Las figuras geométricas analizadas se muestran en la figura Figura 4.1a. Los descriptores geométricos convencionales evaluados fueron la razón de aspecto, la circularidad, la solidez y la redondez, cuyos valores se presentan mediante el mapa de calor de la figura Figura 4.1b.

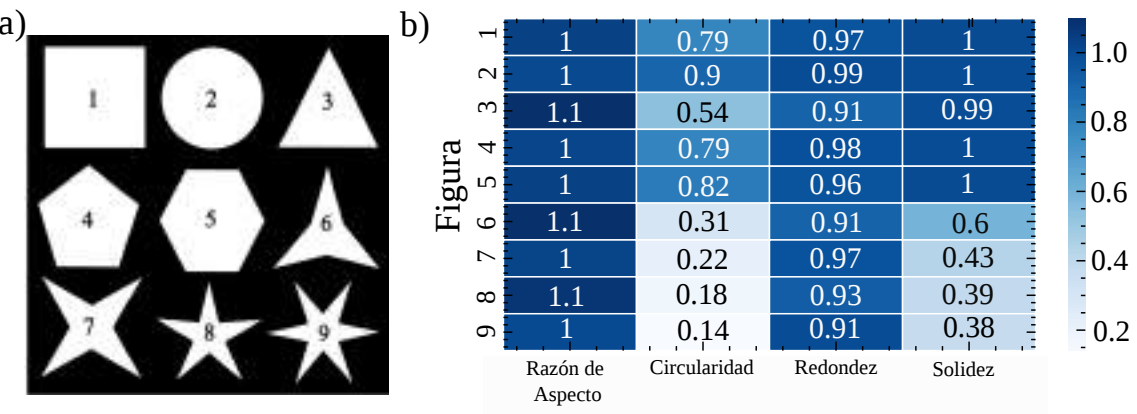


FIGURA 4.1: a) Figuras geométricas de dimensiones equivalentes utilizadas en el análisis. b) Mapa de calor de las métricas morfológicas convencionales: razón de aspecto, circularidad, redondez y solidez.

La razón de aspecto no presentó variaciones entre las distintas figuras analizadas, ya que todas fueron construidas con dimensiones equivalentes. Debido a que esta métrica describe la relación entre los ejes principales de una figura, no es sensible

a cambios en la cantidad de vértices ni a las irregularidades del contorno. En consecuencia, figuras con geometrías notablemente diferentes pueden presentar valores similares de razón de aspecto.

En cuanto a la circularidad, el valor obtenido para el cuadrado y el pentágono resultó ser el mismo (0.79), lo que indica que ambas figuras son equivalentes según esta métrica. Esto se explica por la propia definición del indicador (véase la ecuación 2.1), que establece que la razón entre el cuadrado del perímetro y el área coincide para las dos figuras. Bajo este mismo criterio, se entiende también por qué la circularidad permite distinguir las estrellas del resto de las formas: a medida que aumenta el número de picos, el perímetro crece en mayor proporción que el área y, en consecuencia, la circularidad disminuye. Por ello, se concluye que, si bien la circularidad es útil para detectar extremidades prominentes en las figuras, carece de la resolución necesaria para identificar vértices más pequeños.

La solidez presenta una limitación similar a la de la circularidad. Aunque logra distinguir las estrellas del resto de los polígonos, asigna el mismo valor a todas las figuras que tienen vértices cóncavos.

Finalmente, la redondez muestra una limitación similar a la observada en la razón de aspecto, debido a que todas las figuras tienen dimensiones iguales.

Del conjunto de los descriptores geométricos, la circularidad presentó el mejor desempeño en la caracterización, a pesar de sus limitaciones. No obstante, no debería emplearse de manera aislada para caracterizar objetos con contornos tan complejos como las células.

4.2.2 MÉTRICAS DERIVADAS DE LOCO-EFA

Entre las métricas derivadas del método LOCO-EFA [55] para la caracterización de contornos bidimensionales se encuentran la entropía y la complejidad de

forma (*Shape Complexity*, SC). La entropía fue propuesta por Sánchez-Corrales et al. [55], mientras que la métrica SC fue desarrollada en este trabajo con el objetivo de describir la prominencia de las irregularidades del contorno.

Sánchez-Corrales et al. [55] reportaron que la entropía permite distinguir formas de acuerdo con el grado de desorden presente en su contorno. Sin embargo, esta métrica presenta limitaciones para discriminar figuras cóncavas o diferenciar cambios relacionados con la prominencia de sus extremidades.

Por otra parte, la métrica SC mostró sensibilidad a la presencia de ramificaciones o protrusiones respecto al cuerpo principal de la figura; a esta característica se le denominará en este trabajo como *polaridad*. No obstante, a partir de esta métrica por sí sola no resulta evidente distinguir si el incremento en SC está asociado principalmente con el número de extremidades o con su tamaño relativo.

Estas observaciones sugieren que el análisis de la entropía y la complejidad de forma por separado puede ser insuficiente para describir de manera clara las variaciones morfológicas de las figuras estudiadas.

4.2.3 DIAGRAMAS DE FASE

Con el propósito de analizar el comportamiento e interpretación de ambas métricas, se realizaron diagramas de dispersión comparando SC con la entropía y con la circularidad. En adelante, estas representaciones serán denominadas *diagramas de fase*.

En la Figura 4.2 a), se aprecia que la representación SC vs entropía organiza las células de una forma poco intuitiva; parecería que agrupa los polígonos según su número de vértices, pero la ubicación del triángulo en el plano no resulta evidente. En el eje de entropía el orden de las formas es aún menos claro, ya que no las separa por número de vértices y, en el caso de las estrellas, tampoco por el número de picos.

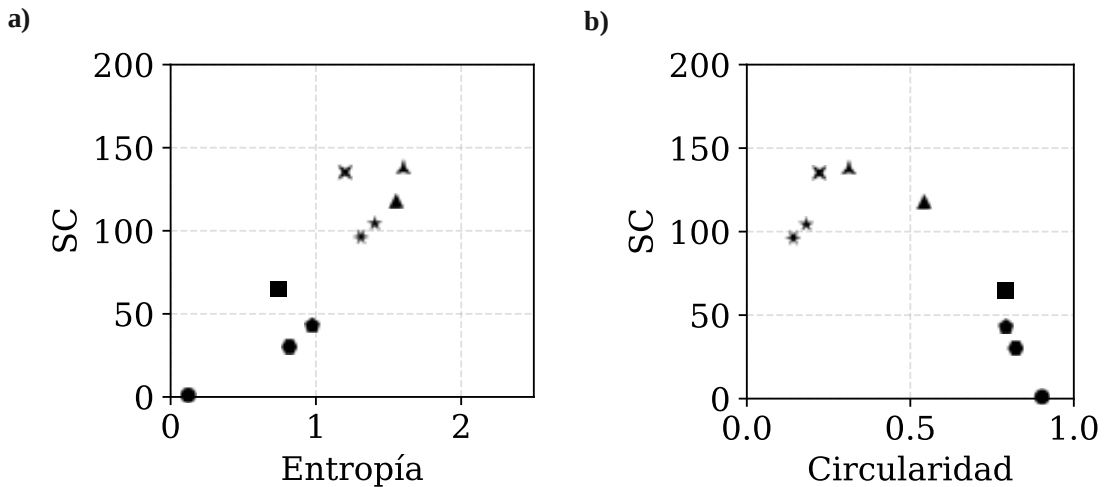


FIGURA 4.2: Polígonos regulares analizados con sus máscaras binarias sobrepuestas en los planos a) SC vs entropía y b) SC vs circularidad

En la Figura 4.2 b) podemos identificar de manera más clara el orden propuesto por la métrica SC y como esta se complementa con la circularidad: La clasificación le otorga el SC más bajo al círculo por su ausencia de vértices o extremidades. Como era de esperarse, este tiene también la mayor circularidad de todas las figuras. El siguiente polígono en la clasificación es el hexágono, el cual muestra un SC mas alto por sus vértices y, por consiguiente, menor circularidad. El polígono siguiente es el pentágono; podemos notar que, a pesar de tener menos vértices, el ángulo de sus vértices internos es más agudo, lo cual los hace ver más pronunciados. Observamos una vez más una disminución en la circularidad, posiblemente debido al aumento en el perímetro respecto al área. La siguiente figura es el cuadrado, el cual muestra un SC mayor al tener vértices aún más pronunciados. Su circularidad es muy similar a la del pentágono, lo cual sugiere que la relación entre área y perímetro es similar. Aun así, es menor. Finalmente, el triángulo muestra los vértices mas pronunciados, lo que le otorga un SC considerablemente mayor al cuadrado; análogamente, su circularidad baja.

En el caso de las estrellas, la circularidad las ordena por número de picos, otorgando menor circularidad a la estrella con más picos. El SC por otra parte,

parece no solo tomar en cuenta el número de picos de las figuras, sino también el tamaño de cada pico relativo al de la figura. Los picos de la estrella de seis puntas son más pequeños en comparación con su área total, mientras que la estrella de tres puntas tiene picos mas grandes respecto a su área y por consiguiente un mayor SC. Podemos observar además, que usar ambas métricas a la vez permite una clara separación entre los polígonos cóncavos y los convexos. Al aplicarlo a figuras irregulares como las células, esto se traduciría en poder distinguirlas por sus lóbulos, tanto por su número como por su prominencia respecto al resto de la célula

La comparación entre ambas gráficas sugiere que utilizar las métricas SC y circularidad en conjunto clasifica las células de manera más intuitiva y utilizando parámetros cuantitativos. Cabe resaltar que sobreponer las imágenes de las figuras analizadas sobre sus coordenadas en la gráfica otorga también una representación visual, lo cual permitiría observar la variedad morfológica de una muestra cualitativamente al mismo tiempo que sus datos cuantitativos se utilizan para el análisis estadístico. A estas gráficas se les llamará ‘diagramas de fases’ y serán utilizadas para el análisis de experimentos posteriores.

4.3 INFLUENCIA DE LA MODALIDAD DE MICROSCOPIA EN LA CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CÉLULAS MG63

Con el fin de evaluar la influencia de la modalidad de microscopía sobre la caracterización morfológica, se realizó un análisis utilizando células MG63 como modelo de estudio. Se compararon imágenes obtenidas mediante microscopía de campo claro y microscopía de contraste de fases de una misma región celular. Dado que el contraste de fases mejora la visualización de estructuras semitransparentes y de los contornos celulares, esta comparación permitió determinar el efecto de la modalidad de imagen sobre la segmentación y las métricas morfológicas obtenidas.

4.3.1 VISUALIZACIÓN DE CONTORNOS CELULARES

Al comparar las imágenes mostradas en la Figura 4.3, se observa que las células pueden identificarse en ambas modalidades de microscopía. Sin embargo, en las imágenes de campo claro (Figura 4.3a) los contornos celulares presentan una definición limitada, lo que dificulta la delimitación de protrusiones y lóbulos de menor tamaño. En contraste, las imágenes de microscopía de contraste de fases (Figura 4.3b) muestran un mayor contraste entre las células y el fondo, permitiendo una visualización más clara de los detalles del contorno celular. Esta diferencia en la definición de los contornos se observó de manera consistente en todas las imágenes analizadas.

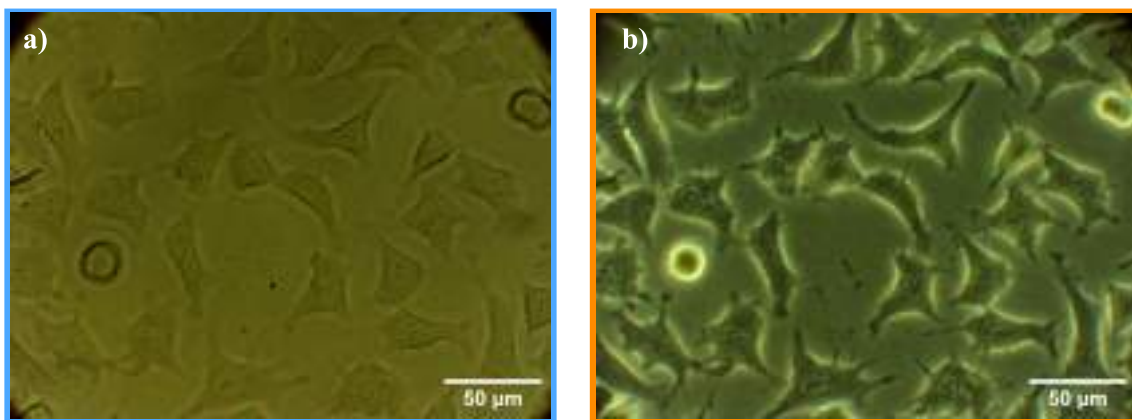


FIGURA 4.3: Imágenes representativas de células MG63 obtenidas mediante a) microscopía de campo claro y b) microscopía de contraste de fases.

4.3.2 EFECTO DE LA MODALIDAD DE MICROSCOPÍA EN LAS MÉTRICAS MORFOLÓGICAS

Al analizar los parámetros morfológicos de las células (véase Figura 4.4 a)-f)), observamos que el área medida no muestra diferencias significativas entre los grupos, lo cual es de esperarse por tratarse de las mismas células. De la misma

manera, la métrica AR se mantuvo consistente entre ambos grupos, indicando que las proporciones de las células se preservaron en ambas técnicas de microscopía.

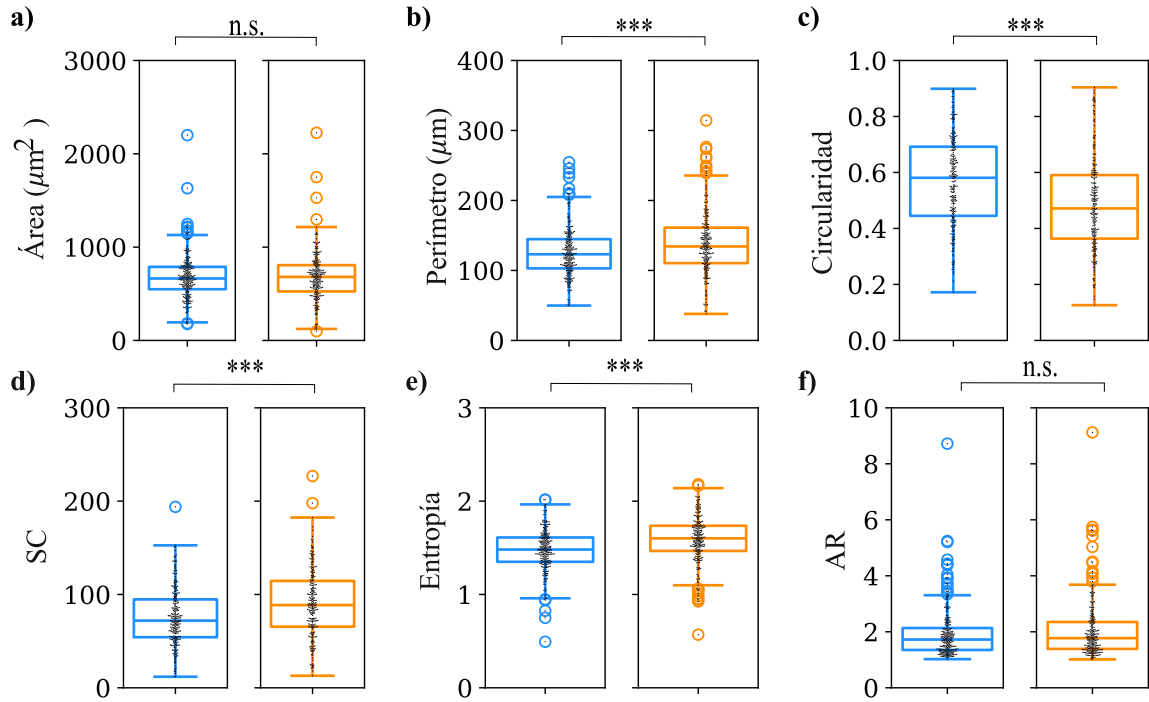


FIGURA 4.4: Gráficos de caja y bigote de las métricas de a) área, b) perímetro, c) circularidad, d) SC, e) entropía y f) AR. Se muestran en azul las gráficas obtenidas mediante microscopía de campo claro y en naranja las de contraste de fases.

El resto de las métricas, por otra parte, mostraron diferencias altamente significativas entre los grupos. Debido a que en la microscopía de campo claro no se aprecian los lóbulos con nitidez, la segmentación por Cellpose detectó lóbulos más pequeños, por lo cual la métrica SC fue significativamente menor. Como los lóbulos son aparentemente más cortos, el contorno también se vio reducido, lo que queda evidenciado en un perímetro mas pequeño para la microscopía de campo claro. Las imágenes de contraste de fase también preservaron estructuras más pequeñas e irregularidades en el contorno, por lo que la entropía fue significativamente mayor para este grupo.

Finalmente, mostrar lóbulos menos definidos y más cortos provocó que la circularidad fuera significativamente mayor en la segmentación en campo claro. Si bien

todas estas métricas otorgan información fisiológicamente relevante, utilizaremos únicamente SC y circularidad para realizar una clasificación.

4.3.3 CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA MEDIANTE SC Y CIRCULARIDAD

En la Figura 4.5 observamos los diagramas de fase de ambas técnicas de microscopía. Podemos corroborar la clasificación por el número y la prominencia de los lóbulos de las células. Las células con SC alto y circularidad baja presentan muchos lóbulos alargados. Las células con SC bajo y circularidad baja presentan morfologías ‘fusiformes’, es decir, tienen dos lóbulos muy pronunciados que se extienden de un cuerpo elíptico. Las células con valores intermedios de ambas métricas tienen morfologías poligonales, es decir, tienen lóbulos visibles pero muy pequeños en comparación con el resto de la célula. Por último, las células con SC bajo y circularidad alta tienen formas redondas y sin lóbulos visibles. Comparando ambos diagramas de fases, podemos corroborar que la segmentación por contraste de fases preserva detalles del contorno mas pequeños y detecta lóbulos que la segmentación por campo claro omitió.

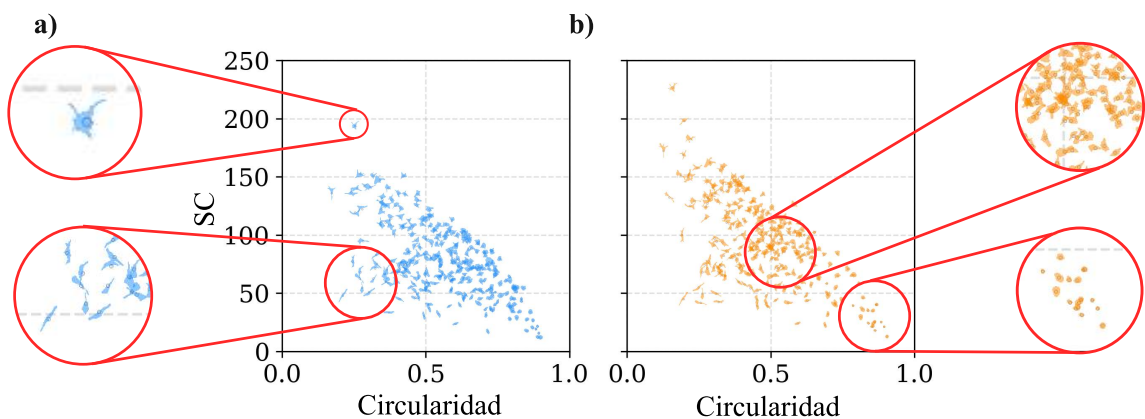


FIGURA 4.5: Gráficas de SC vs circularidad para a) microscopía de campo claro y b) microscopía de contraste de fase, con acercamientos en zonas de interés.

4.3.4 DISTRIBUCIÓN MORFOLÓGICA MEDIANTE ANÁLISIS KDE

Los datos cuantitativos extraídos por estas métricas se pueden representar en una gráfica KDE de 2 variables; esta gráfica es análoga a un histograma pero representa los datos como una curva continua de densidad de probabilidad. Estas gráficas ilustradas en la Figura 4.6 a) y b) muestran la distribución de la morfología de cada grupo y en ellas observamos que, a pesar de tener un rango de formas similares, en las células segmentadas en campo claro predominan morfologías poligonales y elípticas, mientras que en contraste de fases predominan morfologías con lóbulos mas largos y con mayor polaridad.

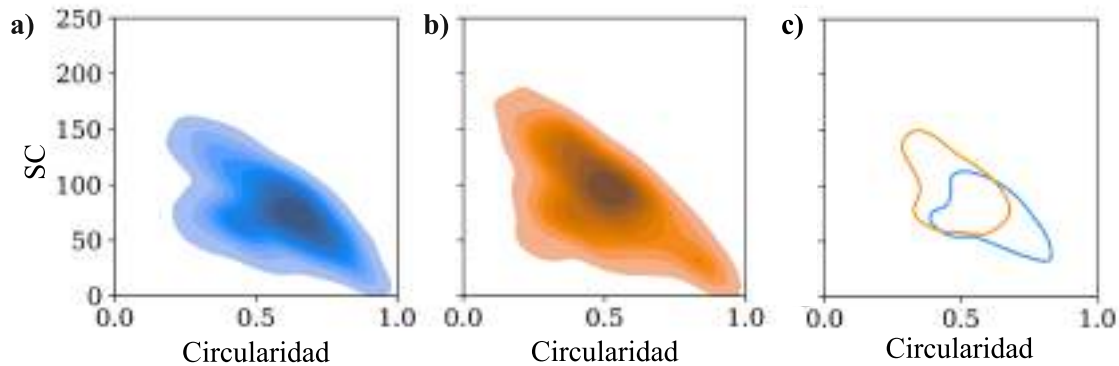


FIGURA 4.6: Histogramas KDE bidimensionales de a) microscopía de campo claro, b) microscopía de contraste de fases y c) datos filtrados entre los cuartiles Q1 y Q3.

Para descartar los extremos de la distribución podemos realizar un filtrado y mantener unicamente los datos en los cuartiles Q1 y Q3 de cada histograma, es decir, el 50% de los datos alrededor de la media (véase Figura 4.6 c)). Tras realizar el filtrado, las diferencias en la distribución de ambos grupos son aun más evidentes, evidenciando que el análisis en campo claro sugiere una morfología predominante muy diferente a la segmentación por contraste de fases.

Con estas diferencias queda demostrado que, en el caso de células adherentes, la microscopía de contraste de fases preserva el contorno de las células con mayor nitidez y precisión, permitiendo una segmentación computarizada más sencilla y mas

cercana al contorno real de las células. Asimismo, queda verificada la clasificación por lóbulos propuesta por los diagramas de fases. Esta clasificación mostró ser de gran utilidad para observar la variedad morfológica de las muestras de manera visual y encontrar la población predominante dentro de ellas utilizando únicamente datos cuantitativos a través de las gráficas KDE.

4.4 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LÍNEAS CELULARES HUMANAS Y MURINAS

Una vez identificados los descriptores morfológicos más significativos y seleccionada la modalidad de microscopía más adecuada para la caracterización morfológica, la metodología resultante se aplicó al análisis de diferentes líneas celulares humanas y murinas. El objetivo de esta etapa fue evaluar la capacidad de las métricas morfológicas y de los diagramas de fase para discriminar entre distintos fenotipos celulares y explorar las características morfológicas predominantes de cada línea.

El análisis incluyó tres líneas celulares humanas (MG63, HUVEC y HT29) y tres líneas celulares murinas (4T1, B16F10 y NIH3T3), cuyas imágenes representativas se muestran en la figura Figura 4.7. El conjunto de datos estuvo constituido por 312 células MG63, 170 células HUVEC, 150 células HT29, 437 células 4T1, 138 células B16F10 y 150 células NIH3T3. Posteriormente, las líneas celulares humanas y murinas se analizaron de forma independiente utilizando la metodología desarrollada en las etapas previas.

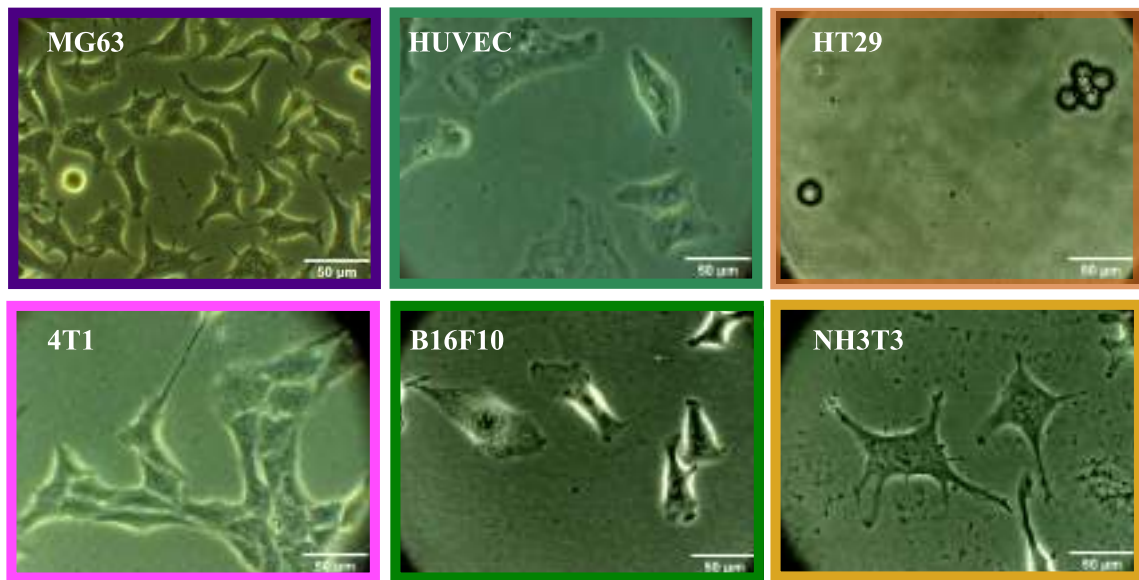


FIGURA 4.7: Imágenes representativas de las líneas celulares humanas (MG63, HUVEC y HT29) y murinas (4T1, B16F10 y NIH3T3) analizadas en este estudio.

4.4.1 COMPARACIÓN DE MÉTRICAS MORFOLÓGICAS ENTRE LÍNEAS CELULARES

En la Figura 4.8 se observa la distribución de las métricas seleccionadas para cada línea celular humana. Las células muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí en todas las métricas, con la excepción de la métrica AR, la cual no distingue entre las líneas MG63 y HUVEC. Estas células tienen polaridades notoriamente diferentes, pero debido a que tienen una elongación similar, su métrica AR es muy parecida.

De manera análoga, en la Figura 4.9 se observa la distribución estadística de las métricas seleccionadas para cada línea celular murina. Así como en las células humanas, la métrica AR no pudo distinguir entre las líneas 4T1 y NIH3T3 a pesar de que la línea 4T1 es evidentemente menos polar que la línea NIH3T3. Esto demuestra que la métrica no distingue diferencias entre la cantidad de lóbulos de las células.

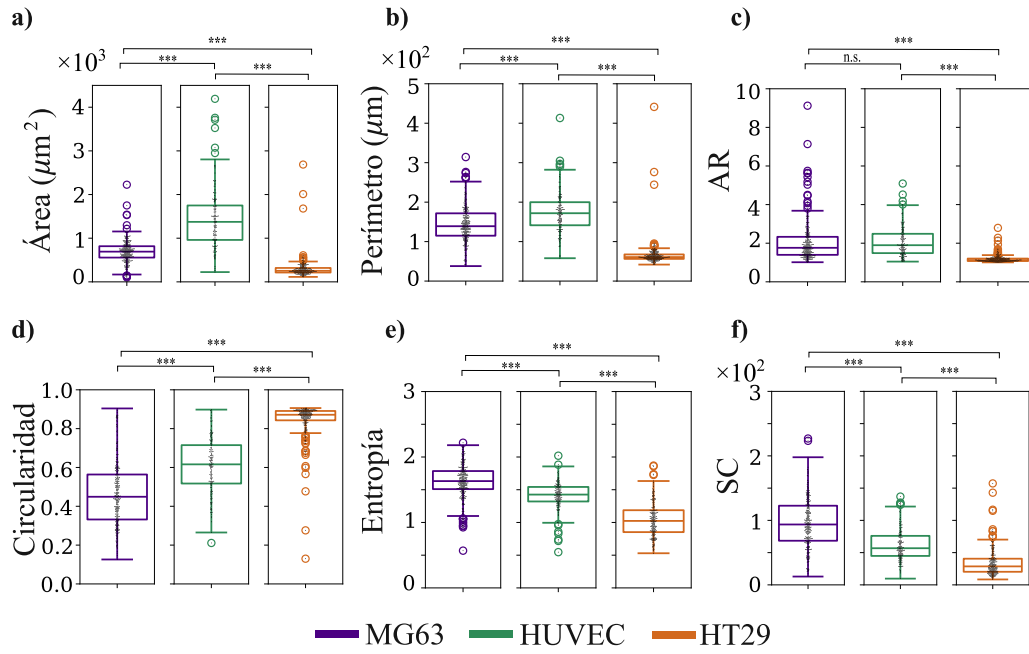


FIGURA 4.8: Gráfico de caja y bigote de las métricas de a) área, b) perímetro, c) AR, d) circularidad e) entropía y f) SC de las células humanas analizadas.

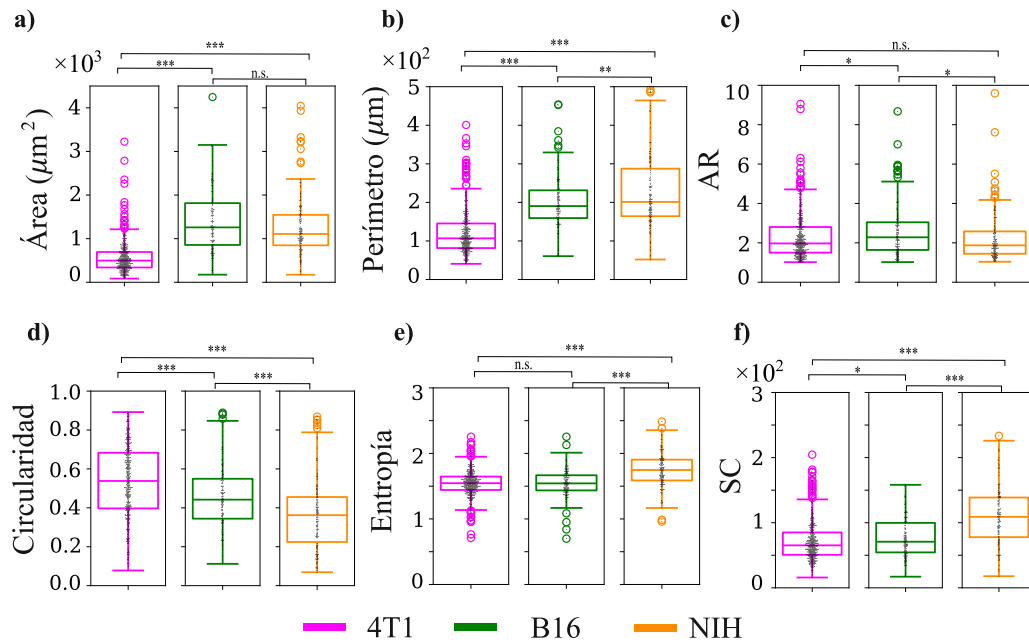


FIGURA 4.9: Gráfico de caja y bigote de las métricas de a) área, b) perímetro, c) AR, d) circularidad e) entropía y f) SC de las células murinas analizadas.

4.4.2 DISCRIMINACIÓN DE FENOTIPOS MORFOLÓGICOS MEDIANTE DIAGRAMAS DE FASE

Los diagramas de fase de la figura Figura 4.10 muestran la distribución de las líneas celulares en el espacio definido por SC y circularidad. De manera complementaria, las gráficas KDE de la figura Figura 4.11 permiten visualizar las regiones de mayor densidad y comparar las distribuciones completas con aquellas obtenidas después del filtrado por cuartiles Q1-Q3.

En las líneas celulares humanas, los diagramas de fase muestran distribuciones morfológicas diferenciadas entre MG63, HUVEC y HT29. Las células MG63 presentan la mayor dispersión dentro del espacio morfológico analizado, con una distribución orientada hacia regiones de mayor complejidad de contorno. Esto se refleja en sus valores promedio de $SC = 95.5784$ y $circularidad = 0.4644$.

Por su parte, las células HUVEC muestran una distribución más acotada, localizada principalmente en regiones asociadas con morfológicas elípticas y poligonales, con valores promedio de $SC = 61.3720$ y $circularidad = 0.6075$. En contraste, las células HT29 se concentran en regiones de mayor circularidad y menor complejidad morfológica, con valores promedio de $SC = 34.1374$ y $circularidad = 0.8473$.

El análisis mediante KDE y el filtrado por cuartiles Q1-Q3 permiten reducir la influencia de valores extremos y hacen más evidente la separación entre las distribuciones morfológicas de las tres líneas humanas.

En las líneas celulares murinas, las células NIH3T3 presentan la mayor complejidad morfológica dentro del grupo analizado, con valores promedio de $SC = 110.2836$ y $circularidad = 0.3638$. Estos valores indican una predominancia de morfológicas con contornos complejos y menor circularidad. Aunque también se observaron células con morfológicas poligonales, estas no constituyeron la región predominante de la distribución.

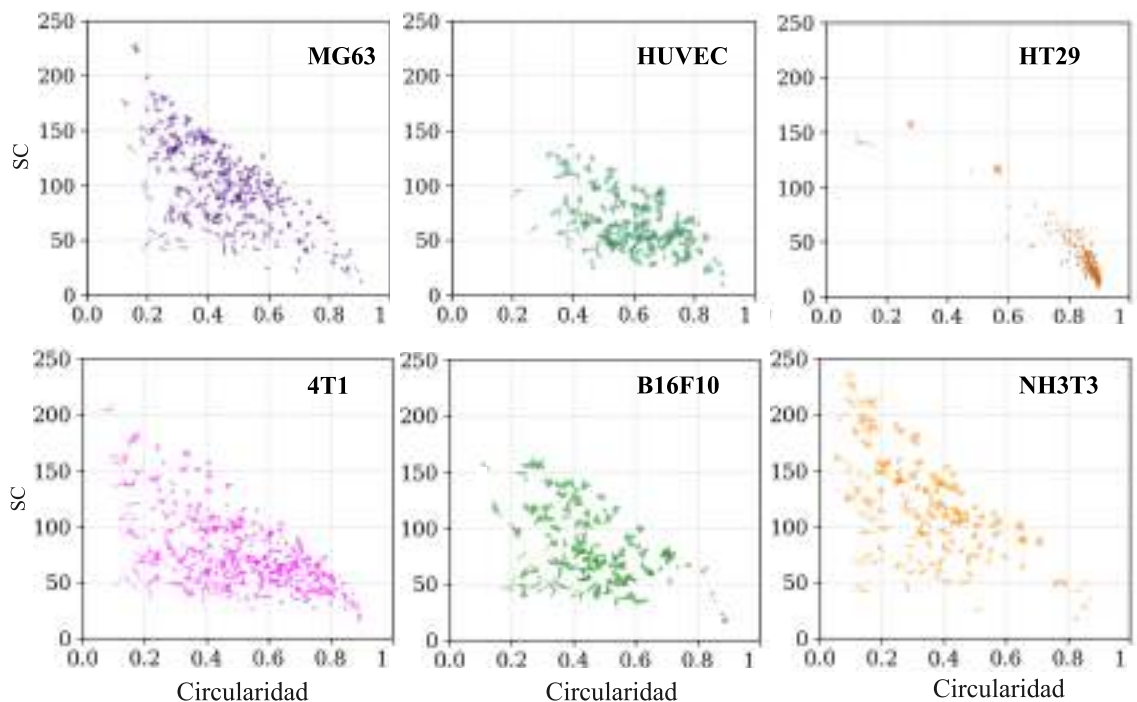


FIGURA 4.10: Diagramas de fase de líneas humanas y murinas analizadas.

Las líneas B16F10 y 4T1 muestran distribuciones parcialmente similares, localizadas principalmente en regiones asociadas con morfologías poligonales, aunque ambas incluyen células con características más polares. Sus valores promedio de SC fueron cercanos, con $SC = 77.6999$ para B16F10 y $SC = 71.2959$ para 4T1. Sin embargo, difirieron en circularidad, con valores promedio de 0.4584 y 0.5329, respectivamente.

La mayor densidad observada en la distribución de 4T1 se relaciona con el mayor número de células analizadas en esta línea celular (437 células), en comparación con B16F10 (138 células). Esta diferencia puede asociarse con el menor tamaño promedio de las células 4T1, como se muestra en la figura Figura 4.9a. Al aplicar el filtrado por cuartiles Q1-Q3, se observa que, aunque cada línea murina presenta una distribución morfológica característica, las tres comparten una región común asociada con morfologías de tipo poligonal.

En conjunto, estos resultados muestran que la combinación de SC, circularidad

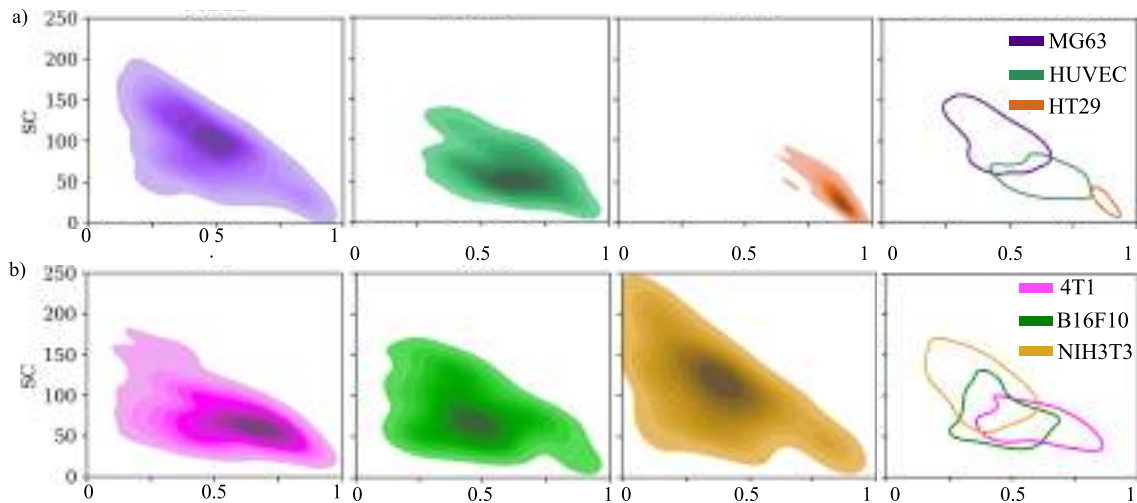


FIGURA 4.11: Gráficas de densidad kernel (KDE) de las líneas celulares analizadas y sus correspondientes distribuciones filtradas mediante los cuartiles Q1–Q3. Se muestran a) líneas murinas y b) líneas humanas.

y diagramas de fase permite diferenciar distribuciones morfológicas entre líneas celulares y reconocer regiones compartidas asociadas con fenotipos celulares similares.

4.4.3 RESUMEN ESTADÍSTICO DE SC Y CIRCULARIDAD

Con el fin de complementar la información obtenida a partir de los diagramas de fase y las distribuciones KDE, las tablas 4.1 y 4.2 resumen los principales estadísticos descriptivos de SC y circularidad para cada línea celular. En ellas se reportan la media, mediana, desviación estándar, valores mínimo y máximo, así como los límites correspondientes al primer (Q1) y tercer (Q3) cuartil.

Los valores estadísticos son consistentes con las tendencias observadas en los diagramas de fase. Entre las líneas humanas, MG63 presentó los valores promedio más altos de SC, seguida de HUVEC y HT29, lo que refleja una disminución progresiva en la complejidad morfológica. De manera complementaria, HT29 mostró la circularidad promedio más alta, mientras que MG63 presentó la más baja, confirmando que ambas métricas capturan diferencias morfológicas entre las líneas analizadas.

TABLA 4.1: Valores estadísticos de SC las líneas celulares analizadas.

	MG63	HUVEC	HT29	4T1	B16F10	NIH3T3
Media	95.5784	61.3720	34.1374	71.2959	77.6999	110.2836
Mediana	93.6246	56.8262	28.6557	65.2397	70.7949	108.9865
Std. dev.	38.2842	24.4355	44.6636	29.9200	31.5158	44.6636
Mín	12.8977	9.6789	8.4132	15.8433	17.0893	17.8455
Q1	68.4146	44.8768	20.2866	50.7097	54.4146	77.8220
Q3	122.7300	75.9813	40.5738	85.0458	99.7466	138.7011
Máx	226.9295	136.9181	157.3001	204.5013	158.1807	233.4433

En las líneas murinas, NIH3T3 presentó el valor promedio de SC más elevado y la menor circularidad promedio, indicando una predominancia de morfologías complejas y poco compactas. Por otro lado, B16F10 y 4T1 mostraron valores intermedios de SC y circularidad, consistentes con la presencia de fenotipos predominantemente poligonales observados en los diagramas de fase.

TABLA 4.2: Valores estadísticos de circularidad las líneas celulares analizadas.

	MG63	HUVEC	HT29	4T1	B16F10	NIH3T3
Media	0.4644	0.6075	0.8473	0.5329	0.4584	0.3638
Mediana	0.4490	0.6160	0.8715	0.5380	0.4420	0.3620
St. dev.	0.1697	0.1411	0.0862	0.1872	0.1638	0.1838
Mín	0.1260	0.2110	0.1300	0.0780	0.1120	0.0690
Q1	0.3320	0.5173	0.8428	0.3970	0.3443	0.2243
Q3	0.5637	0.7150	0.8910	0.6830	0.5493	0.4555
Máx	0.9040	0.8980	0.9060	0.8920	0.8890	0.8690

En conjunto, los diagramas de fase, las distribuciones KDE y los estadísti-

cos descriptivos mostraron resultados consistentes entre sí, permitiendo identificar diferencias morfológicas entre las líneas celulares analizadas. Estos resultados sugieren que la combinación de SC, circularidad y diagramas de fase constituye una herramienta útil para la caracterización y comparación de poblaciones de células adherentes.

4.5 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE LA METODOLOGÍA PROPUESTA

El análisis de figuras regulares permitió evaluar el comportamiento de distintos descriptores morfológicos bajo condiciones controladas. Entre las métricas analizadas, SC y circularidad mostraron un comportamiento complementario: SC aportó información sobre la complejidad y prominencia del contorno, mientras que la circularidad describió el grado de compactación de la forma. Esta combinación permitió representar diferencias morfológicas que no fueron capturadas adecuadamente por descriptores como la razón de aspecto. No obstante, métricas asociadas al tamaño, como el área y el perímetro, también pueden aportar información biológica relevante y no deben descartarse en análisis posteriores [82].

La comparación entre modalidades de microscopía mostró que el contraste de fases favorece la caracterización morfológica de células adherentes vivas, al mejorar la definición del contorno y facilitar la segmentación sin necesidad de tinción. Esta característica resulta importante porque permite preservar la viabilidad de la muestra y realizar observaciones no destructivas. Aunque existen otras técnicas ópticas no invasivas, como el contraste de interferencia diferencial (DIC) y la microscopía de campo oscuro [57], su desempeño en este tipo de análisis deberá evaluarse en trabajos futuros.

Los diagramas de fase construidos a partir de SC y circularidad permitieron relacionar la magnitud de los descriptores con la forma celular observada. La super-

posición de máscaras binarias facilitó la interpretación visual de las distribuciones morfológicas, mientras que las distribuciones KDE permitieron identificar regiones de mayor densidad dentro de cada población. En conjunto, estas herramientas permitieron describir tendencias morfológicas, explorar agrupamientos y comparar poblaciones celulares de distinto origen biológico sin recurrir a una clasificación supervisada.

La recopilación sistemática de estos descriptores podría servir para construir bases de referencia morfológica de distintas líneas celulares bajo condiciones experimentales definidas. Estas bases permitirían comparar réplicas independientes, evaluar la reproducibilidad experimental e identificar cambios asociados con variables como el medio de cultivo, la confluencia celular, el tiempo de incubación o la exposición a tratamientos. Por tanto, el análisis propuesto constituye una estrategia cuantitativa útil para el estudio morfológico de células adherentes vivas y puede integrarse en estudios longitudinales o comparativos orientados a relacionar la forma celular con procesos biológicos relevantes.

CAPÍTULO 5

CAMBIOS MORFOLÓGICOS DE CÉLULAS HUVEC: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE MIEL

Las células endoteliales HUVEC tienen la capacidad de generar estructuras tubulares que participan en la formación de vasos sanguíneos mediante el proceso de angiogénesis [83]. Debido a su papel en la neovascularización, diversos estudios han explorado estrategias para estimular este proceso mediante la suplementación del medio de cultivo con diferentes tipos y concentraciones de miel [84, 85]. No obstante, la información disponible sigue siendo limitada y aún no se ha establecido con claridad la concentración más adecuada para promover este efecto, ni el umbral a partir del cual pueden presentarse efectos citotóxicos.

En este contexto, en este capítulo se analiza la respuesta morfológica de células HUVEC sometidas a distintas concentraciones de miel. El propósito del estudio es identificar las condiciones que promueven la angiogénesis y evaluar la relevancia de los parámetros SC y circularidad para describir los cambios morfológicos asociados a este proceso, a través de los objetivos específicos que se detallan a continuación:

- Evaluar los cambios morfológicos de células HUVEC expuestas a diferentes

concentraciones de miel.

- Analizar la evolución temporal de los descriptores morfológicos a las 0, 24, 48 y 72 horas posteriores a la aplicación del tratamiento.
- Determinar si las métricas morfológicas y los diagramas de fase permiten identificar patrones asociados al deterioro celular o a posibles fenotipos de muerte celular.
- Complementar el análisis morfológico mediante un ensayo de viabilidad celular con azul tripán, a fin de relacionar los cambios observados en la forma celular con la presencia de efectos citotóxicos.

5.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para evaluar los cambios morfológicos inducidos por el tratamiento con miel, se utilizó la línea celular HUVEC. Se sembraron 2.5×10^3 células por pozo en placas de 24 pocillos y se incubaron durante 24 horas para permitir su adhesión al sustrato. Posteriormente, las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de miel en el medio de cultivo: 0.000 % (control), 0.250 %, 0.500 %, 0.750 %, 1.000 % y 1.500 %. Las muestras se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂, de acuerdo con las condiciones de cultivo establecidas en la sección 3.1.

Una vez aplicado el tratamiento, se obtuvieron micrografías para analizar la evolución morfológica de las células a lo largo del tiempo. Para cada concentración, se obtuvieron 20 micrografías a las 0, 24, 48 y 72 horas posteriores a la exposición a la miel. Durante este proceso, se cuidó que las células permanecieran fuera de la incubadora por menos de 45 minutos y que no fueran expuestas a la luz durante periodos prolongados. Al finalizar la adquisición de imágenes, las placas se devolvieron de inmediato a la incubadora. Las imágenes obtenidas fueron segmentadas y analizadas conforme a la metodología descrita en las secciones 3.4, 3.5.1 y 3.5.2.

Finalmente, se realizó un ensayo de viabilidad celular con azul tripán para evaluar si la exposición a miel producía efectos citotóxicos [86]. Para ello, tras 24 horas de tratamiento, se añadieron 10 μL de azul tripán a una fila completa de pocillos y se incubó durante 5 minutos. Posteriormente, se obtuvieron 20 micrografías, por concentración, de los pocillos teñidos. Este procedimiento se repitió a las 48 y 72 horas de incubación, utilizando únicamente pocillos que no habían sido teñidos previamente. Esta consideración fue necesaria porque, después de un día completo con azul tripán en el medio, no es posible determinar si la muerte celular observada se debe al tratamiento con miel o al efecto del tinte aplicado.

5.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 5.1 muestra imágenes representativas de las células HUVEC tras 72 horas de exposición a las diferentes concentraciones de miel evaluadas. De manera cualitativa, se observan diferencias en la morfología celular conforme aumenta la concentración del tratamiento. Para cuantificar estos cambios, se evaluaron diversos descriptores morfológicos, entre los cuales el área, la circularidad y la complejidad de forma resultaron ser los más sensibles a las variaciones inducidas por la miel.

5.2.1 CAMBIOS MORFOLÓGICOS DERIVADOS DEL TRATAMIENTO

La Tabla 5.1 resume los valores promedio de área, circularidad y SC obtenidos para cada concentración de miel y tiempo de exposición, así como el nivel de significancia estadística respecto al grupo control.

En la medición inicial (0 horas), las células con concentraciones mayores o iguales al 0.750 % mostraron una disminución significativa en el área. La morfología, sin embargo, no mostró diferencias significativas en circularidad; solo las concentraciones de 0.750 % y 1.500 % mostraron diferencias significativas en SC. Se puede observar

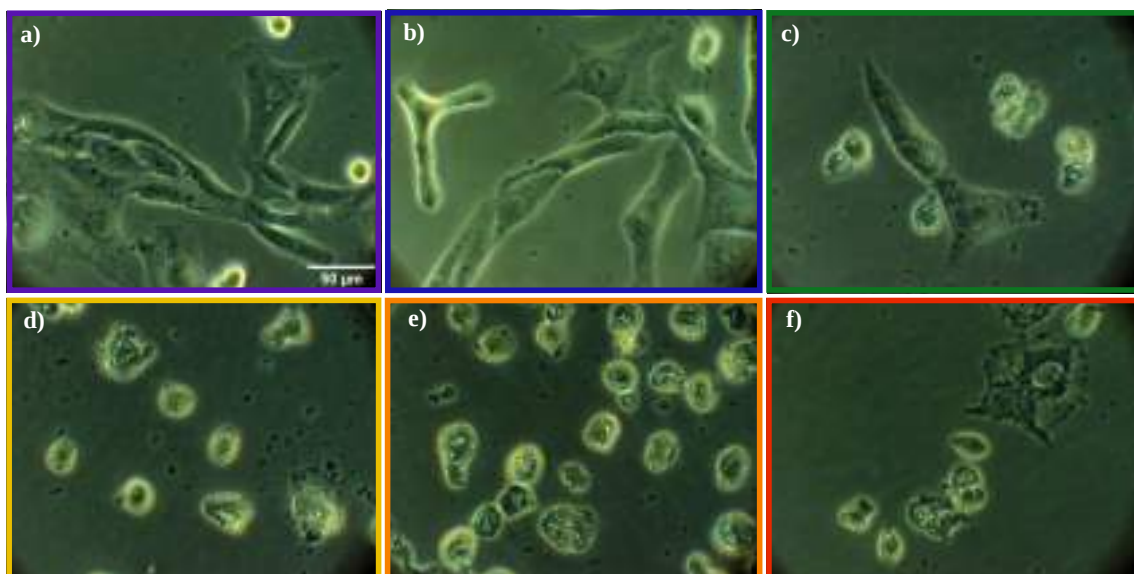


FIGURA 5.1: Imágenes representativas de células HUVEC tras 72 horas de exposición a miel en las siguientes concentraciones: a) 0.000 % (control), b) 0.250 %, c) 0.500 %, d) 0.750 %, e) 1.000 % y f) 1.500 %.

este comportamiento en la Figura 5.2a y e.

Después de 24 horas de la aplicación de la miel, las células con la concentración de 0.750 % continuaron disminuyendo su área respecto al control y mostraron diferencias estadísticamente significativas tanto en SC como en circularidad. En todos los casos, el área y el SC disminuyeron, mientras que la circularidad aumentó (Figura 5.2b y f).

Tras 48 horas, se mantuvieron las diferencias altamente significativas en el área a partir de 0.750 % de miel. La circularidad disminuyó significativamente para la concentración de 0.250 % y aumentó muy significativamente a partir de 0.500 %. La métrica SC disminuyó muy significativamente a partir de 0.500 % de miel. En la Figura 5.2c y g vemos como los fenotipos morfológicos de las concentraciones 0.750 % difieren cada vez más del control.

Finalizadas las 72 horas de exposición, todas las concentraciones mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control en las tres métricas.

TABLA 5.1: Métricas promedio de área, circularidad y SC de cada concentración a través del tiempo. Se indica el nivel de significancia de los cambios respecto al control.

Métrica	Concentración(%)	0 h	24 h	48 h	72 h
Área (μm^2)	0.000	1453.22	1365.81	1340.52	1219.18
	0.250	1521.28	1304.85	1403.49 *	1599.10 ***
	0.500	1333.28**	1201.82***	1163.23 ***	748.07 ***
	0.750	1185.91**	1067.24 ***	707.63***	504.24 ***
	1.000	1253.94*	840.92 ***	640.04 ***	523.80 ***
	1.500	1022.59***	620.57 ***	525.94 ***	533.36 ***
Circularidad	0.000	0.6074	0.5511	0.5633	0.5574
	0.250	0.5826	0.5694	0.5089**	0.5093**
	0.500	0.5989	0.5878	0.6120*	0.7420***
	0.750	0.6392	0.6587***	0.8008***	0.7891***
	1.000	0.6382	0.7131***	0.7921***	0.7847***
	1.500	0.6071	0.7625***	0.7850***	0.7289***
SC	0.000	61.3721	57.7393	58.2581	57.7303
	0.250	62.8606	52.8395*	64.1002*	66.4085**
	0.500	62.4565	55.2448	61.1530	52.7618*
	0.750	54.6538*	50.6757**	41.8854***	45.8386***
	1.000	57.3577	47.7765***	43.1359***	44.7887***
	1.500	54.3239*	47.1296**	41.4848***	50.7765**

Sin embargo, la concentración 0.250 % mostró un comportamiento distinto al resto de los tratamientos, caracterizado por un incremento del área y el SC, acompañado de una disminución de la circularidad. Esto implica que las células se encontraban mas extendidas. Cualitativamente, este grupo mostró mas contacto entre células y la formación de filas y espirales; estos patrones han sido asociados con el proceso de angiogénesis.

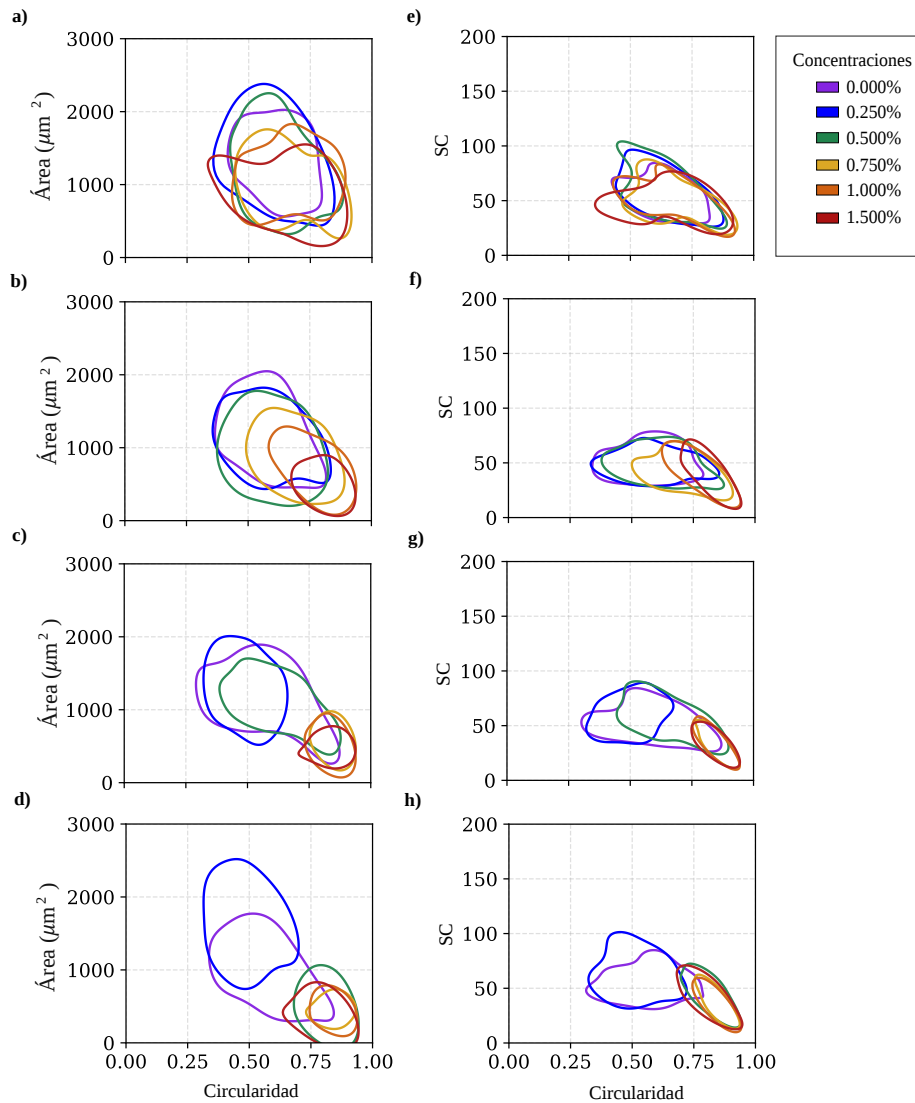


FIGURA 5.2: Gráficas de KDE de área vs circularidad tras a) 0, b) 24, c) 48 y d) 72 horas y gráficas SC vs circularidad tras e) 0, f) 24, g) 48 y h) 72 horas de tratamiento. Se filtraron los datos para mostrar los cuartiles Q1-Q3.

Por el contrario, las concentraciones iguales o superiores al 0.500%, mostraron una disminución progresiva del área y de la complejidad de forma, acompañada por un incremento de la circularidad. Como se observa en la Figura 5.2d y h, estas concentraciones dieron lugar a distribuciones morfológicas claramente diferenciadas del grupo control. Cualitativamente, las células con estas concentraciones de miel tenían una textura granular y se observó la formación de cuerpos apoptóticos, ca-

racterísticas morfológicas comúnmente asociadas con procesos de muerte celular. Estas observaciones son consistentes con los cambios cuantitativos observados en las métricas morfológicas y sugieren la presencia de daño celular y posible pérdida de viabilidad. Estos resultados indican que las métricas morfológicas y los diagramas de fase permiten distinguir poblaciones celulares con características compatibles con citotoxicidad.

5.2.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CÉLULAS VIABLES Y NO VIABLES

Con el fin de evaluar si los cambios morfológicos observados estaban asociados con una disminución de la viabilidad celular, se realizó un ensayo de tinción con azul tripán. Las células teñidas se consideraron células muertas, mientras que las células sin teñir se clasificaron como vivas. La Figura 5.3 muestra imágenes representativas obtenidas tras la tinción; los círculos rojos señalan ejemplos de células positivas al azul tripán.

Asimismo, se determinó el porcentaje de células muertas para cada concentración y tiempo de exposición. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 5.2. En general, las concentraciones iguales o superiores a 0.500 % presentaron porcentajes de muerte celular mayores que los observados en el grupo control. Las concentraciones de 0.750 %, 1.000 % y 1.500 % mostraron consistentemente los valores más altos de mortalidad celular durante el periodo de estudio.

Al analizar las distribuciones de área y SC *versus* circularidad de las células vivas (Figura 5.4), se observa que las tendencias identificadas en el experimento anterior se conservan tras la tinción con azul tripán. En particular, para las concentraciones de miel mayores o iguales al 0.750 %, el área y el SC disminuyen, y la circularidad aumenta significativamente tras 72 horas de la aplicación. De la misma manera que en el experimento anterior, en las células con 0.250 % de miel el área

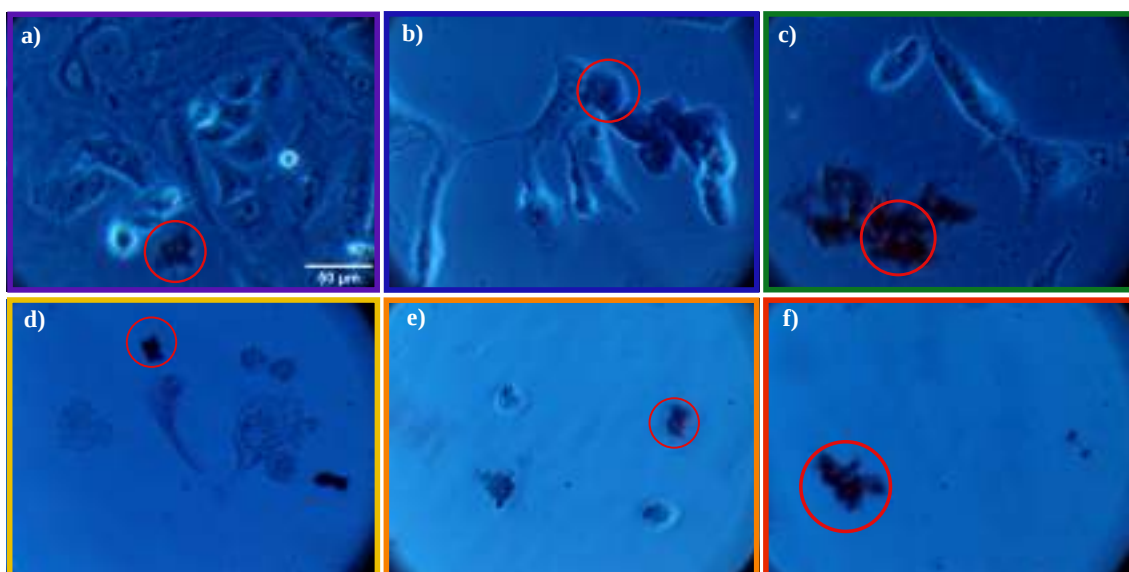


FIGURA 5.3: Imágenes representativas de células HUVEC teñidas con azul tripán tras 72 horas de tratamiento con miel en concentraciones de: a) 0.000 % (Control), b) 0.250 %, c) 0.500 %, d) 0.750 %, e) 1.000 % y f) 1.500 %. Los círculos resaltan ejemplos de células positivas al azul tripán.

TABLA 5.2: Porcentaje de células positivas al azul tripán para cada concentración

de miel y tiempo de exposición.

Concentración(%)	24 h (%)	48 h (%)	72 h (%)
0.000	50.00	35.91	26.89
0.250	48.17	41.31	43.07
0.500	64.11	39.02	53.00
0.750	76.33	72.22	61.32
1.000	67.45	87.25	57.39
1.500	80.58	75.75	75.00

aumenta significativamente.

En cambio, las células muertas muestran el mismo fenotipo morfológico en todas las concentraciones de miel, pues ningún grupo muestra diferencias significativas

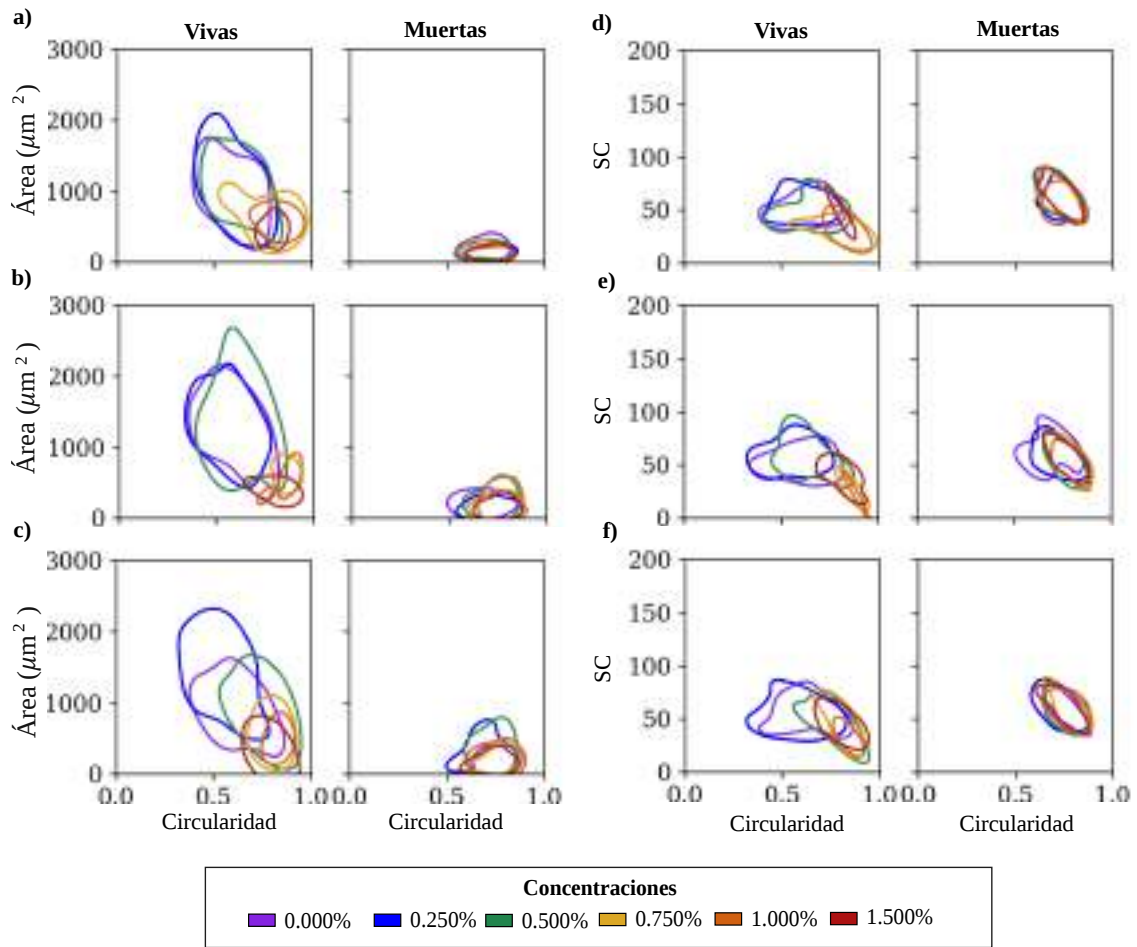


FIGURA 5.4: Gráficas de área vs circularidad tras a) 24, b) 48 y c) 72 horas y gráficas SC vs circularidad tras d) 24, e) 48 y f) 72 horas de células vivas y muertas de cada concentración. Se filtraron los datos para mostrar los cuartiles Q1-Q3.

en SC, Circularidad o área respecto al control. Las células se agrupan en la parte de la gráfica correspondiente a morfologías poligonales y circulares.

Comparando la morfología de las células vivas y muertas, notamos que las células muertas tienden a ser más circulares y significativamente más pequeñas que las células vivas. En las gráficas de la Figura 5.4a-c, notamos que las células muertas en todas las concentraciones presentan áreas menores a $1000 \mu\text{m}^2$, mientras que las células vivas con concentraciones menores o iguales a 0.250% de miel pueden alcanzar las $2500 \mu\text{m}^2$.

Además, a pesar de no ser teñidas por el azul tripán, las células con concentraciones de miel iguales o mayores al 0.250 % muestran áreas debajo de $1000 \mu\text{m}^2$ y circularidad > 0.5 . Esto sugiere que, a pesar de seguir vivas, las células tratadas con estas concentraciones de miel muestran un fenotipo morfológico diferente al esperado, lo que evidencia que los cambios inducidos por el tratamiento pueden manifestarse antes de que ocurra una pérdida detectable de viabilidad celular.

En los diagramas de fases de la Figura 5.5, podemos observar con más detalle las diferencias entre células vivas y muertas, donde las poblaciones de células vivas y muertas ocupan regiones distintas del espacio morfológico. Estos resultados indican que la combinación de área, SC, circularidad y diagramas de fase permite distinguir fenotipos asociados con la pérdida de viabilidad celular.

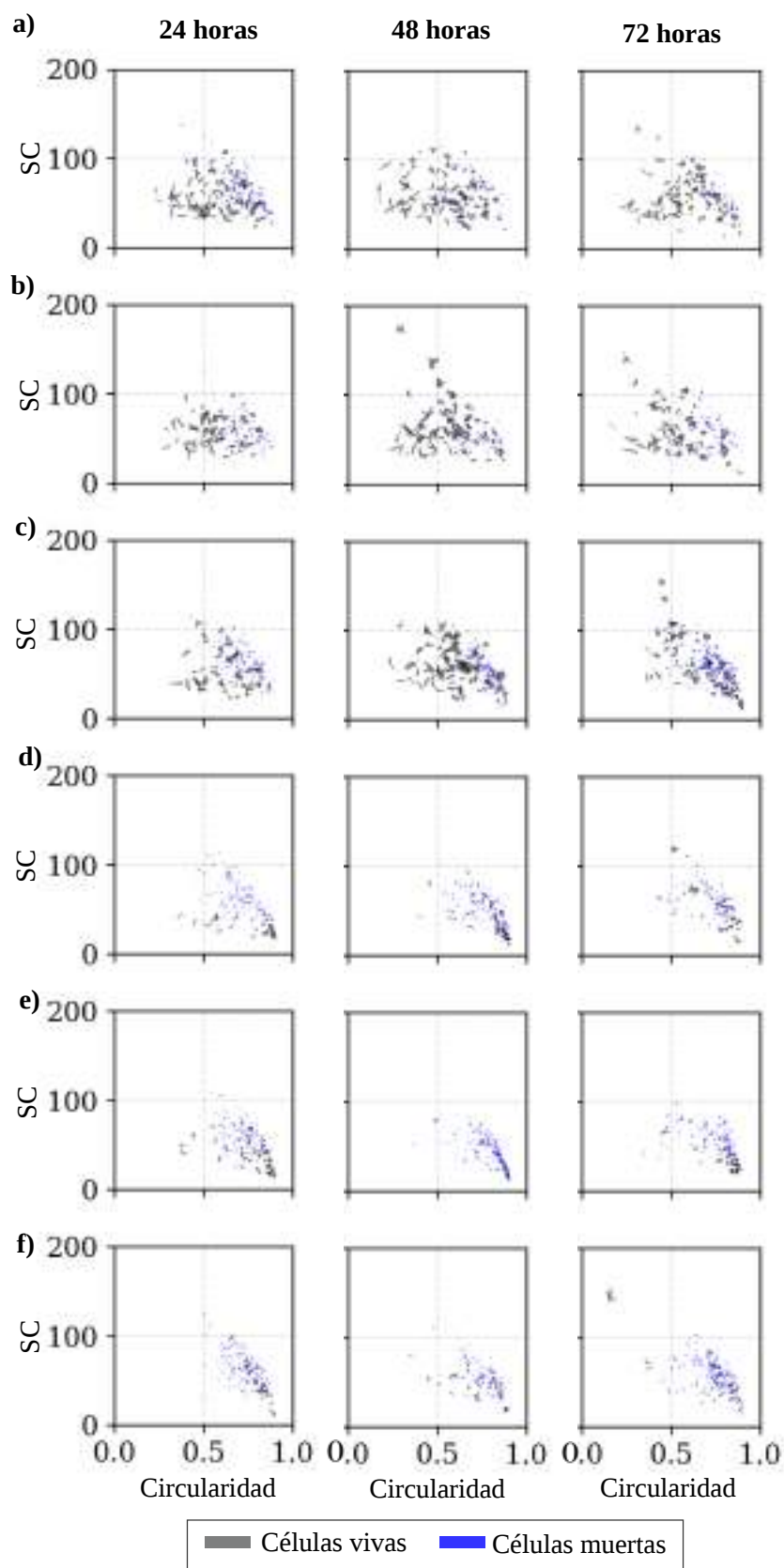


FIGURA 5.5: Gráficas de SC vs Circularidad para todas las células HUVEC y muertas para concentraciones de miel de a) 0.000 %, b) 0.250 %, c) 0.500 %, d) 0.750 %, e) 1.000 % y f) 1.500 %.

5.3 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DEL COMPORTAMIENTO MORFOLÓGICO

El tratamiento con 0.250 % de miel produjo una respuesta morfológica distinta de las demás concentraciones evaluadas. A las 72 horas, las células HUVEC expuestas a esta concentración mostraron un incremento en el área y en la complejidad de forma, con valores promedio de $SC = 66.4085$ y $circularidad = 0.5093$. Además, conservaron morfologías principalmente elípticas y poligonales, así como patrones de contacto y organización celular compatibles con la angiogénesis [83].

En contraste, las concentraciones iguales o superiores al 0.500 % se asociaron con una disminución del área y de SC , acompañada por un aumento de la circularidad. Estos cambios indican una transición hacia células más pequeñas, compactas y menos complejas, consistente con daño celular. Esta interpretación fue respaldada por el ensayo de azul tripán, en el que dichas concentraciones presentaron porcentajes de células no viables entre 53 % y 75 % a las 72 horas.

Las células no viables ocuparon regiones morfológicas similares independientemente de la concentración aplicada, caracterizadas por áreas reducidas, mayor circularidad y morfologías predominantemente poligonales o redondeadas. En promedio, su área fue de $305.6742 \mu\text{m}^2$, menor que la observada en células vivas del grupo control y en células tratadas con 0.250 % de miel. Esto indica que los descriptores morfológicos permiten diferenciar poblaciones asociadas con pérdida de viabilidad.

En conjunto, el uso del área, SC , circularidad, diagramas de fase y distribuciones KDE permitió describir la evolución morfológica de células HUVEC expuestas a miel y comparar su respuesta entre concentraciones y tiempos de exposición. Como perspectiva, este análisis podría emplearse para evaluar tratamientos, identificar efectos citotóxicos y relacionar cambios morfológicos con procesos asociados a la viabilidad.

CAPÍTULO 6

ESTUDIO SIMULTÁNEO DE LA MORFOLOGÍA Y VISCOELASTICIDAD DE CÉLULAS MG63

La morfología celular se ha relacionado con diversos procesos biológicos en células cancerosas, como la migración y el potencial metastásico [43, 44, 45, 46]. De manera similar, las propiedades mecánicas, como la rigidez y la respuesta viscoelástica, se han empleado para evaluar cambios asociados con el grado de malignidad celular [48, 47, 15]. No obstante, estas propiedades físicas suelen analizarse de manera independiente, aunque estudios recientes sugieren que podrían estar relacionadas [18, 87].

En este capítulo se estudia de manera simultánea la morfología y la respuesta viscoelástica de células MG63. Para ello, se realizaron ensayos de fuerza-relajación mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) y se adquirieron micrografías ópticas de las mismas células indentadas, utilizando un arreglo experimental que acopla un AFM con un microscopio óptico invertido. Los parámetros morfométricos se obtuvieron mediante el análisis de imagen descrito en la sección 3.4, mientras que las propiedades mecánicas y viscoelásticas se estimaron a partir del ajuste de las curvas experimentales a los modelos de Sneddon, FK y FZ, conforme a lo indicado en la

sección 3.5.3.

El propósito de este estudio es evaluar si las características morfológicas de células MG63 se relacionan con sus parámetros mecánicos y viscoelásticos, así como analizar si esta relación depende de la velocidad de indentación. Para ello, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Obtener parámetros morfológicos y viscoelásticos de células MG63 mediante un arreglo experimental que combina microscopía óptica y AFM.
- Agrupar células MG63 de acuerdo con sus características morfológicas y comparar sus parámetros mecánicos y viscoelásticos.
- Evaluar la influencia de la morfología celular sobre parámetros como el módulo de Young y los parámetros derivados de los modelos FK y FZ.
- Analizar el efecto de la velocidad de indentación sobre la respuesta mecánica y viscoelástica de las células MG63.
- Explorar posibles relaciones entre los descriptores morfológicos y los parámetros viscoelásticos obtenidos en las mismas células.

6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se empleó la línea celular MG63 como modelo de estudio. Las células se sembraron e incubaron durante 24 horas antes de realizar las mediciones, de acuerdo con las condiciones descritas en la sección 3.1. Durante los experimentos de AFM, las células se mantuvieron en su medio de cultivo para preservar sus condiciones fisiológicas.

Se realizaron ensayos de fuerza-relajación y se adquirieron micrografías de las células indentadas, conforme al procedimiento descrito en la sección 3.3. Para definir la muestra experimental, se realizó una inspección visual con el fin de seleccionar

células con morfologías representativas. A partir de esta observación, se eligieron 24 células individuales y se organizaron en tres grupos según sus características morfológicas.

El tamaño de la muestra es consistente con estudios de AFM realizados en células individuales, ya que esta técnica requiere tiempos prolongados de medición y una alta demanda experimental en términos de alineación, adquisición y procesamiento de datos [88, 76].

6.2 CLASIFICACIÓN CON MÉTRICAS MORFOLÓGICAS

En la Figura 6.1 se muestran las 24 células analizadas, etiquetadas del 1 al 24 en orden ascendente de SC (Eq. (2.16)). Las células se categorizaron en tres grupos en base a este valor y los límites de cada grupo se definieron de manera empírica por la distribución de SC observada y las transiciones morfológicas visualmente aparentes. Los grupos resultantes se definieron de la siguiente manera. Grupo I ($SC < 60$), Grupo II ($60 < SC < 90$), y Grupo III ($SC > 90$), mostrados en azul, verde y rojo, respectivamente.

Las células con $SC < 60$ son predominantemente redondas, muestran una alta circularidad (0.77 ± 0.19), una razón de aspecto baja ($1.031\text{--}1.482$) y una solidez alta ($0.85\text{--}0.978$); estos valores confirman que son compactas e isótropas. Cabe destacar que todas las células en este grupo tienen un $SC \leq 59$, por lo que $SC = 60$ es un límite consistente antes de los cambios estructurales abruptos observados en la célula 8. Una excepción a la regla es la célula 7, la cual se incluye en este grupo por su $SC = 58.7$, exhibe menor circularidad y es más alargada que el resto de las células de este grupo. De acuerdo con su morfología, podría clasificarse dentro del Grupo II; no obstante, se conserva en el Grupo I debido a su SC .

Las células en el Grupo II muestran características alargadas e irregulares. En este grupo, las células presentan una disminución pronunciada en circularidad

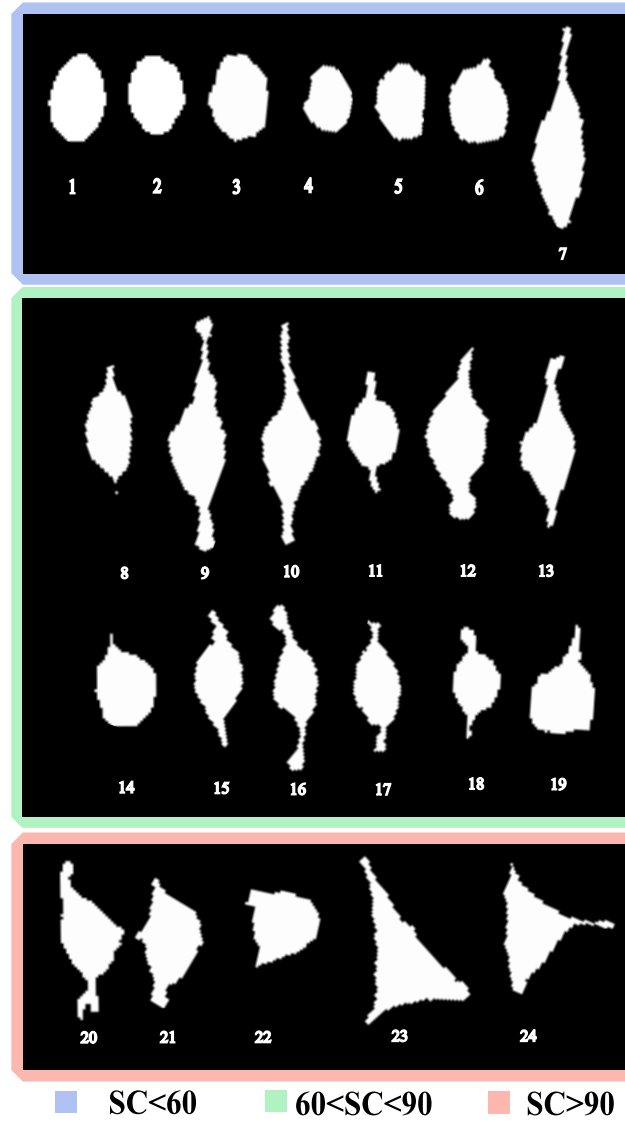


FIGURA 6.1: Contorno de las células MG63 observadas, ordenadas por su SC y clasificadas con colores $SC < 60$ (azul), $60 < SC < 90$ (verde), y $SC > 90$ (rojo).

(0.40 ± 0.13 comparada con 0.77 ± 0.19 en el Grupo I), un aumento en la razón de aspecto (2.59 ± 0.87 comparado con 1.47 ± 0.78), y mayores perímetros ($118 \mu\text{m}$ comparado con $73 \mu\text{m}$). Estos descriptores indican que el Grupo II corresponde a una etapa intermedia, en la cual las células pierden su morfología redonda, pero aun no alcanzan la complejidad de las células observadas con $SC > 90$.

Para las células en el Grupo III, la clasificación presenta una discontinuidad aparente en la complejidad de forma. Mientras que el Grupo II se extiende hasta

la célula 19 con $SC \approx 84$, la siguiente célula 20 presenta un valor de SC cercano a 98, lo cual justifica aumentar el límite a 90. Esta transición también se observa en los demás descriptores morfológicos; comparado con el Grupo II, las células en este grupo presentan un mayor perímetro ($126 \mu\text{m}$ vs. $118 \mu\text{m}$), solidez reducida (0.72 ± 0.13 vs. 0.78 ± 0.08) y circularidad baja (0.41 ± 0.14).

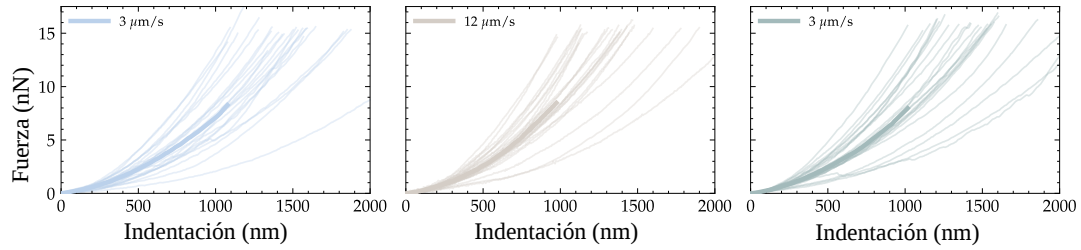
6.3 INFLUENCIA DE LA FORMA EN LAS PROPIEDADES MECÁNICAS

Para evaluar la influencia de la forma de las células en sus propiedades mecánicas, los datos obtenidos del ajuste de 24 curvas de fuerza-distancia (Figura 6.2 a) y fuerza-relajación (Figura 6.2 b) para cada velocidad de indentación se agruparon conforme a su clasificación por SC mostrado en la Figura 6.1. Se realizó un análisis estadístico para identificar diferencias significativas entre los tres grupos.

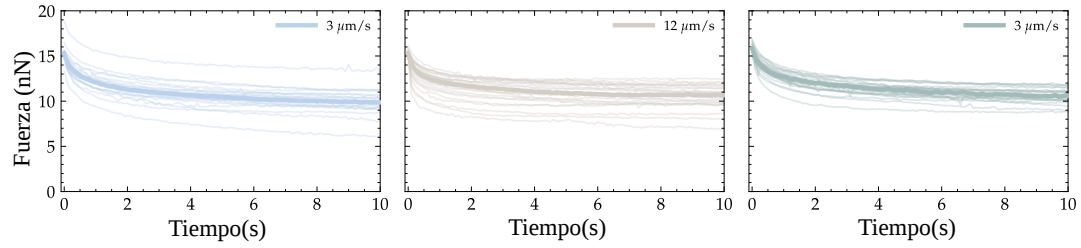
La Figura 6.3 Muestra la mediana del modulo de Young para los tres grupos. Los valores se obtuvieron ajustando las curvas de fuerza-distancia a la ecuación (2.30). El valor de E Para las células en los grupos II y III es mayor que el de las células del grupo I en todas las velocidades de indentación; esto indica que las células con un SC mas alto son más rígidas. Sin embargo, solo hay diferencias estadísticamente significativas en la primera y tercera indentación.

6.3.1 MODELO FRACCIONAL DE KELVIN

La Figura 6.4 muestra las medianas de los parámetros E_{1K} y α_K para los tres grupos a diferentes velocidades de indentación. Estos valores se obtuvieron ajustando las curvas de fuerza-relajación a la (2.36). Para todas las velocidades de indentación, E_{1K} es mas alto en los grupos II y III comparado con los del grupo I. Este resultado



(a) Curvas de Fuerza-Distancia



(b) Curvas de Fuerza-Relajación.

FIGURA 6.2: Gráficas de las a) curvas de Fuerza-Distancia y b) de Fuerza-Relajación obtenidas a las velocidades de indentación utilizadas en este trabajo; la región sombreada representa todas las curvas y la curva resaltada la mediana.

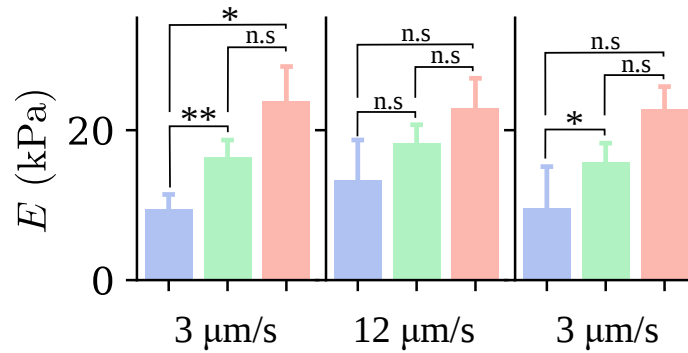


FIGURA 6.3: Gráficas de barras de las medianas del módulo de Young de cada célula identificada, para las tres velocidades de indentación con colores indicando el grupo como en la Figura 6.1. Se indica la velocidad de indentación correspondiente en la parte inferior de la gráfica.

confirma lo observado anteriormente con el módulo de Young: un valor mayor de SC corresponde a mayor rigidez. Aun así, las diferencias estadísticamente significativas solo están presentes en la primera y tercera indentación.

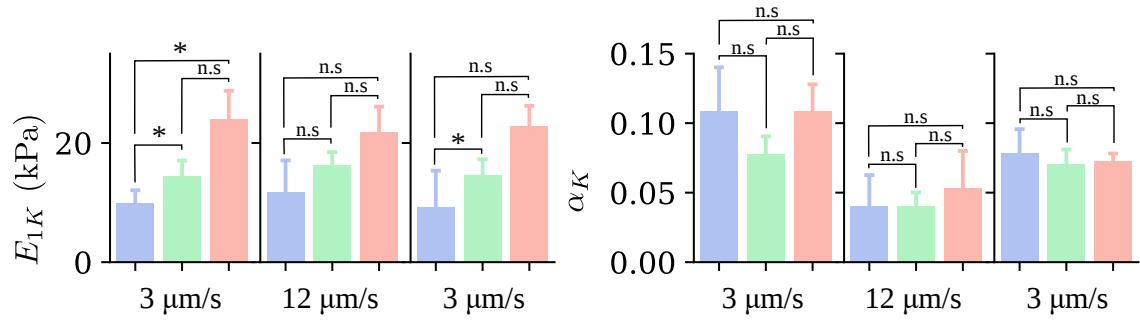


FIGURA 6.4: Gráficas de barras de las medianas de los valores obtenidos por medio del ajuste de las curvas al modelo FK para cada grupo de células identificado, para las tres velocidades de indentación con colores indicando el grupo como en la Figura 6.1. Se indica la velocidad de indentación correspondiente en la parte inferior de la gráfica.

Respecto al parámetro α_K , no hay un patrón claro, sugiriendo que la forma de la célula no tiene influencia sobre él. Además, en la tercera indentación, las diferencias entre los grupos son indistinguibles.

6.3.2 MODELO FRACCIONAL DE ZENER

La Figura 6.5 presenta las medianas de los parámetros E_{0Z} , E_{1Z} , τ_Z , y α_Z para cada grupo de células y velocidades de indentación. Estos valores se obtuvieron ajustando las curvas de fuerza-relajación a la ecuación (2.35). Respecto al parámetro E_{0Z} , en la primera indentación, los valores para los grupos II y III son más altos que los del grupo I, indicando que las células en el grupo I son más deformables, con diferencias estadísticamente significativas observadas solamente entre los grupos I y II. Este comportamiento se conserva en las demás indentaciones; sin embargo, las diferencias no son estadísticamente significativas.

La tendencia de los valores obtenidos para el parámetro E_{1Z} indica que la rigidez en los grupos II y III es mayor que la del grupo I. Por tanto, las células con un mayor SC son más rígidas. Sin embargo, las diferencias no son estadísticamente significativas. Este comportamiento es consistente en las tres velocidades de

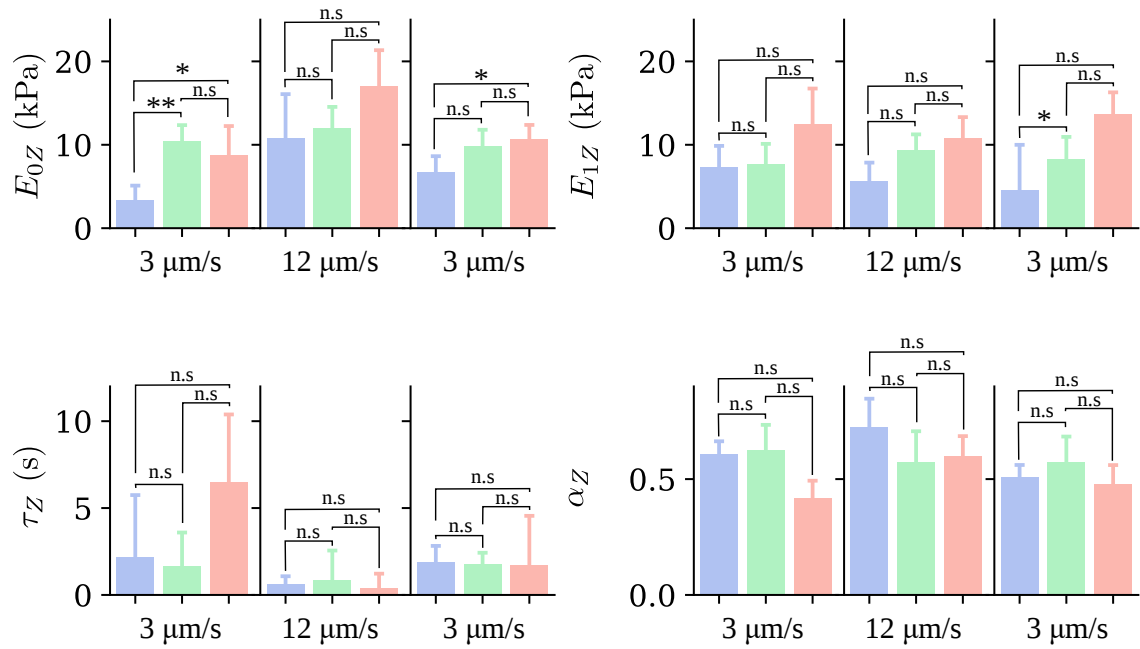


FIGURA 6.5: Gráficas de barras de las medianas de los valores obtenidos por medio del ajuste de las curvas al modelo FZ para cada grupo de células identificado, para las tres velocidades de indentación con colores indicando el grupo como en la Figura 6.1. Se indica la velocidad de indentación correspondiente en la parte inferior de la gráfica indentación.

El parámetro τ_Z aparenta ser mayor en el grupo III en la primera indentación. Sin embargo, estos datos tienen una dispersión alta y las diferencias no son estadísticamente significativas. En la segunda y tercera indentación, los valores de los tres grupos son similares. Para el parámetro α_Z , las células en el tercer grupo muestran valores menores, indicando mayor rigidez. Sin embargo, este comportamiento solo se presenta en la primera indentación. Para la segunda y tercera indentación no hay un patrón evidente.

TABLA 6.1: Aumento ($\uparrow$) o disminución ($\downarrow$) porcentual en parámetros mecánicos

para la segunda y tercera curva de cada grupo de células relativo a la mediana de los valores para la primera indentación. Los valores con un aumento o disminución de más del 25 % se marcaron de la siguiente manera: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

		SC < 60		60 < SC < 90		SC > 90	
Parámetro	Curva #	2	3	2	3	2	3
E [kPa]		41 $\uparrow$	—	—	—	—	—
E_{1K} [kPa]		—	—	—	—	—	—
E_{0Z} [kPa]		201 $\uparrow$	98 $\uparrow$	—	—	94 $\uparrow$	—
E_{1Z} [kPa]		—	37 $\downarrow$	—	—	—	—
α_K		63 $\downarrow$ *	28 $\downarrow$	49 $\downarrow$ **	—	52 $\downarrow$	33 $\downarrow$
τ_Z [s]		74 $\downarrow$ *	—	34 $\downarrow$ **	—	95 $\downarrow$	85 $\downarrow$
α_Z		—	—	—	—	42 $\uparrow$	—

6.4 INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE INDENTACIÓN EN LAS PROPIEDADES MECÁNICAS

Para aclarar el efecto de la velocidad de indentación en la respuesta de la célula e identificar los parámetros que la describe, se realizó una comparación entre las diferentes indentaciones. Esta comparación se realizó entre los grupos de células y entre todas las células de la muestra.

6.4.0.1 DESCRIPCIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LOS PARÁMETROS ELÁSTICOS

Los parámetros que miden las propiedades elásticas de las células incluyen el módulo de Young (E) en el modelo de Sneddon, E_{1k} en el modelo FK y E_{0Z} y E_{1Z} en el modelo FZ. La tabla 6.1 muestra un análisis por grupo, mostrando el cambio porcentual en estos parámetros relativo a la primera indentación. El efecto de la velocidad de indentación sobre los parámetros elásticos varió entre los modelos. En la segunda indentación, cuando se aumento la velocidad, el parámetro E aumentó 39 % en células del grupo I, mientras que los demás grupos aumentaron por debajo del 25 %. Los parámetros E_{1K} y E_{1Z} , correspondientes a los modelos FK y FZ respectivamente, mostraron cambios menores a 25 % en todos los grupos. De manera contraria, en el modelo FZ, el parámetro E_{0Z} aumento 94 % o más en los grupos I y III. A pesar de que algunos grupos mostraron cambios notorios, estos no fueron estadísticamente significativos. Para la tercera indentación, el cambio en los parámetros elásticos fue menor que 25 % excepto por el parámetro E_{1Z} , el cual disminuyó 31 % comparado con la primera indentación.

La Figura 6.6 representa el comportamiento de los parámetros elásticos observados en grupos individuales, lo cual se refleja también en el análisis de todas las células. Para la segunda indentación, E presenta cambios notorios ($p = 0.06$); E_{1K} tiene un cambio prácticamente constante; E_{0Z} muestra los cambios más grandes, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.005$) mientras que E_{1Z} se mantiene casi constante, con un pequeño aumento en el valor promedio comparado con el parámetro E_{1K} . Las diferencias entre la primera y tercera indentación no son significativas.

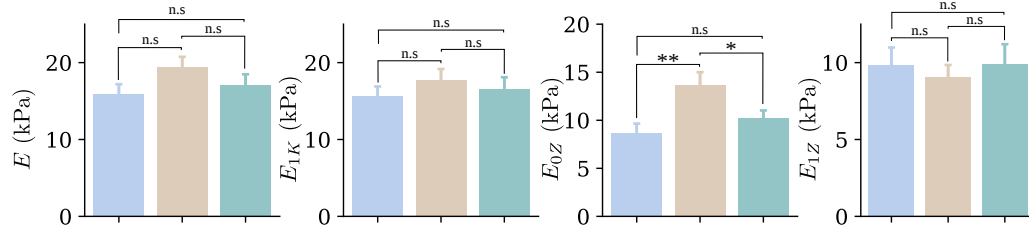


FIGURA 6.6: Gráficas de barras de los valores promedio del módulo de Young y de los parámetros elásticos en los modelos FK y FZ, obtenidos de toda la población de células para las indentaciones obtenidas a las velocidades de 3 $\mu\text{m/s}$ (azul), 12 $\mu\text{m/s}$ (beige) y 3 $\mu\text{m/s}$ (verde).

6.4.0.2 DESCRIPCIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LOS PARÁMETROS VIS-COSOS

La viscosidad de las células en el modelo FK se determina con el parámetro α_K , mientras que en el modelo FZ esta gobernado por los parámetros τ_Z y α_Z . La tabla 6.1 presenta un análisis grupo por grupo de estos parámetros. Para la segunda indentación los parámetros α_K y τ_Z disminuyeron significativamente, con cambios por encima de 50 % en la mayoría de los grupos. Respecto al parámetro α_Z , solamente el grupo III mostró un aumento de 42 % comparado con el valor inicial, el resto no mostró cambios. Para la tercer indentación los parámetros α_K y τ_Z regresaron a sus valores iniciales parcialmente. En los grupos I y II, los cambios fueron menores que 25 %. Para el tercer grupo los cambios excedieron los de los demás pero se mantuvieron por debajo de los observados en la segunda indentación. Respecto al parámetro α_Z , el cambio no excedió 25 %.

La Figura 6.7 muestra que el comportamiento de los parámetros viscosos observados en grupos individuales también se ve reflejado en el análisis de toda la población de células. En la segunda indentación los parámetros α_K y τ_Z disminuyen significativamente, $p < 0.005$. En la tercer indentación estos parámetros regresan parcialmente a los valores iniciales. Cabe resaltar que la diferencia entre la primera y tercera indentación no son estadísticamente significativas.

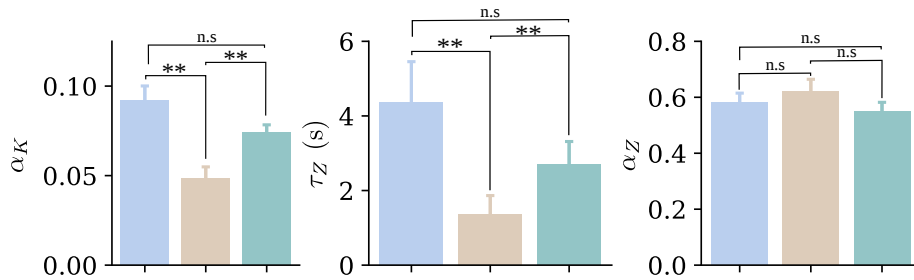


FIGURA 6.7: Valores promedio de los parámetros viscosos en los modelos FK y FZ, obtenidos de toda la población de células para las indentaciones obtenidas a las velocidades de $3 \mu\text{m/s}$ (azul), $12 \mu\text{m/s}$ (beige) y $3 \mu\text{m/s}$ (verde).

6.5 DISCUSIÓN

Al organizar las células por su métrica SC (véase la Figura 6.1), las células con valores por debajo de 60 exhiben formas elípticas o redondas con pocos lóbulos o ausentes de ellos, alargándose a medida que el SC se aproxima a 60. Para los valores de $60 < SC \leq 90$, las células exhiben lóbulos más largos o más pronunciados, con apariencias fusiformes que se vuelven más cortas a medida que el SC aumenta. Las células con SC cercano a 90 aparentan la forma de una D, mientras que aquellas con $SC > 90$ tienen formas triangulares con lóbulos pronunciados.

La figura Figura 6.8 muestra el diagramas de fase de las células separado por los grupos identificados. Para valores de $SC < 60$ y circularidad > 0.6 las células exhiben formas circulares con contornos suaves. A medida que la circularidad disminuye ($0.4 < \text{circularidad} < 0.6$), las células muestran cuerpos redondos con lóbulos cortos; para el grupo II ($60 < SC < 90$) muestran dos lóbulos. A medida que la circularidad disminuye (circularidad > 0.4) las células se vuelven más alargadas con dos o más lóbulos pronunciados. Finalmente, para el grupo III ($SC > 90$) y circularidad < 0.4 las células exhiben formas triangulares con lóbulos más pronunciados.

El uso de la circularidad en conjunto con el SC da mayor claridad sobre las clasificación morfológica de las células. Por ejemplo,separa la célula 7 de las demás

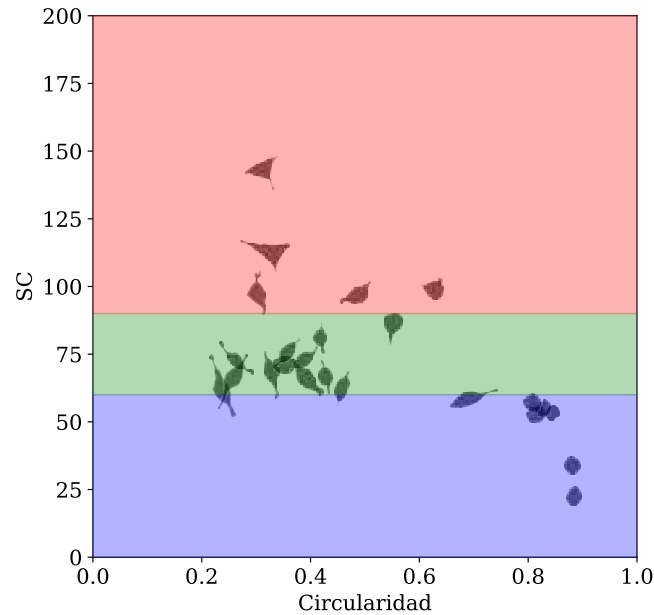


FIGURA 6.8: Diagrama de fases SC vs Circularidad dividido por los grupos identificados en la Figura 6.1.

en el grupo I debido a su elongación. De manera similar, separa las células en forma de D de las células triangulares en el grupo III. Por estos motivos, aunque no tuvo correlación alguna con las propiedades mecánicas de las células, se sigue considerando a esta métrica de gran utilidad para estudiar la variedad morfológica de la muestra.

En cuanto a su relevancia biológica en células cancerosas, la descripción obtenida a partir del SC puede ser adecuada para explorar procesos como la transición epitelial a mesenquimal (EMT). Esta se denota por cambios pronunciados en la forma de las células, entre los cuales se encuentra la aparición de protuberancias [89]. Por su capacidad de capturar aspectos relacionados a los lóbulos, la métrica SC es un descriptor morfológico prometedor; aún así, su aplicación y relevancia biológica deberá seguir siendo estudiada en trabajos futuros.

Al examinar las propiedades mecánicas de las células utilizando AFM se observa ocasionalmente que, incluso dentro de la misma celular, se observen diferentes profundidades de indentación a la misma velocidad, esto resalta la heterogeneidad

de las células [72]. Las propiedades mecánicas y la morfología de las células se ven influenciada por la composición del citoesqueleto [90, 91]. Por consiguiente, aclarar los factores que contribuyen a las diferencias en la respuesta celular al estrés mecánico o la deformación puede lograrse al estudiar la respuesta mecánica y la morfología de las células de manera simultánea.

Al agrupar las células por su valor de SC, se observa una tendencia clara en los parámetros elásticos en los diferentes modelos mecánicos utilizados. Específicamente, las células más alargadas o con lóbulos más pronunciados tienden a ser más rígidas que las circulares (véase Figura 6.3, 6.4 y 6.5). Esta relación entre el valor de SC y la respuesta mecánica de las células MG63 indica que el SC podría ser un descriptor útil para organizar la variabilidad morfológica que pueda estar asociada con las propiedades mecánicas de las células.

A pesar de que no se tomaron mediciones relacionadas con el citoesqueleto en este trabajo, estudios previos demuestran que la remodelación del citoesqueleto está relacionada con la forma, polaridad y rigidez de las células. En particular, la sobreexpresión de la vimentina ha demostrado aumentar la rigidez celular en modelos de cáncer epitelial [92, 90] y la reorganización de la vimentina está asociada con cambios en la forma y polaridad durante la transición EMT [91].

Estos reportes sugieren que la métrica SC puede ser un descriptor relevante para los estudios que busquen examinar la morfología, respuesta mecánica y estructura del citoesqueleto en conjunto. Sin embargo, queda sin definir si la relación entre la métrica SC y la rigidez se observa solamente en las células MG63 o si también está presente en otras líneas celulares cancerosas y sanas. Además, sería de gran valor evaluar la métrica SC junto con experimentos complementarios como la inmunofluorescencia y las perturbaciones al citoesqueleto, incluyendo la modulación farmacológica de actina y tubulina [93].

En cuanto a los parámetros relacionados con la viscosidad, no hay una relación clara con ninguna de las morfométricas utilizadas. La ausencia de relevancia estadísti-

ca en los parámetros relacionados con la viscosidad puede deberse al tamaño limitado de la muestra. Estas tendencias preliminares deben interpretarse cuidadosamente en muestras más grandes y se deben evaluar otras líneas celulares para determinar si es posible encontrar un patrón consistente en el comportamiento viscoso.

Otro factor determinante en la obtención de propiedades mecánicas de las células es la velocidad de indentación [94, 95, 88, 96]. A pesar de que la mayoría de los trabajos previos han utilizado un único modelo para analizar su efecto, este trabajo presenta una comparación entre tres modelos (Sneddon, FZ y FK), revelando comportamientos diferentes entre ellos al aumentar la velocidad de indentación. En primera instancia, el módulo de Young del modelo de Sneddon aumento de manera no estadísticamente significativa. De manera similar, para el modelo FK, el parámetro E_{1K} se mantuvo casi constante. En contraste, el modelo FZ mostró que el parámetro E_{0Z} incrementó significativamente, mientras que E_{1Z} se mantuvo casi constante, con una leve tendencia a disminuir. Esta discrepancia, en lugar de una contradicción, demuestra la respuesta de los componentes de las células, como se explicará a continuación.

Los modelos de Sneddon y FK no exhiben cambios estadísticamente significativos al aumentar la velocidad de indentación de 3 a 12 $\mu\text{m/s}$. Estos resultados concuerdan con el trabajo de García et al. [94], quienes reportaron que a bajas frecuencias de modulación (0.2-4.0 Hz), correspondientes a velocidades de indentación entre 0 y 20 $\mu\text{m/s}$, el módulo elástico no presenta cambios. Sin embargo, la Figura 6.9 muestra que al aumentar la velocidad, disminuyó la profundidad de la indentación a pesar de que la fuerza se mantuvo constante, lo cual indica una respuesta de la célula al estímulo aplicado. Esto concuerda con lo reportado por [95], quienes atribuyen esto a un endurecimiento por deformación causado por el aumento de velocidad. Por consiguiente, el módulo de Young y el parámetro elástico del modelo FK no fueron capaces de capturar la respuesta de la célula al aumento de velocidad.

En cambio, el modelo FZ logro proveer más información sobre el comporta-

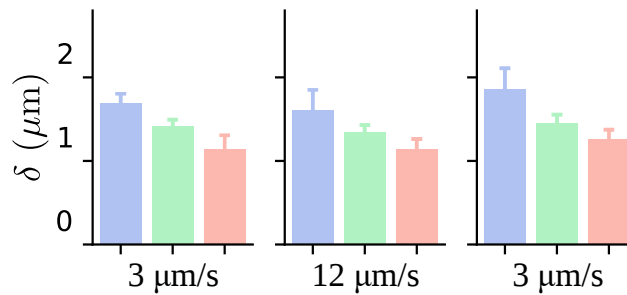


FIGURA 6.9: Medianas de los valores de profundidad de indentación máxima para cada grupo identificado en la Figura 6.1, para cada velocidad de indentación. Se indica la velocidad en la parte inferior de la gráfica

miento de la célula. El aumento significativo de E_{0Z} mientras que E_{1Z} se mantuvo constante sugiere que existe una relación entre E_{1Z} y la deformación de un componente del citoesqueleto. Aunque sería difícil atribuirle este parámetro a un componente en específico, la vimentina puede jugar un papel importante, pues presenta endurecimiento por deformación [97, 98], dado que la reducción en la deformación se relaciona con menor rigidez. No obstante, se necesita realizar más experimentos para aclarar la contribución de uno o varios componentes del citoesqueleto.

A diferencia de E_{1Z} , el parámetro E_{0Z} aumentó significativamente. Además, este cambio dependió de la forma de la célula. Esto indica que la respuesta de la célula a una deformación más rápida depende de la organización de sus componentes internos y sugiere que E_{0Z} captura el endurecimiento de un material viscoelástico a niveles de deformación altos. Este hallazgo apoya la noción de que el parámetro E_{0Z} está relacionado con la capacidad de deformación de las células, propuesta en un trabajo anterior [72]. Esto se debe a que, cuando un material viscoelástico se deforma lentamente, su estructura interna tiene tiempo de reorganizarse, fluir o relajarse como respuesta a la fuerza aplicada. En cambio, al aplicar mayor tasa de deformación, el material no tiene tiempo suficiente para ajustarse y tiene como consecuencia una mayor resistencia a la deformación. Esto se manifiesta en las células como una profundidad de indentación menor para la misma velocidad. Este comportamiento sugiere que las células MG63 se vuelven menos deformables al aumentar la velocidad

de indentación, siendo el grupo III el menos deformable.

Por estos motivos, el modelo FZ captura exitosamente tanto la rigidez de la célula, surgiendo de la deformación de sus elementos internos, como el endurecimiento por deformación inducido por estos elementos al aumentar la velocidad de indentación. Esto explica por qué los cambios en el módulo de Young no son significativos: el aumento en la rigidez producido por el aumento de velocidad se vio contrarrestado por la reducción de la rigidez debido a la disminución en la deformación, resultando en cambios no significativos en el módulo de Young. A su vez, esto sugiere que el parámetro E_{1K} está asociado con la información capturada por el parámetro E_{1Z} .

Estos hallazgos resaltan la importancia de la selección oportuna de un modelo mecánico. Si bien la simplicidad de trabajar con pocos parámetros es deseada, una representación acertada del comportamiento del sistema es esencial. En este contexto, el modelo FZ provee una representación más confiable de la respuesta celular.

Los parámetros asociados con la viscosidad muestran cambios abruptos al aumentar la velocidad de indentación. El parámetro α_K disminuye significativamente, indicando un comportamiento tipo-sólido. Este parámetro puede caracterizar la resistencia de la célula a la deformación, análogo al papel de E_{0Z} en el modelo FZ. Por lo tanto, α_K posiblemente refleja la respuesta de endurecimiento inducida por los cambios en la tasa de deformación.

En cambio, el tiempo de relajación del modelo FZ disminuye significativamente, lo cual implica un comportamiento tipo-líquido. Este resultado difiere de las predicciones basadas en el parámetro E_{0Z} , el cual sugiere una disminución en la habilidad de las células para deformarse; sin embargo dada la naturaleza viscoelástica de las células y el hecho de que los parámetros viscoelásticos dependen fuertemente de la escala de tiempo de la perturbación mecánica aplicada [99], se vuelve necesario considerar que tan rápido se aplica la fuerza y deformación. Esta consideración motivó la evaluación del número de Deborah, definido como la razón entre la relajación

de un material y el tiempo de su deformación, τ/t [100]. La Figura 6.10 muestra un aumento en el número de Deborah, indicando que el material se comporta más como un sólido en condiciones de deformación rápidas, como fue indicado por los parámetros E_{0Z} y α_K .

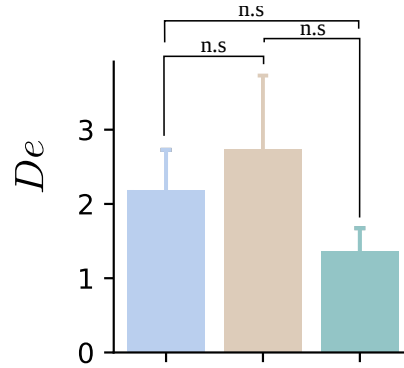


FIGURA 6.10: Valores promedio del número de Deborah obtenidos de todas las células en la muestra para tres indentaciones realizadas a velocidades de $3 \mu\text{m/s}$ (azul), $12 \mu\text{m/s}$ (beige), y $3 \mu\text{m/s}$ (verde).

Como se mencionó anteriormente, no se observa una relación clara entre los parámetros viscosos y la forma de las células. Sin embargo, cabe resaltar que las diferencias entre los grupos son mínimas tras la primer indentación, pero desaparecen por completo en la tercer indentación.

Weber et al.[88] demostraron que bajo velocidades de indentación fijas y fuerzas constantes, las curvas de relajación pueden seguir el mismo camino. Esto sugiere que los cambios observados en nuestro estudio fueron provocados principalmente por la segunda indentación a la velocidad de $12 \mu\text{m/s}$. Esto resalta la importancia de tomar en cuenta las velocidades de indentación al caracterizar las propiedades mecánicas de las células. Además, analizar el comportamiento de la relajación en las células tras varias indentaciones consecutivas a varias velocidades de indentación podría proveer información importante sobre su capacidad de recuperación. Este enfoque puede servir como una metodología para evaluar el daño interno inducido en la célula por diversos tratamientos.

6.6 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE LA INTEGRACIÓN ENTRE MORFOLOGÍA Y VISCOELASTICIDAD

La instrumentación utilizada en este trabajo demostró ser versátil y de bajo costo. El acoplamiento de ambos microscopios permitió la evaluación simultánea de propiedades mecánicas y morfológicas, logrando resultados óptimos sin la necesidad de adquirir un equipo de mayor costo.

La métrica SC demostró ser una herramienta efectiva para cuantificar la complejidad de las formas en la línea de MG63. Su naturaleza cuantitativa provee un método confiable para describir geometrías irregulares y complementa a los descriptores de forma convencionales al caracterizar la variación morfométrica observada en esta línea celular. Si bien la métrica SC es un descriptor prometedor, este estudio sigue siendo preliminar y exploratorio. Por lo tanto, se recomienda seguir probando su efectividad en diferentes líneas y condiciones.

El análisis de propiedades mecánicas reveló una correlación entre la forma y la rigidez de las células MG63 con formas complejas; las que tienen lóbulos prominentes mostraron mayor rigidez, indicando que las células con formas poligonales son más rígidas en comparación con las más circulares.

Aumentar la velocidad de indentación de 3 a 12 $\mu\text{m/s}$ aumenta también la rigidez de las células, evidenciado por la reducción en la deformación aplicando la misma fuerza. Los parámetros E_{0Z} y E_{1Z} del modelo FZ capturan esta relación de manera efectiva, describiendo el efecto combinado de la rigidez y la capacidad de deformación. En cambio, el módulo de Young no mostró cambios significativos debido a los efectos compensatorios de la reducción en la rigidez y la capacidad de deformación. Por otro lado, el modelo FK captura este comportamiento por medio del parámetro α_K , reflejando un comportamiento más tipo-sólido.

El modelo FZ otorgó una descripción más detallada y precisa de la respuesta de

la célula a diferentes velocidades de indentación comparado con el modelo FK. Aun así, es necesario realizar más experimentos utilizando un mayor número de células para entender por completo las propiedades físicas de las células, identificar descriptores prometedores y determinar los parámetros más relevantes para optimizar la obtención de resultados.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS GENERALES

7.1 CONCLUSIONES

En este trabajo se estableció una metodología para la caracterización morfológica de células adherentes basada en imágenes de microscopía óptica, segmentación celular y análisis cuantitativo de descriptores de forma. Entre las métricas analizadas, la complejidad de forma (SC) y la circularidad resultaron ser las más informativas para discriminar fenotipos morfológicos de células adherentes, ya que permiten describir diferencias asociadas con la complejidad del contorno, la presencia de proyecciones y el grado de compactación celular. Asimismo, la representación conjunta de estas métricas mediante diagramas de dispersión enriquecidos con máscaras binarias superpuestas permitió integrar información cuantitativa y cualitativa en una misma visualización. Estas representaciones, denominadas en este trabajo *diagramas de fase*, facilitaron la identificación e interpretación de los fenotipos morfológicos presentes en cada muestra.

La utilidad de la metodología propuesta se evaluó mediante el análisis de distintas líneas celulares empleando las métricas SC, circularidad y los diagramas de fase.

Los resultados mostraron que la combinación de estos elementos permite identificar los fenotipos morfológicos predominantes en cada población celular y comparar sus distribuciones morfológicas de manera cuantitativa. En particular, el filtrado de las distribuciones mediante los cuartiles Q1-Q3 facilitó la identificación de las regiones del espacio morfológico ocupadas por la mayor parte de cada población, reduciendo la influencia de valores extremos. Asimismo, la metodología pudo aplicarse de manera consistente a diferentes líneas celulares humanas y murinas, permitiendo establecer comparaciones entre muestras y definir rangos característicos de SC y circularidad asociados con cada fenotipo morfológico.

La metodología propuesta fue posteriormente aplicada al estudio de los cambios morfológicos inducidos por diferentes concentraciones de miel en células HUVEC durante un periodo de 72 horas. Los resultados mostraron que la concentración de 0.250 % produjo un incremento del área y del SC, acompañado de una disminución de la circularidad respecto al grupo control. Asimismo, las células tratadas con esta concentración mostraron una mayor organización en estructuras lineales y patrones celulares complejos, rasgos que concuerdan con una respuesta que promueve el proceso de angiogénesis. Por el contrario, las concentraciones iguales o superiores al 0.500 % indujeron una disminución progresiva del área y del SC, así como un aumento de la circularidad. Estos cambios estuvieron acompañados por una apariencia más granular y una menor interacción célula-célula, lo que sugiere alteraciones importantes en el estado fisiológico de las células.

Con el fin de evaluar si estas alteraciones morfológicas estaban asociadas con una disminución de la viabilidad celular, se realizó un ensayo de tinción con azul tripán. Los resultados mostraron que las concentraciones iguales o superiores al 0.500 % produjeron los mayores porcentajes de células no viables, alcanzando valores entre 53 % y 75 % al final del periodo experimental. El análisis independiente de células viables y no viables reveló que estas últimas presentaban una morfología característica, descrita por valores promedio de $SC = 61.52$, circularidad = 0.7180 y área = $305.67 \mu m^2$. En conjunto, estos resultados sugieren que la metodología

propuesta permite identificar fenotipos morfológicos asociados con la pérdida de viabilidad celular y distinguir poblaciones con estados morfológicos diferentes dentro de una misma muestra.

Finalmente, se analizó la correlación entre las propiedades mecánicas y morfológicas de células MG63 y se sometieron a diferentes velocidades de indentación por medio de curvas FDC y FRC para evaluar cambios en sus parámetros viscoelásticos. Una vez más, se utilizó la métrica SC para clasificar las células por el tamaño y la prominencia de sus lóbulos, y se encontró que esta métrica tiene una correlación positiva con la rigidez de las células, denotada por los módulos elásticos de los modelos de Sneddon, FK y FZ. las células con $SC < 60$ mostraron ser más deformables, al experimentar cambios más significativos en sus propiedades mecánicas al aumentar la velocidad de indentación, mientras que las células con $SC > 90$ tuvieron cambios menos significativos y, por lo tanto, se consideran menos deformables. En cuanto al estudio de propiedades mecánicas, el modelo FZ mostró correctamente la respuesta de las células al cambio en la velocidad de indentación, pues sus métricas E_{0Z} y E_{1Z} capturan la disminución de la deformación a pesar de aplicar la misma fuerza.

7.2 PERSPECTIVAS

La metodología y las métricas establecidas en este trabajo muestran un gran potencial para realizar experimentos futuros y llenar varios vacíos de conocimiento. Principalmente, en el estudio de la morfología en conjunto con la estructura del citoesqueleto, la distribución de propiedades mecánicas, la migración celular y la aplicación de tratamientos.

La combinación del análisis morfológico con un microscopio de fluorescencia puede ser utilizada para observar la orientación de las redes poliméricas del citoesqueleto y si estas tienen alguna preferencia respecto a la forma. En un trabajo reciente, Clungston et al. [101] estudiaron los cambios en la morfología de células

A2058 respecto a la rigidez de un sustrato y la presencia de la formina, una proteína relacionada con la reorganización de la actina en el citoesqueleto. La combinación de la metodología propuesta en este trabajo junto con su protocolo para medir la orientación de los filamentos de actina podría revelar más sobre la relación entre la forma y la arquitectura del citoesqueleto. Además de la rigidez del sustrato y la transfección de genes, se podrían cambiar otras condiciones experimentales, como el uso de células sanas a manera de control, la aplicación de tratamientos que ataquen al citoesqueleto [93] y la variación en los componentes del sustrato [102].

Si bien el estudio realizado combinando microscopía de fuerza atómica y óptica mostró resultados interesantes sobre la correlación entre la morfología y la rigidez, estos estudios podrían tener mayor alcance con algunas modificaciones o con equipos especializados [103]. La primera es cambiar la técnica de AFM al modo Force-mapping o Peakforce [104], en el cual en lugar de extraer una única curva de fuerza por célula se obtiene un mapa con varias curvas en una región de interés. Esto permitiría estudiar como se distribuyen las propiedades mecánicas de la célula en la región perinuclear, en los lamelopodios y en el resto del citoplasma para verificar si esta distribución cambia con la morfología, pues hay evidencia de que la respuesta mecánica de las células es diferente en cada una de estas regiones [17, 105]. La segunda modificación sugerida es recolectar datos de una muestra más grande de células; los experimentos en células vivas en AFM tienden a ser lentos en comparación con la vida de las células fuera de una incubadora, por lo que se requeriría de varias replicas independientes o de una cámara de CO_2 con control de temperatura para aumentar el tamaño de la muestra.

La implementación de un estudio morfológico con las métricas propuestas junto con el rastreo de células en tiempo real podría identificar los fenotipos celulares con mayor desplazamiento cuadrático medio, lo cual indica mayor potencial metastásico en el caso de células de cáncer [43, 106]. Para esto se podría utilizar un protocolo parecido al propuesto por Baskaran et al. [102] para estudiar la invasión en líneas de cáncer de mama.

En cuanto a las mejoras para el método desarrollado, se planea a futuro optimizar el código para reducir costo computacional e implementar el uso de una interfaz gráfica para que pueda ser implementado con mayor facilidad para usuarios sin conocimiento previo en programación. Al ser más sencillo de utilizar, podrá ser implementado en diferentes sistemas para seguir probando su potencial y sus límites.

El método desarrollado es ideal para la descripción de figuras en 2 dimensiones, lo cual es adecuado para la clasificación de células adherentes. Para extrapolar esta metodología a células en suspensión sería más adecuado utilizar otro tipo de microscopía, como la confocal [107], que permite una representación tridimensional de las células. Sin embargo, la clasificación morfológica de objetos en tres dimensiones ha sido poco explorada y sería recomendable intercambiar el análisis de Fourier por la clasificación por armónicos esféricos propuestos por Van Bavel et al. [108].

Las métricas que se delimitaron mostraron gran utilidad para realizar un análisis con pocos parámetros y que estos tuvieran una interpretación física clara. Sin embargo, se ha propuesto por Bhazkar et al. [109] el uso de métodos de reducción de dimensionalidad como t-SNE [110] para delimitar las métricas más relevantes y separar grupos experimentales. Recientemente, Vadori et al. [111] compartieron en el “*22nd International Symposium on Biomedical Imaging*” una comparación de métodos de clasificación celular, la cual el análisis de componentes principales (PCA) mostró resultados prometedores para la clasificación automática de célula. Aunque el uso de las métricas SC y circularidad aparente ser suficiente para la clasificación, no se descarta el potencial de estos análisis en un futuro para crear una clasificación más robusta y que pueda mezclar datos de varios parámetros físicos a la vez.

APÉNDICE A

APÉNDICE: PROCEDIMIENTO UTILIZADO PARA EXTRAER MORFOMÉTRICAS

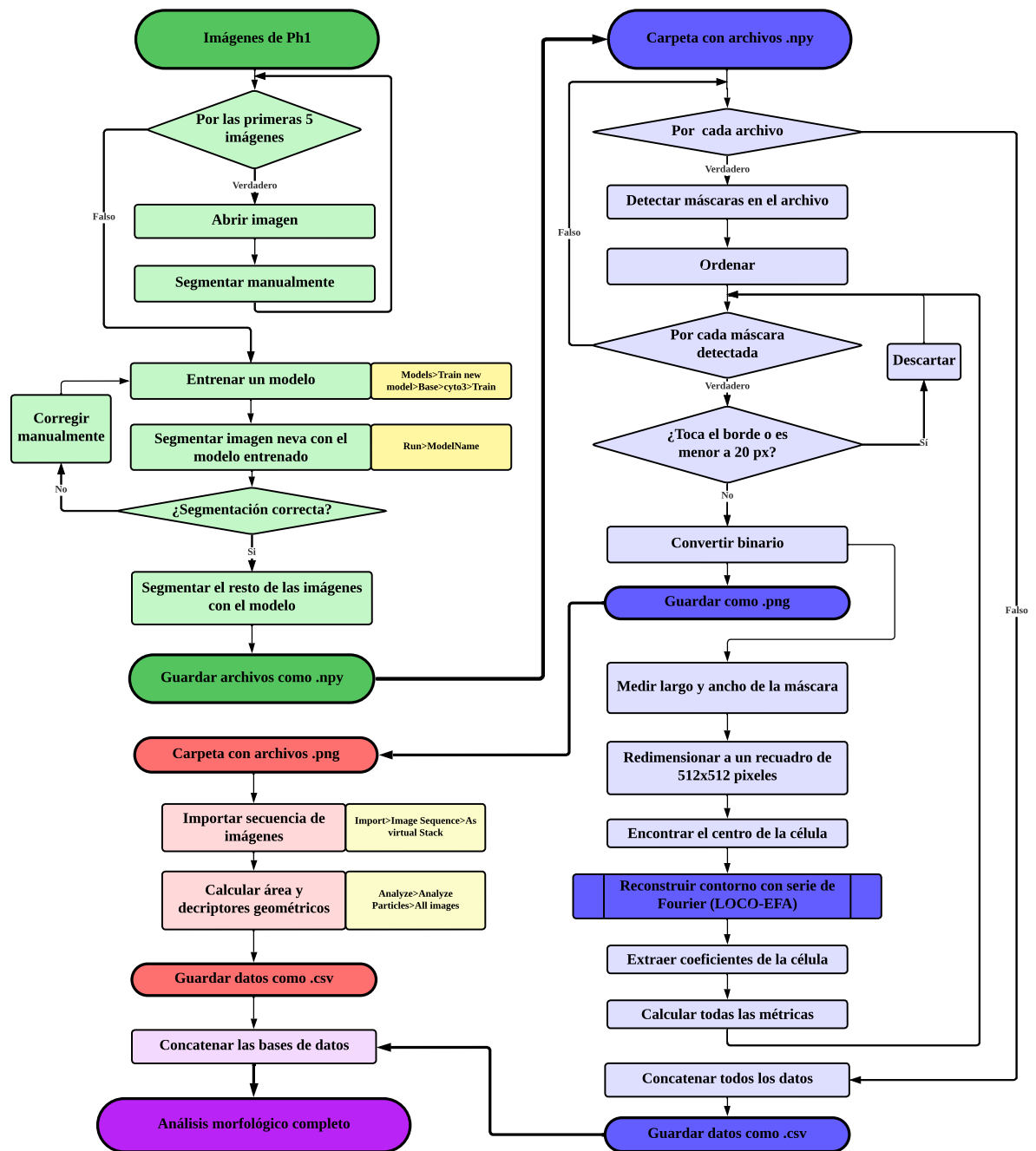


FIGURA A.1: Diagrama de flujo con el procedimiento realizado para el análisis morfológico. Se señalan en verde los procesos realizados en Cellpose, en rojo los de FIJI y en azul los de LOCO-EFA.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] C. Damiani, R. Serra, M. Villani, S. Kauffman, and A. Colacci, “Cell-cell interaction and diversity of emergent behaviours,” *IET Syst Biol.*, vol. 5, pp. 137–144, 2011.
- [2] U. S. Schwarz and S. A. Safran, “Physics of adherent cells,” *Rev. Mod. Phys.*, vol. 85, p. 1327, 2013.
- [3] J. Aronson and R. Ferner, “Biomarkers—a general review,” *Current Protocols in Pharmacology*, vol. 76, pp. 9.23.1–9.23.17, 2017.
- [4] H. Nia, L. Munn, and R. Jain, “Physical traits of cancer,” *Science*, vol. 370, p. 6516, 2020.
- [5] P. Wu, D. Aroush, A. Asnacios, W. Chen, M. Dokukin, B. Doss, P. Durand-Smet, A. Ekpenyong, J. Guck, N. Guz, P. Janmey, J. Lee, N. Moore, O. A., Y. Poh, R. Ros, M. Sander, I. Sokolov, J. Staunton, N. Wang, G. Whyte, and D. Wirtz, “A comparison of methods to assess cell mechanical properties,” *Nat Method*, vol. 15, pp. 491–498, 2018.
- [6] H. Yu, K. Lim, S. Xiong, L. Tan, and W. Shim, “Functional morphometric analysis in cellular behaviors: shape and size matter.,” *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 2, pp. 1188–1197, 5 2013.
- [7] H. Wang, H. Zhang, B. Da, D. Lu, R. Tamura, K. Goto, I. Watanabe, D. Fujita, N. Hanagata, J. Kano, T. Nakagawa, and M. Noguchi, “Mechanomics biomar-

- ker for cancer cells unidentifiable through morphology and elastic modulus,” *Nano Lett.*, vol. 21, no. 3, pp. 1538–1545, 2021.
- [8] E. M. Darling, M. Topel, S. Zauscher, T. Vail, and F. Guilak, “Viscoelastic properties of human mesenchymally-derived stem cells and primary osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes,” *J Biomech*, vol. 41, no. 2, pp. 454–464, 2008.
- [9] L. M. Rebelo, J. S. de Sousa, J. Mendes Filho, and M. Radmacher, “Comparison of the viscoelastic properties of cells from different kidney cancer phenotypes measured with atomic force microscopy,” *Nanotechnology*, vol. 24, pp. 454–464, 2013.
- [10] N. Schierbaum, J. Rheinlaender, and T. Schäffer, “Viscoelastic properties of normal and cancerous human breast cells are affected differently by contact to adjacent cells,” *Acta Biomater.*, vol. 55, pp. 239–248, 2017.
- [11] N. Wang, M. Zhang, Y. Chang, N. Niu, Y. Guan, M. Ye, C. Li, and J. Tang, “Directly observing alterations of morphology and mechanical properties of living cancer cells with atomic force microscopy,” *Talanta*, vol. 191, pp. 461–468, 2019.
- [12] Z. Pincus and J. Theriot, “Comparison of quantitative methods for cell-shape analysis,” *J. Microsc*, vol. 227, pp. 140–156, 2007.
- [13] M. Yang, Y. Yang, L. Liu, and M. Li, “Single-cell parallel plate mechanics by side-view optical microscopy-assisted atomic force microscopy,” *Nanoscale Adv*, vol. 7, no. 8, pp. 2158–2165, 2025.
- [14] Y. Yang and M. Li, “Side-view optical microscopy-assisted atomic force microscopy for thickness-dependent nanobiomechanics,” *Nanoscale Adv*, vol. 6, no. 13, pp. 3306–3319, 2024.
- [15] D. Guan, D. Coates, Q. Sun, R. Cannon, and L. Mei, “Atomic force microscopy for revealing oncological nanomechanobiology and thermodynamics,” *ACS Nano*, vol. 19, no. 11, p. 0862–10877, 2025.

-
- [16] Y. Yang, X. Xiao, Y. Peng, C. Yang, S. Wu, T. Liu, T. Yue, H. Pu, N. Liu, and H. Jiang, “The comparison between force volume and peakforce quantitative nanomechanical mode of atomic force microscope in detecting cell’s mechanical properties,” *Microsc. Res. Tech.*, vol. 82, no. 11, pp. 1843–1851, 2019.
- [17] S. Kim, Y. Lee, M. Lee, S. An, and S. Cho, “Quantitative visualization of the nanomechanical young’s modulus of soft materials by atomic force microscopy,” *Nanomaterials*, vol. 11, no. 6, p. 1593, 2021.
- [18] K. Young, C. Xu, K. Akhee, F. Mc Donald, P. Qui, and T. Sulchek, “Correlating mechanical and gene expression data on the single cell level to investigate metastatic phenotypes,” *iScience*, vol. 26, pp. 1–17, 2023.
- [19] A. Joshi, *Essentials of Cell Biology*. Orangebooks Publisher, 2022.
- [20] L. Dalton, R. Young, and N. H., *Fundamentals of cell Biology*. Oregon State University, 2024.
- [21] D. Fletcher and D. Mullins, “Cell mechanics and the cytoskeletons,” *Nature*, vol. 485, pp. 485–492, 1 2010.
- [22] B. Alberts, A. Johnson, and L. J., *Molecular Biology of the Cell*. Garland science., 2002.
- [23] C. Mierke, *Physics of Cancer, Volume 2*. IOP Publishing Ltd, 2018.
- [24] D. Gutierrez-Lemini, *Engineering Viscoelasticity*. Springer, 2014.
- [25] R. Larson, *The Structure and Rheology of Complex Fluids (Topics in Chemical Engineering)*. Oxford University Press, 1999.
- [26] Z. Qi, “Cellular phenotypes: Insights into the mechanisms of cell function and behaviour,” *Biochem Pharmacol.*, vol. 13, no. 4, p. 380, 2024.
- [27] M. Ryota, “Cellular morphology: The diversity and significance of cellular shapes,” *Journal of Interdisciplinary Histopathology*, vol. 11, no. 9, pp. 1–2, 2023.

-
- [28] A. Taubenberger, B. Baum, and H. Matthews, “The mechanics of mitotic cell rounding,” *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 8, p. 687, 08 2020.
- [29] A. Murashko, A. Frolova, A. Akovantseva, S. Kotova, P. Timashev, and Y. Efremov, “The cell softening as a universal indicator of cell damage during cytotoxic effects,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1867, p. 130348, 03 2023.
- [30] M. Guvendiren, S. Fung, J. Kohn, C. De Maria, F. Montemurro, and G. Vozzi, “The control of stem cell morphology and differentiation using three-dimensional printed scaffold architecture,” *MRS Commun.*, vol. 7, no. 3, pp. 383–390, 2017.
- [31] L. Smith and S. Cho, “Stem cell differentiation is regulated by extracellular matrix mechanics,” *Physiology*, vol. 33, pp. 16–25, 01 2018.
- [32] S. Subramony, B. Dargis, M. Castillo, E. Azeloglu, M. Tracey, A. Su, and H. Lu, “The guidance of stem cell differentiation by substrate alignment and mechanical stimulation,” *Biomaterials*, vol. 34, 12 2012.
- [33] S. Sala, A. Caillier, and P. Oakes, “Principles and regulation of mechanosensing,” *Journal of Cell Science*, vol. 137, 09 2024.
- [34] Y. Bingcheng, Q. Xu, and W. Liu, “An overview of substrate stiffness guided cellular response and its applications in tissue regeneration,” *Bioactive Materials*, vol. 15, pp. 82–102, 12 2021.
- [35] Y. Chen, X. Li, M. Yang, and S.-B. Liu, “Research progress on morphology and mechanism of programmed cell death,” *Cell Death Dis.*, vol. 15, p. 327, 2024.
- [36] C. Pfeffer and A. Singh, “Apoptosis: A target for anticancer therapy,” *Int J Mol Sci.*, vol. 19, no. 2, p. 448, 2018.

- [37] Y. Efremov, E. Grebenik, R. Sharipov, I. Krasilnikova, S. Kotova, A. Akovantseva, Z. Bakaeva, V. Pinelis, A. Surin, and P. Timashev, “Viscoelasticity and volume of cortical neurons under glutamate excitotoxicity and osmotic challenges,” *Biophysical journal*, vol. 119, pp. 1712–1723, 11 2020.
- [38] A. Kruyer, M. Scofiel, D. Wood, K. Reissner, and W. Kalivas, “Heroin cue-evoked astrocytic structural plasticity at nucleus accumbens synapses inhibits heroin seeking,” *Biological Psychiatry*, vol. 86, no. 11, pp. 811–819, 2019.
- [39] A. Kruyer, A. Angelis, C. Garcia-Keller, H. Li, and W. Kalivas, “Plasticity in astrocyte subpopulations regulates heroin relapse,” *Sci. Adv.*, vol. 8, no. 32, p. eabo7044, 2022.
- [40] A. Kruyer, D. Dixon, A. Angelis, D. Amato, and W. Kalivas, “Astrocytes in the ventral pallidum extinguish heroin seeking through gat-3 upregulation and morphological plasticity at d1-msn terminals,” *Molecular Psychiatry*, vol. 27, pp. 855–864, 2021.
- [41] F. D’Anselmi, M. Valerio, A. Cucina, L. Galli, S. Proietti, S. Proietti, S. Dinicola, A. Pascualato, C. Manetti, G. Ricci, A. Guillianì, and M. Bizarri, “Metabolism and cell shape in cancer: a fractal analysis,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 43, no. 7, pp. 1052–1058, 2011.
- [42] A. Baba and C. Cătoi, *Comparative Oncology*. The Publishing House of the Romanian Academy, 2 ed., 2007.
- [43] E. Alizadeh, S. Lyons, J. Castle, J. Foss, and A. Prasad, “Is shape of cancer cell correlated with its invasiveness?,” *Biophys. J.*, vol. 112, pp. 124a–125a, 2 2017.
- [44] S. Lyons, E. Alizadeh, J. Manheimer, K. Schuamberg, J. Castle, B. Schroder, P. Turk, and A. Thamm, D. Prasad, “Changes in cell shape are correlated with metastatic potential in murine and human osteosarcomas,” *Biol. Open*, vol. 5, no. 3, pp. 289–299, 2016.

-
- [45] E. Alizadeh, J. Castle, C. Taylor, W. Xu, and D. Prasad, “Cellular morphological features are predictive markers of cancer cell state,” *Comput. Biol. Med.*, vol. 126, 11 2020.
- [46] A. Prasad and E. Alizadeh, “Cell form and function: Interpreting and controlling the shape of adherent cells,” *Trends Biotechno*, vol. 37, no. 4, pp. 347–357, 2019.
- [47] M. Lekka, P. Laidler, D. Gil, Z. Lekki, J. and Stachura, and A. Hryniewicz, “Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy,” *Eur. Biophys. J.*, vol. 28, pp. 312–316, 1999.
- [48] D. Garcia and R. Garcia, “Determination of the viscoelastic properties of a single cell cultured on a rigid support by force microscopy,” *Nanoscale*, vol. 10, no. 42, pp. 19799–19809, 2018.
- [49] J. Fenner, A. Stacer, F. Winterroth, T. Johnson, and K. Luker, “Macroscopic stiffness of breast tumors predicts metastasis,” *Sci Rep*, vol. 4, no. 5512, pp. 40–46, 2014.
- [50] H. Mostafa, “Different cells of the human body: Categories and morphological characters,” *J Microsc Ultrastruct*, vol. 10, no. 2, pp. 40–46, 2021.
- [51] E. Alizadeh, S. Lyons, J. Castle, and A. Prasad, “Measuring systematic changes in invasive cancer cell shape using zernike moments,” *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*, vol. 8, pp. 1183–1193, 10 2016.
- [52] G. Losa, D. Ristanovic, D. Ristanovic, I. Zaletel, and S. Beltraminelli, “From fractal geometry to fractal analysis,” *Applied Mathematics*, vol. 7, pp. 346–354, 03 2016.
- [53] M. Rico, M. Arasmou-Idrovo, B. Marín-Rodríguez, and J. Pascual-Guerra, “Fractal dimension reveals cellular morphological changes as early biomarkers in neurodegenerative diseases: A narrative review,” *NeuroMarkers*, vol. 2, p. 100108, 06 2025.

-
- [54] F. P. Kuhl and C. R. Giardina, “Elliptic fourier features of a closed contour,” *Comput. graph. image process.*, vol. 18, no. 3, pp. 236–258, 1982.
- [55] Y. Sánchez-Corrales, M. Hartley, J. van Rooij, A. Marée, and V. Grieneisen, “Morphometrics of complex cell shapes: lobe contribution elliptic fourier analysis (loco-efa).,” *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 145, 3 2018.
- [56] R. Khandpur, *Microscope, Inverted*, ch. 243, pp. 1301–1303. John Wiley & Sons Ltd, 2020.
- [57] A. Sirkeck, V. Bhardwaj, and K. Kalia, “Dark-field, phase-contrast and fluorescence microscopy: Principles, applications, advantages & limitations,” *IAR J. Med Sci.*, vol. 3, no. 4, pp. 67–72, 2022.
- [58] G. Binnig, C. Quate, and C. Gerber, “Atomic Force Microscope,” *Physical Review Letters*, vol. 56, no. 9, pp. 930–934, 1986.
- [59] Y. Dufrene, T. Ando, R. Garcia, D. Alsteens, D. Martinez-Martin, A. Engel, G. C., and M. J. Müller, “Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology,” *Nature Nanotechnology*, vol. 12, no. 1, pp. 295–307, 2017.
- [60] E. Erickson and P. De Wolf, *The Definitive AFM Modes Handbook*. Bruker, 2025.
- [61] N. Gavara, “A beginner’s guide to atomic force microscopy probing for cell mechanics,” *Microsc. Res. Tech*, vol. 80, no. 1, pp. 75–84, 2017.
- [62] S. Kulkarni, S. Perez-Dominguez, and M. Radmacher, “Influence of cantilever tip geometry and contact model on AFM elasticity measurement of cells,” *J Mol Recognit*, vol. 36, no. 7, pp. 91–116, 2023.
- [63] J. Zemla, J. Bobrowska, A. Kubiak, T. Zielinski, J. Pabijan, K. Pogoda, P. Bobrowski, and M. Lekka, “Indenting soft samples (hydrogels and cells) with cantilevers possessing various shapes of probing tip,” *Eur Biophys J*, vol. 49, no. 1, pp. 485–495, 2020.

-
- [64] L. Lacaria, A. Podestà, M. Radmacher, and F. Rico, *Contact Mechanics*, ch. 1, pp. 1–39. HAL Open science, 08 2022.
- [65] P. Hansma, V. Elings, O. Marti, and C. Bracker, “Scanning tunneling microscopy and atomic force microscopy: Application to biology and technology,” *Science (New York, N.Y.)*, vol. 242, pp. 209–16, 11 1988.
- [66] J. Hoh and C.-A. Schoenenberger, “Surface morphology and mechanical properties of mdck monolayers by atomic force microscopy,” *Journal of Cell Science*, vol. 107, pp. 1105–1114, 05 1994.
- [67] M. Radmacher, M. Fritz, C. Kacher, J. Cleveland, and P. Hansma, “From molecules to cells: Imaging soft samples with the atomic force microscope,” *Science*, vol. 257, no. 5078, pp. 1900–1905, 1992.
- [68] M. Radmacher, M. Fritz, C. Kacher, J. Cleveland, and P. Hansma, “Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope,” *Biophysical journal*, vol. 70, pp. 556–67, 02 1996.
- [69] H. Hertz, “On the contact of elastic bodies,” *Journalfur die reine und angewandte Mathematik*, no. 92, pp. 156–171, 1881.
- [70] D. Roylance, “Engineering viscoelasticity,” *Department of Materials Science and Engineering–Massachusetts Institute of Technology, Cambridge MA*, vol. 2139, pp. 1–37, 2001.
- [71] R. M. Christensen, *Theory of viscoelasticity*. Courier Corporation, 2013.
- [72] L. Ovalle-Flores, M. Rodríguez-Nieto, D. Zárate-Triviño, C. Rodríguez-Padilla, and J. L. Menchaca, “Methodologies and models for measuring viscoelastic properties of cancer cells: Towards a universal classification,” *J Mech Behav Biomed Mater*, vol. 140, p. 105734, 2023.
- [73] G. C. Duque-Gimenez, D. F. Zambrano-Gutierrez, M. Rodriguez-Nieto, J. L. Menchaca, J. M. Cruz-Duarte, D. G. Zárate-Triviño, J. G. Avina-Cervantes,

- and J. C. Ortiz-Bayliss, “Viscoelastic characterization of the human osteosarcoma cancer cell line mg-63 using a fractional-order zener model through automated algorithm design and configuration,” *Scientific Reports*, vol. 15, no. 1, p. 31436, 2025.
- [74] H. Bateman, *Higher transcendental functions [volumes i-iii]*, vol. 1. McGRAW-HILL book company, 1953.
- [75] S. Belikov, J. Alexander, C. Wall, I. Yermolenko, S. Magonov, and I. Malovichko, “Thermal tune method for afm oscillatory resonant imaging in air and liquid,” in *2014 American Control Conference*, pp. 1009–1014, 2014.
- [76] A. Weber, R. Benitez, and J. L. Toca-Herrera, “Measuring biological materials mechanics with atomic force microscopy-determination of viscoelastic cell properties from stress relaxation experiments,” *Microscopy Research and Technique*, vol. 85, no. 10, pp. 3284–3295, 2022.
- [77] E. M. Darling, S. Zauscher, and F. Guilak, “Viscoelastic properties of zonal articular chondrocytes measured by atomic force microscopy,” *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 14, no. 6, pp. 571–579, 2006.
- [78] J. Collins, J. Knapper, J. Stirling, J. Mduda, C. Mkindi, V. Mayagaya, G. A. Mwakajinga, P. T. Nyakyi, V. L. Sanga, D. Carbery, L. White, S. Dale, Z. J. Lim, J. J. Baumberg, P. Cicuta, S. McDermott, B. Vodenicharski, and R. Bowman, “Robotic microscopy for everyone: the OpenFlexure microscope,” *Bio-med. Opt. Express*, vol. 11, pp. 2447–2460, 2011.
- [79] C. Stringer, T. Wang, and M. e. a. Michaelos, “Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation,” *Nat Methods*, vol. 18, pp. 100–106, 2021.
- [80] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frisse, and et.al, “Fiji: an open-source platform for biological-image analysis,” *Nat Methods*, vol. 9, pp. 676–682, 6 2012.

-
- [81] P. Virtanen, R. Gommers, T. E. Oliphant, M. Haberland, T. Reddy, D. Cournapeau, E. Burovski, P. Peterson, W. Weckesser, J. Bright, *et al.*, “Scipy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in python,” *Nature methods*, vol. 17, no. 3, pp. 261–272, 2020.
- [82] I. Hatton, E. Galbraith, N. Merleau, T. Miettinen, S. B.M., and J. Shander, “The human cell count and size distribution.,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 120, no. 39, p. e2303077120., 2023.
- [83] K. DeCicco-Skinner, G. Henry, C. Cataisson, T. Tabib, J. Gwilliam, N. Watson, E. Bullwinkle, L. Falkenburg, R. O’Neill, A. Morin, and J. Wiest, “Endothelial cell tube formation assay for the in vitro study of angiogenesis,” *J Vis Exp*, vol. 91, p. :e51312, 2014.
- [84] K. Rossiter, A. Cooper, D. Voegeli, and B. Lwaleed, “Honey promotes angiogenic activity in the rat aortic ring assay,” *J Wound Care*, vol. 19, no. 10, pp. 440–446, 2010.
- [85] L. Porcza, C. Simms, and M. Chopra, “Honey and cancer: Current status and future directions.,” *Diseases*, vol. 4, no. 4, p. 30, 2016.
- [86] W. Strober, “Trypan blue exclusion test of cell viability,” *Current Protocols in Immunology*, vol. 111, no. 1, pp. A3.B.1–A3.B.3, 2015.
- [87] S. Abuhattum, D. Mokbel, P. Müller, D. Soteriou, J. Guck, and S. Aland, “An explicit model to extract viscoelastic properties of cells from afm force-indentation curves,” *iScience*, vol. 25, p. 104016, 03 2022.
- [88] A. Weber, J. Iturri, R. Benitez, and J. Toca-Herrera, “Measuring biomaterials mechanics with atomic force microscopy. 1. influence of the loading rate and applied force (pyramidal tips),” *Microsc Res Tech*, vol. 82, pp. 1392–1400, 2019.
- [89] R. Kalluri, R. A. Weinberg, *et al.*, “The basics of epithelial-mesenchymal

- transition,” *The Journal of clinical investigation*, vol. 119, no. 6, pp. 1420–1428, 2009.
- [90] S. Sivagurunathan, A. Vahabikashi, H. Yang, J. Zhang, K. Vazquez, D. Rajasundaram, Y. Politanska, H. Abdala-Valencia, J. Notbohm, M. Guo, *et al.*, “Expression of vimentin alters cell mechanics, cell-cell adhesion, and gene expression profiles suggesting the induction of a hybrid emt in human mammary epithelial cells,” *Frontiers in cell and developmental biology*, vol. 10, p. 929495, 2022.
- [91] M. G. Mendez, S.-I. Kojima, and R. D. Goldman, “Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition,” *The FASEB Journal*, vol. 24, no. 6, p. 1838, 2010.
- [92] C.-Y. Liu, H.-H. Lin, M.-J. Tang, and Y.-K. Wang, “Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation,” *Oncotarget*, vol. 6, no. 18, p. 15966, 2015.
- [93] M. Ong and *et al.*, “An overview of substrate stiffness guided cellular response and its applications in tissue regenerationcytoskeletal proteins in cancer and intracellular stress: A therapeutic perspective,” *Cancers*, vol. 12, pp. 23882–102, 01 2020.
- [94] P. D. Garcia, C. R. Guerrero, and R. Garcia, “Time-resolved nanomechanics of a single cell under the depolymerization of the cytoskeleton,” *Nanoscale*, vol. 9, no. 33, pp. 12051–12059, 2017.
- [95] A. Weber, B. Zbiral, J. Iturri, R. Benitez, and J. L. Toca-Herrera, “Measuring (biological) materials mechanics with atomic force microscopy. 2. influence of the loading rate and applied force (colloidal particles),” *Microscopy Research and Technique*, vol. 84, no. 5, pp. 1078–1088, 2021.

-
- [96] K. B. Bernick, T. P. Prevost, S. Suresh, and S. Socrate, “Biomechanics of single cortical neurons,” *Acta biomaterialia*, vol. 7, no. 3, pp. 1210–1219, 2011.
- [97] A. E. Patteson, R. J. Carroll, D. V. Iwamoto, and P. A. Janmey, “The vimentin cytoskeleton: when polymer physics meets cell biology,” *Physical biology*, vol. 18, no. 1, p. 011001, 2020.
- [98] U. Rölleke, P. Kumari, R. Meyer, and S. Köster, “The unique biomechanics of intermediate filaments—from single filaments to cells and numbers,” *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 85, p. 102263, 2023.
- [99] S. Mathieu and J.-B. Manneville, “Intracellular mechanics: connecting rheology and mechanotransduction,” *Current opinion in cell biology*, vol. 56, pp. 34–44, 2019.
- [100] R. G. Larson, *The Structure and Rheology of Complex Fluids*. New York: Oxford University Press, 1999.
- [101] J. Clugston, S. Copeland, J. Harden, and J. Copeland, “The formin fmn12 plays a role in the response of melanoma cells to substrate stiffness,” *BMC Molecular and Cell Biology*, vol. 26, 04 2025.
- [102] J. Baskaran, A. Weldy, J. Guarin, G. Munoz, M. Kotlick, N. Subbiah, A. Wishart, Y. Peng, M. Miller, L. Cowen, and M. Oudin, “Cell shape, and not 2d migration, predicts ecm-driven 3d cell invasion in breast cancer,” *APL Bioeng.*, vol. 4, p. 026105, 01 2020.
- [103] R. Owen, C. Heyes, D. Kneble, C. Röcker, and G. Nienhaus, “An integrated instrumental setup for the combination of atomic force microscopy with optical spectroscopy,” *Biopolymers*, vol. 82, no. 4, pp. 410–414, 2005.
- [104] K. Xu, W. Sun, Y. Shao, F. Wei, X. Zhang, W. Wang, and P. li, “Recent development of peakforce tapping mode atomic force microscopy and its applications on nanoscience,” *Nanotechnology Reviews*, vol. 7, pp. 605–621, 10 2018.

-
- [105] M. Eroles, J. Lopez Alonso, A. Ortega, T. Boudier, K. Gharzeddine, F. La-font, C. Franz, A. Millet, C. Valotteau, and F. Rico, “Coupled mechanical mapping and interference contrast microscopy reveal viscoelastic and adhesion hallmarks of monocyte differentiation into macrophages,” *Nanoscale*, vol. 15, 06 2023.
- [106] L. Perrin, E. Belova, B. Bayarmagnai, E. Tüzel, and B. Gligorijevic, “Invadopodia enable cooperative invasion and metastasis of breast cancer cells,” *Communications Biology*, vol. 5, p. 758, 08 2022.
- [107] C. Bavel, W. Thiels, and R. Jelier, “Cell shape characterization, alignment, and comparison using flowshape,” *Bioinformatics*, vol. 39, p. e68, 06 2023.
- [108] C. Bavel, W. Thiels, and R. Jelier, “Cell shape characterization, alignment, and comparison using flowshape,” *Bioinformatics*, vol. 39, p. btad383, 06 2023.
- [109] D. Bhaskar, D. Lee, H. Knútsdóttir, C. Tan, M. Zhang, P. Dean, C. Roskelley, and L. Edelstein-Keshet, “A methodology for morphological feature extraction and unsupervised cell classification.” pre-print extraído de doi: <https://doi.org/10.1101/623793>, 2019.
- [110] M. Wattenberg, F. Viégas, and I. Johnson, “How to use t-sne effectively,” *Distill*, 2016.
- [111] V. Vadori, A. Peruffo, J. Graïe, L. Finos, and E. Grisan, “Automated classification of cell shapes: A comparative evaluation of shape descriptors,” in *IS-BI 2025 - 2025 IEEE 22nd International Symposium on Biomedical Imaging, Proceedings*, Proceedings - International Symposium on Biomedical Imaging, pp. 1–4, Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE), 2025.