



**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA**  
**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**MODELADO *IN SILICO* DE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS DEL  
ERITROCITO SANO E INFECTADO CON *PLASMODIUM FALCIPARUM***

**POR:**  
**DORIANA PATRICIA DORTA YOZZIA**  
**EC-46-10030**

Trabajo de graduación sometido a consideración por la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales Exactas y Tecnología, como requisito parcial para optar por el título de Licenciado en Biología con orientación en Microbiología y Parasitología

**PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ**  
**2018**

## **Dedicatoria**

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos.

A mi hermano Carlos Luis, mi mayor inspiración, por enseñarme a luchar por lo que deseo y trabajar hasta lograrlo. Esta tesis es para ti, sé que donde estés, has disfrutado como yo el haber hecho esta tesis interdisciplinaria. Aparecen, en la bibliografía de esta tesis, libros con los que tú estudiaste ingeniería mecánica; abrir esos libros y encontrar allí algunas notas escritas por ti, ha sido de los momentos más gratificantes durante este trabajo, y los que me motivaron a seguir en los momentos de dificultades.

A mi papá René Dorta, un ingeniero que ama la biología. Me ha mostrado que “desde la biología se puede llegar a cualquier parte”. Me ha enseñado a hacerme preguntas, a profundizar en este hermoso mundo de la investigación. Nos ha tocado vivir una historia parecida, aunque en direcciones opuestas: tú estudiaste ingeniería y trabajaste, rodeado de biólogos, desarrollando un modelo matemático; hoy mi tesis de biología, rodeada de ingenieros, desarrollando también un modelo matemático. Cómo disfruté cada conversación que tuvimos a lo largo de este trabajo.

A mi mamá Dorys Yozzia de Dorta, por todo su apoyo, paciencia y consejos a lo largo de mi carrera, por ser un ejemplo de lucha y constancia ante cualquier situación; gracias a ti, hoy he podido lograr una meta más en mi vida.

Finalmente, a una de las personas más importantes en mi vida: mi hermana Tana, por cada palabra de apoyo, por su ejemplo de emprendimiento, y por enseñarme cuándo la intuición –y no la pura razón- es la que debe guiarnos.

## Agradecimiento

A la Dra. Carmenza Spadafora, quien con su entusiasmo por la ciencia, más allá de ayudarme a resolver un problema de tesis, ha sido mi guía e inspiración para orientar el futuro de mi carrera hacia la investigación. Haber desarrollado mi tesis bajo su asesoría ha sido una experiencia verdaderamente enriquecedora.

Agradezco de una manera especial a la Dra. Guadalupe González por toda su dedicación y paciencia a lo largo de mi tesis; cada discusión que se generaba fue de gran aporte para mí, tanto en lo profesional como en lo personal. Al Profesor Carlos Plazaola, quien tuvo la paciencia de explicarme, las veces que fuera necesario, todas las sutilezas de los elementos finitos.

Agradezco también a la Dra. Mayteé Zambrano, al grupo de investigación de malaria del Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología INDICASAT-AIP y al grupo del Proyecto de Modelado Biológico de la UTP, quienes me han apoyado con esmero, tiempo, consejos y voluntad en la elaboración de mi tesis. Igualmente al Dr. Miguel Vargas por su incondicional apoyo en el uso del supercomputador donde utilizamos el software de simulación. Al Dr. Luis Mejía por permitirme el uso de sus equipos e instalaciones.

Agradezco a SENACYT Panamá por el financiamiento a través del proyecto 113-2015-4-FID14-174 con título "Análisis computacional de un sistema biológico para el diseño óptimo de experimentos *in vitro* e *in vivo*: caso de estudio, parásito de la malaria". A la Fundación Deveaux por su apoyo con la beca que cubrió mis gastos por un período de mi tesis. Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. México (IPIYCT) por haberme financiado una estancia en sus instalaciones para realizar experimentos que aportaron a mi tesis; en especial al Dr. Braulio Gutiérrez Medina quien con sus consejos, ideas y aportes hizo posible la parte experimental de esta investigación; al igual que al Dr. Said Aranda de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México (UASLP).

A la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología de la Universidad de Panamá, por la formación académica y profesional que allí recibí. Agradecimiento a mis asesores de la Universidad de Panamá, Dr. Alex O. Martínez Torres, Dra. Nidia Sandoval y Mgter. Ariandna Betancourt, por sus consejos y revisión del anteproyecto y de la tesis. También, quiero agradecer a mis profesores de la carrera por su dedicación, esfuerzo y enseñanzas a lo largo de toda mi formación.

## Índice general

Dedicatoria.....	ii
Índice general .....	v
Nomenclaturas Utilizadas.....	viii
Índice de tablas .....	x
Índice de figuras .....	xi
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	10
1. ANTECEDENTES BIOLÓGICOS.....	11
1.1. Notas históricas sobre la Malaria.....	11
1.1.1. La malaria y el Canal de Panamá (1905-1910) .....	12
1.2. Generalidades sobre la malaria .....	13
1.2.1. Transmisión .....	13
1.2.2. Síntomas .....	13
1.2.3. Taxonomía.....	13
1.2.4. Ciclo de Vida de <i>Plasmodium</i> .....	15
• Fase asexual. ....	15
• Fase Sexual .....	17
1.3. La malaria y sus efectos en el eritrocito.....	17
1.3.1. Estructura y deformación de la membrana del eritrocito .....	18
1.3.2. Cambios en las propiedades mecánicas de la célula al ser infectada por <i>P. falciparum</i> .....	19
1.4 PROPIEDADES ELECTROMECÁNICAS DE LOS MATERIALES .....	21
1.4. Propiedades mecánicas .....	21
1.4.1. Esfuerzo y deformación.....	22
1.4.2. Esfuerzo y tensión de corte.....	25
1.4.3. Elasticidad y plasticidad .....	26
1.5. Propiedades eléctricas.....	27
1.5.1. Conductores .....	27
1.5.2. Dieléctricos.....	29
1.6. Técnicas experimentales utilizadas para caracterizar las propiedades mecánicas de materiales biológicos .....	31

1.6.1.	Aspiración con micropipeta.....	31
1.6.2.	Deformación transitoria en campos eléctricos de alta frecuencia .....	32
1.6.3.	Pinzas Ópticas .....	33
1.6.4.	Microscopía de Fuerza Atómica.....	34
<b>CAPÍTULO II: METODOLOGÍA .....</b>		<b>36</b>
2.	Muestra biológica .....	38
2.1.1	Preparación de los eritrocitos .....	38
2.1.2	Preparación del medio .....	38
2.1.3	Preparación de la muestra biológica.....	39
2.2	Muestra biológica infectada.....	39
2.2.1	Preparación del suero humano.....	39
2.2.2	Preparación del medio suplementado .....	40
2.2.3	Cultivo de <i>P. falciparum</i> .....	40
2.2.4	Aislamiento de eritrocitos infectados con <i>P. falciparum</i> a través de una columna magnética.....	40
2.2.5	Preparación de la muestra biológica infectada .....	42
2.3	Elaboración del capacitor .....	43
2.4	Configuración del experimento .....	45
2.5	Ejecución del experimento .....	46
2.6	Procesamiento de imágenes.....	48
2.7	Relación electromecánica .....	48
2.8	Metodología computacional .....	52
	• <b>Método de los Elementos Finitos (FEM)</b> .....	52
	• <b>Simulación</b> .....	53
2.8.1	Simulación del eritrocito sano .....	54
2.8.2.	Geometría bicóncava para el eritrocito sano .....	54
2.8.3.	Definición de las propiedades de los materiales del eritrocito sano.....	56
2.8.4.	Mallado.....	57
2.8.5.	Definición de las condiciones de frontera .....	58
2.9	Geometría del eritrocito infectado en el estadio esquizonte.....	60
2.9.1	Geometría Eritrocito infectado .....	60
2.9.2	Definición de las propiedades de los materiales del eritrocito infectado. ....	60
<b>CAPÍTULO III: RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN .....</b>		<b>63</b>
3.	RESULTADOS EXPERIMENTALES .....	64
3.1.1	Resultados de los eritrocitos sanos .....	64

3.1.2 Resultados de los eritrocitos infectados con <i>P. falciparum</i> .....	69
<b>3.2. RESULTADOS COMPUTACIONALES</b> .....	72
3.2.1 Resultados eritrocito sano.....	72
3.2.2. Resultados eritrocito infectado con <i>P. falciparum</i> en el estadio de esquizonte .	75
<b>CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	80
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	81
<b>ANEXO A</b> .....	89
<b>ANEXO B</b> .....	89
<b>ANEXO C</b> .....	89
<b>ANEXO D</b> .....	89

## Nomenclaturas Utilizadas

Símbolo	
$l$	Longitud
$l_0$	Longitud inicial
$\Delta l$	Cambio en longitud coeficiente de alargamiento
$F_{\perp}$	Fuerza en tensión
$A$	Área
$\varepsilon$	Deformación
$E$	Módulo de elasticidad o Young
$\nu$	Coficiente de Poisson
$\tau$	Esfuerzo de corte
$\sigma$	Esfuerzo
$E_p$	La relación entre el acortamiento de una longitud situada en un plano perpendicular a la dirección de la carga aplicada
$E_a$	alargamiento longitudinal producido
$F_{\parallel}$	Fuerza que actúa tangente a la superficie
$d$	Distancia
$h$	Dimensión transversal
$S$	Módulo de corte
$ \vec{E} $	Magnitud de campo eléctrico
$F$	Fuerza
$J$	Flujo eléctrico/Densidad de corriente
$\theta$	Conductividad
$\rho$	Resistividad
$G$	Conductancia
$R_e$	Resistencia
$I$	Corriente eléctrica
$Q$	Carga
$P$	Polarización eléctrica
$\varepsilon_0$	Permitividad del vacío
$\chi_e$	Susceptibilidad eléctrica
$\varepsilon$	Permitividad
$C$	Capacitancia
$V$	Voltaje
$\varepsilon_i$	Permitividad relativa de la membrana del eritrocito
$\varepsilon_h$	Permitividad relativa del medio
$\varepsilon_{eff}$	Permitividad efectiva de la muestra biológica
$f$	Fracción de volumen de las partículas esféricas
$n$	Número de eritrocitos
$D_e$	Diámetro del eritrocito
$A_e$	Áreas de la sección transversal del eritrocito
$A_p$	Áreas de las placas
$F_{eritrocito}$	Fuerza ejercida sobre el eritrocito

$\ F_{eritrocito}\ $	fuerza promedio ejercida sobre el eritrocito
$A_m$	Área de la membrana
$P_o$	Perímetro inicial
$\pi$	Pi=3.141516
$r$	Radio
$a$	Longitud del eje x
$b$	Longitud del eje y
$P_e$	Perímetro final de la elipsoide
$x$	Eje horizontal
$y$	Eje vertical

## Índice de tablas

<b>Tabla I.</b> Taxonomía de <i>Plasmodium</i> .....	14
<b>Tabla II.</b> Especies que provocan malaria en el ser humano. ....	15
<b>Tabla III.</b> Conductividad de algunos materiales .....	28
<b>Tabla IV.</b> Efecto de la variación de la respuesta a distintos valores de frecuencia utilizando PBS. ....	47
<b>Tabla V.</b> Conductividad de las soluciones.....	47
<b>Tabla VI.</b> Datos de entrada y salida del experimento 1.....	66
<b>Tabla VII.</b> Módulo de Young por experimento.....	68
<b>Tabla VIII.</b> Datos de entrada y datos de salida de un eritrocito infectado con <i>P. falciparum</i> . .....	70

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Diagrama del ciclo de vida del parásito Plasmodium. Fuente: <a href="https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/">https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/</a> .....	16
<b>Figura 2.</b> La estructura de una membrana de eritrocitos humanos. Consiste en proteínas transmembrana, la bicapa lipídica y la red de espectrina subyacente. (Dao <i>et al.</i> , 2003). ...	18
<b>Figura 3.</b> Un objeto en tensión. La fuerza neta que actúa sobre el objeto es cero, pero el objeto se deforma. El esfuerzo de tensión (la razón de la fuerza al área de sección transversal) produce una deformación por tensión (el alargamiento dividido entre la longitud inicial). Se ha exagerado el alargamiento $\Delta l$ para claridad (Hugh & Freedman, 2009).....	22
<b>Figura 4.</b> Rango aproximado de valores para el módulo elástico de células biológicas y comparaciones con las de metales, cerámica y polímeros (Bao & Suresh, 2003). ....	24
<b>Figura 5.</b> Coeficiente de Poisson. Al aplicar una fuerza longitudinal ocurre un efecto transversal.....	24
<b>Figura 6.</b> Objeto sometido a un esfuerzo de corte. Se aplican fuerzas tangentes a superficies opuestas del objeto (en contraste con la situación de la Figura 3, donde las fuerzas actúan perpendiculares a las superficies) (Hugh & Freedman, 2009). ....	26
<b>Figura 7.</b> Relación esfuerzo-deformación de un material en todas sus etapas (Hugh & Freedman, 2009).....	27
<b>Figura 8.</b> Pictórico de un conductor eléctrico (Barco Ríos <i>et al.</i> , 2012). ....	28
<b>Figura 9.</b> Dipolos eléctricos en presencia de un campo eléctrico.....	29
<b>Figura 10.</b> Orientación de los dipolos (A) sin campo eléctrico, (B) al aplicar campo eléctrico. ....	30
<b>Figura 11.</b> Pictórico de un capacitor de placas paralelas.....	30
<b>Figura 12.</b> Aspiración con micropipeta. (a) Aspiración de un eritrocito sano (b) Aspiración de un eritrocito hinchado. (c) Aspiración de un eritrocito infectado con <i>P. falciparum</i> en la etapa de esquizonte (Hochmuth, 2000; Zhou <i>et al.</i> , 2005).....	32
<b>Figura 13.</b> Deformación aplicando campo eléctrico. Se muestra un único eritrocito en diferentes estados de deformación causados por un campo eléctrico de alta frecuencia. Las intensidades de campo eléctrico correspondientes son de izquierda a derecha 5, 20, 35, 50, 150, 0 kV/m, respectivamente (Engellhardt & Sackmann, 1983).....	32
<b>Figura 14.</b> Deformaciones con pinzas ópticas. Observaciones experimentales de la deformación del eritrocito aplicando fuerzas de 0 a 340 pN (Dao <i>et al.</i> 2003).....	34
<b>Figura 15.</b> AFM mide la topografía y la deformación de los eritrocitos. (A) Topografía de RBC normales. (B) Textura detallada de la superficie de la membrana del eritrocito. (C) Medición de profundidad mediante penetración de la punta (Kim <i>et al.</i> , 2012).....	35
<b>Figura 16.</b> Configuración para el aislamiento de esquizontes. (A) Columnas LS, un separador MidiMACS Magnético y MultiStand MACS de Miltenyi BioTec. (B) Pellet de eritrocitos infectados en etapas tardías del parásito después de haberlo pasado por la columna magnética y centrifugado.....	42
<b>Figura 17.</b> Diagrama del capacitor diseñado. ....	43

<b>Figura 18.</b> Posicionamiento de las placas (electrodos). (A) Corte de las hojillas. (B) Cinta adhesiva sobre el portaobjeto dejando una separación entre ellas sumamente pequeña (C) Colocar la hojilla que no está cortada en la cinta adhesiva (D) Por último se coloca el cubreobjeto sobre las Gillette. ....	44
<b>Figura 19.</b> Configuración final del capacitor puesto en el microscopio. (A) Colocación de la muestra en el microcanal. (B) Muestra en el microcanal sellado con cera de vela derretida. (C) Muestra en el microscopio para aplicar campo eléctrico gradualmente. ....	44
<b>Figura 20.</b> Equipos utilizados en el experimento. (A) Medidor de señales. (B) Generador de señales. (C) Microscopio. (D) Computador. ....	45
<b>Figura 21.</b> Circuito eléctrico del experimento. ....	45
<b>Figura 22.</b> Imagen de un eritrocito polarizado a bajo voltaje. ....	46
<b>Figura 23.</b> Prueba de frecuencia y eritrocitos en EDTA + PBS. (A) sin campo eléctrico. (B) expuestos a campo eléctrico a una frecuencia de 100 KHz a 8 Vpp. Esta imagen fue tomada utilizando un objetivo de 60X. ....	47
<b>Figura 24.</b> Imagen de un eritrocito con sus medidas. A) Medida horizontal (eje x), B) Medida vertical (eje y). ....	48
<b>Figura 25.</b> Diagrama del eritrocito sometido a un campo eléctrico (A) a un voltaje bajo pero creando la polarización de Wagner-Maxwell y (B) a un voltaje mayor creando la elongación. ....	49
<b>Figura 26.</b> Diagrama de cuerpo libre. (A) Eritrocito en condición de equilibrio. (B) Corte transversal para analizar cómo las fuerzas internas se producen en la membrana del eritrocito. ....	50
<b>Figura 27.</b> Perímetro del eritrocito antes y después del cambio de forma. ....	51
<b>Figura 28.</b> Eritrocito en el capacitor (A) Eritrocito fijo en uno de los electrodos. (B) Eritrocito deformado cuando el campo eléctrico ejerce fuerza sobre él. ....	54
<b>Figura 29.</b> Modelado para el eritrocito sano. (A) Generación de puntos internos y externos. (B) Generación de curvas internas y externas. (C) Generación de áreas y volúmenes. ....	55
<b>Figura 30.</b> Geometría bicóncava con asideros. ....	56
<b>Figura 31.</b> Interfaz material elástico isotrópico en ANSYS. ....	57
<b>Figura 32.</b> Mallado. ....	58
<b>Figura 33.</b> Asignación de las condiciones de frontera. (A) Definición de la unión entre membrana y citoplasma como una soldadura. (B) Definición de la unión entre la membrana y los asideros como una soldadura. ....	58
<b>Figura 34.</b> Asignación de la fuerza. En el extremo A se fija la geometría y en el extremo B se aplica la fuerza en dirección X. ....	59
<b>Figura 35.</b> Geometría eritrocito infectado en el estadio de esquizonte. ....	60
<b>Figura 36.</b> Propiedades del material para el eritrocito infectado. ....	62
<b>Figura 37.</b> Elongación de eritrocitos producto de la variación de voltaje a 1 MHz. Esta imagen fue tomada utilizando un objetivo de 100X. ....	65
<b>Figura 38.</b> Desplazamiento vs Fuerza. ....	66
<b>Figura 39.</b> Esfuerzo vs Deformación. ....	67
<b>Figura 40.</b> Comportamiento de un material. ....	69
<b>Figura 41.</b> Eritrocitos infectados con <i>P. falciparum</i> . Variación de voltaje 0 a 2.85V a 1 MHz. Imagen tomada utilizando un objetivo de 100X. ....	70
<b>Figura 42.</b> Efecto del campo eléctrico sobre eritrocito sano y cuando está infectado con <i>P. falciparum</i> . ....	71
<b>Figura 43.</b> Mapa de colores del esfuerzo normal (stress) para una fuerza de 112 pN. ....	73

<b>Figura 44.</b> Corte transversal de la geometría. Esfuerzo normal en la dirección x (stress) para una fuerza de 112 pN.....	73
<b>Figura 45.</b> Deformación (strain) para una fuerza de 112 pN.....	74
<b>Figura 46.</b> Corte transversal de la geometría. Deformación normal en la dirección x (strain) para una fuerza de 112 pN.....	74
<b>Figura 47.</b> Desplazamiento en el eje x para una fuerza de 112 pN. ....	75
<b>Figura 48.</b> Desplazamiento en el eje x para una fuerza de 3 pN. ....	76
<b>Figura 49.</b> Mapa de colores del esfuerzo normal (stress) para una fuerza de 3 pN.....	76
<b>Figura 50.</b> Deformación (strain) para una fuerza de 3 pN.....	77

# **RESUMEN**

La malaria sigue siendo la enfermedad parasitaria más grave y extendida en el mundo. A lo largo de los siglos se ha expandido a 91 países, costando miles de millones de vidas. Cuando el parásito de la malaria, del género *Plasmodium*, entra al torrente sanguíneo, invade los eritrocitos o glóbulos rojos y, a medida que crece, genera importantes efectos fisiopatológicos, afectando en particular, las propiedades mecánicas de estas células. Las propiedades mecánicas juegan un papel importante en la fisiología celular. En el caso de los eritrocitos, su capacidad de deformarse (para poder pasar a través de los pequeños capilares) es fundamental para cumplir con el rol de intercambio de oxígeno en el cuerpo. Un cambio en los valores de elasticidad y de capacidad para deformarse puede significar afecciones patológicas genéticas o adquiridas.

En base a la experiencia de áreas como la ingeniería, donde se utilizan modelos computacionales para reducir los costos de diseño y prototipo, se vienen desarrollando modelos también para sistemas biológicos. De esa forma, se procura entender mejor los sistemas con costos de experimentación mucho menores. En este trabajo se modela un eritrocito sano e infectado con *P. falciparum*. Para realizar el modelado computacional utilizamos ANSYS, un software basado en el método de elementos finitos. El modelo requiere como parámetros de entrada la caracterización mecánica del material, en nuestro caso, de la célula. Básicamente, los parámetros requeridos son el coeficiente de Poisson y el módulo de elasticidad (o módulo de Young). La exhaustiva revisión bibliográfica sobre modelado celular permitió determinar un valor adecuado para el coeficiente de Poisson. Por otra parte, procedimos a la realización de experimentos de aplicación de fuerzas (mediante campo eléctrico) a muestras de eritrocitos para determinar su módulo de elasticidad. Con esos valores se simuló la aplicación de diferentes rangos de fuerza y se observó los esfuerzos, las deformaciones y los desplazamientos que ocurrían en el modelo del eritrocito. El valor determinado experimentalmente para módulo de elasticidad concuerda con los valores reportados en la literatura. Los desplazamientos indicados por el modelo se corresponden también a los reportados en varios trabajos sobre el tema; los esfuerzos y deformaciones presentan discrepancia con valores reportados anteriormente.

**Palabras Claves: eritrocito, elasticidad, módulo de Young, propiedades mecánicas, capacitor.**

# **ABSTRACT**

Malaria remains the most serious and widespread parasitic disease in the world. Over the centuries it has expanded to 91 countries, costing billions of lives. When the malaria parasite, of the genus Plasmodium, enters the bloodstream, it invades the erythrocytes or red blood cells and, as it grows, it generates important physiopathological effects, affecting, in particular, the mechanical properties of these cells. The mechanical properties play an important role in cellular physiology. In the case of erythrocytes, their capacity to deform (to be able to pass through small capillaries) is fundamental to fulfill the role of oxygen exchange in the body. A change in the values of elasticity and ability to deform can mean genetic or acquired pathological conditions.

Based on the experience of areas such as engineering, where computational models are used to reduce design and prototype costs, models are also being developed for biological systems. In this way, we try to better understand the systems with much lower experimentation costs. In this work, a healthy erythrocyte infected with *P. falciparum* is modeled. To perform computer modeling we use ANSYS, a software that is based on the finite element method. The model requires as input parameters the mechanical characterization of the material, in our case, of the cell. Basically, the parameters required are the Poisson's coefficient and the modulus of elasticity. The exhaustive bibliographic review on cellular modeling allowed determining a suitable value for the Poisson's coefficient. On the other hand, we proceeded to carry out experiments to apply forces (by electric field) to samples of erythrocytes to determine their modulus of elasticity. With these values, the application of different strength ranges was simulated and the stresses, deformations and displacements that occurred in the erythrocyte model were observed. The value determined experimentally for modulus of elasticity (Young's modulus) agrees with the values reported in the literature. The displacements indicated by the model also correspond to those reported in several works on the subject; the efforts and deformations present discrepancy with values reported previously.

**Keywords— elasticity, erythrocyte, mechanical properties, Young moduli, capacitor.**

# **INTRODUCCIÓN**

La malaria, o paludismo es una enfermedad potencialmente mortal causada por el protozoo del género *Plasmodium* (*P*) que se transmite al ser humano por la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles* previamente infectados. Según las últimas estimaciones publicadas en diciembre de 2016, en 2015 se registraron 212 millones de casos de paludismo que ocasionaron la muerte de unas 429,000 personas. Entre 2010 y 2015, la incidencia de la enfermedad se ha reducido en un 21% a nivel mundial y la tasa de mortalidad ha disminuido en un 29%. Se calcula que desde 2001, se ha evitado unas 6.8 millones de muertes por paludismo (WHO, 2017b).

El informe mundial sobre la malaria del año 2017 muestra que, después de un período sin precedentes de éxito en el control mundial de la malaria, el progreso se ha estancado. En 2016, hubo un estimado de 216 millones de casos de malaria, un aumento de alrededor de 5 millones de casos comparados con las cifras del 2015. Las muertes llegaron a 445,000, un número similar al del año anterior (WHO, 2017a), recordándonos que estamos todavía lejos de controlar esa enfermedad.

En Panamá, se han confirmado casos de malaria a través de microscopía desde el año 2000. Recientemente, el Ministerio de Salud (MINSAL) de la República de Panamá, reportó en noviembre de 2017, un total de 614 casos confirmados, de los cuales, de *P. vivax* fueron 609 (584 autóctonos y 25 importados) y de *P. falciparum*, 5 (todos importados) ( Cerezo, 2017). Aunque ha habido un descenso de la malaria en Panamá, se han dado repuntes en algunos años, como sucedió en el 2004, por lo que no se puede cesar de trabajar en intervenciones contra esta enfermedad ( Cerezo, 2017).

La infección por el género *Plasmodium* es más frecuente en áreas rurales, en zonas suburbanas y en grandes concentraciones humanas no urbanizadas, donde las condiciones de vida están deterioradas por la pobreza, la explotación laboral y la marginación social. En ese entorno, las condiciones sanitarias suelen ser muy deficientes y la protección frente al mosquito, mínima (Health Organization, 2016).

Se ha identificado alrededor de 150 especies del género *Plasmodium*, siendo de relevancia aquellas que se han adaptado al hospedero humano. Los eritrocitos pueden ser infectados por cinco especies diferentes de *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P.*

*malariae*, *P. ovale* y en algunos casos, por *P. knowlesi* (Flores, 2014). Entre ellos, *P. vivax* y *P. falciparum* son los más peligrosos. El *P. vivax* está ampliamente extendido y sigue causando un problema de morbilidad mientras que *P. falciparum* es la especie responsable de la mayoría de las muertes relacionadas con el paludismo (Diez-Silva, Dao, Han, Lim, & Suresh, 2010).

Los tratamientos estándar para la malaria son básicamente la administración de drogas específicas y combinaciones de drogas, siendo la quinina una de las que más tiempo se ha utilizado, pero que es muy poco usada en la actualidad debido a su ineficacia. El éxito de los tratamientos combinados ha sido relativo, sobre todo, si tenemos en cuenta que se ha observado el desarrollo de resistencia del parásito a varios de estos medicamentos, tales como la artemisinina, piperaquina, o cloroquina, entre otros (Imwong, Hien, Thuy-Nhien, Dondorp, & White, 2017). Esta situación ha hecho pensar en enfoques alternativos en la lucha contra esta mortal enfermedad.

Tradicionalmente, las causas de las enfermedades han sido estudiadas en términos de genética y de traducción de señales químicas. Estudios recientes han demostrado que las interacciones físicas, es decir las excitaciones electromagnéticas y el ambiente mecánico en general, pueden cambiar el funcionamiento celular y contribuir al desarrollo de ciertas enfermedades. Incluso una ligera variación de las fuerzas que actúan sobre las células altera el funcionamiento normal de las mismas y a menudo, conducen a lo que se denomina un estado patológico (Uzonwanne Obiageli, 2014).

De allí, el interés en conocer la relación entre las propiedades mecánicas de la célula y ciertas enfermedades, entre ellas, la malaria. Las propiedades mecánicas juegan un papel importante en la fisiología de las células, pues son clave en la relación estructura-estrés (entendiéndose por estrés, los cambios causados por fuerzas externas). Así pues, también deben estudiarse las propiedades mecánicas de las células vivas para comprender su respuesta al estrés mientras circulan dentro del cuerpo. Las propiedades mecánicas de los eritrocitos infectados con el parásito de la malaria cambian con la progresión de los estadios de la enfermedad y tienen efectos importantes sobre los resultados fisiopatológicos. Por lo tanto, es necesario cuantificar la contribución de los componentes subcelulares, en

particular del parásito, dentro de la célula, con el fin de determinar con mayor precisión el cambio en la deformación.

Desde la aparición de la mecánica celular en los años 60, las técnicas experimentales para investigar las propiedades mecánicas de las células biológicas se han desarrollado muy rápidamente. Para investigar la deformación de las células, se han aplicado herramientas y técnicas tales como: filtración celular, reoscopía, microfluídica, aspiración por micropipetas, pinzas ópticas y deformación transitoria en campos eléctricos de alta frecuencia (Bao & Suresh, 2003).

En base a la experiencia desarrollada en áreas como la ingeniería, se han desarrollado modelos computacionales de sistemas biológicos. En el caso de la ingeniería, se utiliza métodos, tales como el método de elementos finitos, para realizar diversos tipos de análisis, reduciendo así los costos de diseño y de construcción de prototipos; similarmente, desde hace algunos años, se viene utilizando también en el ámbito biológico los modelos, esta vez para reducir la realización de costosos experimentos de laboratorio. Así se han desarrollado, por ejemplo, modelos basados en elementos finitos para huesos, dientes y órganos, así como también para el modelado celular, el cual es mucho más complejo.

Si bien hay abundante literatura sobre las propiedades mecánicas de los eritrocitos y sus cambios a consecuencia de la infección con *Plasmodium*, aún se requiere cuantificar con mayor precisión los parámetros que caracterizan el material celular. En este proyecto de investigación, se modelará el eritrocito sano y el eritrocito infectado con *P. falciparum*, para comparar los cambios mecánicos en su estructura al ser sometidos a excitaciones externas y así, analizar cómo estos cambios afectan el comportamiento del eritrocito.

El objetivo general de este trabajo es modelar computacionalmente, utilizando el método de Elementos Finitos, eritrocitos sanos e infectados con *Plasmodium falciparum* para evaluar su deformación y elasticidad. Para alcanzar esto, se plantearon tres objetivos específicos:

- a) Desarrollar un modelo computacional para el eritrocito sano.
- b) Desarrollar un modelo computacional para el eritrocito infectado con *Plasmodium falciparum* en la etapa tardía.

- c) Realizar experimentos en laboratorio para caracterizar el material a utilizar en las simulaciones cuando se represente el eritrocito.

# **CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

# 1. ANTECEDENTES BIOLÓGICOS

La malaria, o paludismo, es una enfermedad potencialmente mortal causada por el protozoo del género *Plasmodium* que se transmite al ser humano por la picadura de mosquitos hembras del género *Anopheles* previamente infectados. El *Plasmodium* tiene un ciclo de vida sexual (que se da en el mosquito) y otro asexual (que se da en el humano). En 2016, se estima que hubo 216 millones de casos de malaria y unas 445,000 muertes a nivel mundial (WHO, 2017a). Uno de los mayores obstáculos para el control de la malaria ha sido la propagación de la resistencia a los medicamentos utilizados a gran escala (Travassos & Laufer, 2009).

En Panamá, se han confirmado casos de malaria, a través de microscopía, desde el año 2000, reportándose cada cinco años así: 1036 casos para el 2000, el 2005 con 3667, el 2010 con 418, el 2015 con 562 casos. Durante ese lapso se registraron cuatro muertes. Para el 2016 el total de muestras examinadas fue de 50,772, resultando un acumulado de 811 muestras positivas; 773 *P. vivax* (748 autóctonos y 25 importados) y 38 *P. falciparum* (21 autóctonos y 17 importados). Concluye ese año con 249 casos más en comparación al año 2015 (Cerezo, 2016). En noviembre de 2017, el Ministerio de Salud (MINSAL) de la República de Panamá, reportó un total de 614 casos confirmados para dicho año; de los cuales, de *P. vivax* fueron 609 (584 autóctonos y 25 importados) y de *P. falciparum*, 5 (todos importados) (Cerezo, 2017).

Las áreas con mayor incidencia de malaria en Panamá son las comarcas y la provincia de Darién, lo que se debe en parte a su clima y a condiciones favorables para el hábitat del mosquito *Anopheles* (Cerezo, 2015).

Debido a que esta enfermedad es el centro de nuestro estudio, en este capítulo se presentará una breve reseña histórica de la malaria, sus generalidades y su efecto en el eritrocito, el cual es el hospedero del parásito.

## 1.1. Notas históricas sobre la Malaria

La malaria es una de las enfermedades más antiguas que existen pues ha estado presente en la vida del hombre desde la prehistoria, debido a las condiciones en que

vivía. El primer registro escrito sobre la malaria es de la antigua China, 2700 A. C. Los antiguos romanos y griegos también describieron los síntomas de la malaria, aunque ninguno de estos pueblos antiguos conocía la verdadera causa ni había identificado específicamente cómo se transmitía.

En el siglo XIX, en la década de 1880, Charles Louis Alphonse Laveran observó por primera vez los parásitos que causan la malaria en la sangre de un paciente y unos años más tarde, en 1897-1898, Ronald Ross descubrió que los parásitos se transmitían entre los huéspedes a través de los mosquitos, sentando así las bases para las futuras décadas de esfuerzos en el control de la enfermedad. La comprensión del ciclo del mosquito llevó a una serie de nuevos enfoques en el control de vectores a principios del siglo XX; sin embargo, la profilaxis y la terapia de la malaria continuaron recurriendo a los remedios ya existentes, como el uso de la corteza de cinchona y qinghao, los mismos que se usaron para tratar la malaria de forma efectiva durante cientos de años antes de conocer el ciclo del mosquito. Hoy las quininas (derivadas de la corteza de cinchona) y la artemisinina (de qinghao) siguen siendo de gran importancia en el control de la malaria. La malaria fue una de las primeras enfermedades tratadas por un compuesto químico aislado de una planta (la quinina aislada de la corteza de cinchona en 1820) (Meshnick & Dobson.; Talisuna, Bloland, & D'Alessandro, 2004).

### **1.1.1. La malaria y el Canal de Panamá (1905-1910)**

La construcción del Canal de Panamá fue posible sólo después de que la fiebre amarilla y la malaria fueron controlados en la zona. Estas dos enfermedades fueron la principal causa de enfermedad y muerte entre los trabajadores de la zona. En 1906, había más de 26,000 empleados que trabajaban en el Canal y, de estos, más de 21,000 fueron hospitalizados por paludismo en algún momento de su trabajo. Más tarde, en 1912, había más de 50,000 empleados y el número de trabajadores hospitalizados disminuyó aproximadamente a 5,600. A través del liderazgo y los esfuerzos de William Crawford Gorgas, Joseph Augustin LePrince, y Samuel Taylor Querida, la fiebre amarilla fue eliminada y la incidencia del paludismo se redujo notablemente a través de un programa integrado de control de insectos y paludismo (“Paludismo, La historia del paludismo”).

## **1.2. Generalidades sobre la malaria**

Para conocer más sobre la malaria y entender un poco su complejidad es clave profundizar en aspectos tales como la forma en que se transmite, la sintomatología y la complejidad de su ciclo de vida desde que se encuentra en el vector hasta el hospedero humano.

### **1.2.1. Transmisión**

La malaria se puede transmitir por contacto con una jeringa contaminada, transfusiones de sangre, de madre al hijo durante el embarazo, pero la mayoría de los casos se da por la picadura de mosquitos hembras del género *Anopheles* que son los vectores del parásito *Plasmodium* y donde se lleva a cabo la fase asexual de la reproducción del parásito. Alrededor de 30 especies son las principales en transmitir la malaria.

Los mosquitos hembras *Anopheles* necesitan sangre para nutrir sus huevos, y siendo su hábitat acuático, la mayor incidencia de transmisiones se da en la temporada lluviosa en las zonas tropicales (WHO, 2016).

### **1.2.2. Síntomas**

La malaria es una enfermedad febril aguda. En una persona no inmune, los síntomas generalmente aparecen 10-15 días después de la picadura del mosquito infectante. Los primeros síntomas (fiebre, dolor de cabeza y escalofríos) pueden ser leves y difíciles de reconocer como malaria. Si no se trata dentro de las 24 horas, la malaria por *P. falciparum* puede progresar a una enfermedad grave, que a menudo conduce a la muerte.

Los niños con malaria severa con frecuencia desarrollan uno o más de los siguientes síntomas: anemia severa, dificultad respiratoria en relación con la acidosis metabólica o malaria cerebral. En adultos, la afectación de múltiples órganos también es frecuente. En áreas endémicas de malaria, las personas pueden desarrollar inmunidad parcial, lo que permite que ocurran infecciones asintomáticas (WHO, 2017b).

### **1.2.3. Taxonomía**

En la parasitología al igual que en otras áreas de las ciencias médicas, sería difícil el estudio y más aún el aprendizaje sin el ordenamiento taxonómico existente. El parásito que

nos interesa en este estudio es un protozoo cuya taxonomía se indica en la Tabla I.

**Tabla I.** Taxonomía de *Plasmodium*.

<b>Reino</b>	<b>Protozoa</b>
<b>Filo</b>	Apicomplexa
<b>Clase</b>	Aconoidasida
<b>Orden</b>	Haemosporida
<b>Familia</b>	Plasmodiidae
<b>Género</b>	<i>Plasmodium</i>

(Ash, 2007)

En la Tabla II, podemos ver los porcentajes de incidencia por las especies que provocan malaria en el ser humano.

El *P. falciparum* causa la forma más virulenta de la malaria en los seres humanos. Se diferencia de las especies mencionadas anteriormente en que solo las formas de anillo intra-eritrocíticas menos maduras se encuentran en la sangre circulante, mientras que las formas pigmentadas más maduras (trofozoítos y esquizontes) son secuestradas en la microvasculatura de los órganos internos. La clave para la fisiopatología de la malaria por *P. falciparum* es la modificación que hace el parásito al eritrocito hospedero afectando las propiedades de la membrana durante la etapa asexual del parásito, la cual veremos con mayor profundidad en la sección 1.3.2. La severidad de la infección de *P. falciparum* es una función del grado de obstrucción capilar causado por eritrocitos infectados en órganos como bazo, hígado, riñón y cerebro. Tal obstrucción dará lugar a la limitación del flujo sanguíneo y puede conducir a una disminución en la distribución de oxígeno y nutrientes a los órganos vitales, y la eliminación de los residuos tóxicos como el ácido láctico (Diez-Silva *et al.*, 2010; Guyue, 2009; Jiménez, 2005).

**Tabla II.** Especies que provocan malaria en el ser humano.

<b>Especies causantes de malaria en el ser humano</b>	<b>Porcentaje de incidencia</b>
<i>Plasmodium vivax</i>	43% de los casos
<i>Plasmodium falciparum</i>	50% de los casos
<i>Plasmodium malariae</i>	7% de los casos
<i>Plasmodium ovale</i>	Muy baja incidencia
<i>Plasmodium knowlesi</i>	En el sudeste de Asia

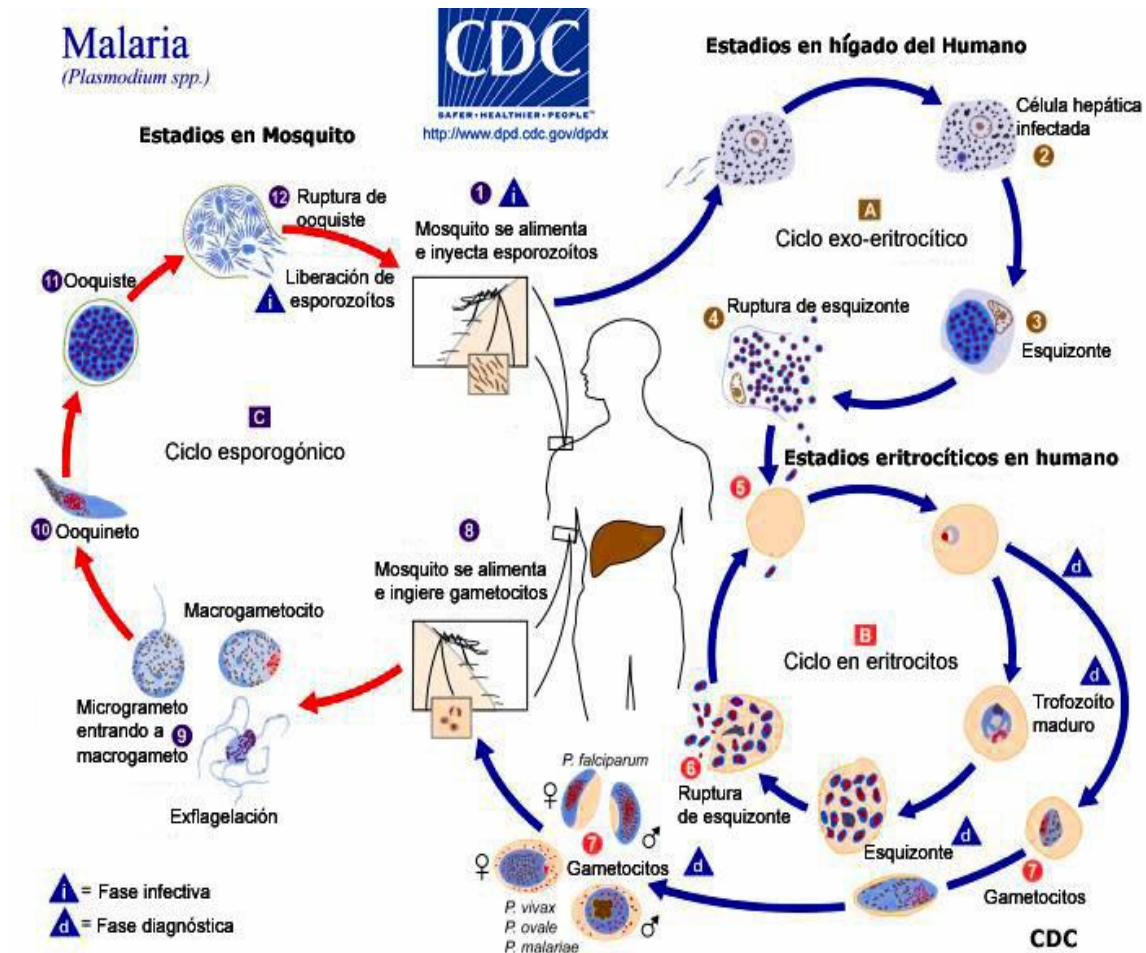
Fuente: J. Flores *et al.*, “Género Plasmodium,” 2014:  
<http://babia.cbm.uam.es/~lab302/Tema25Plasmodium.pdf>.

#### **1.2.4. Ciclo de Vida de *Plasmodium***

El ciclo de vida del parásito de la malaria incluye dos fases. La fase asexual se lleva a cabo en el humano quien es el hospedero intermediario y la fase sexual que se lleva a cabo en el mosquito, quien es un agente vector.

- **Fase asexual.**

El ser humano es infectado después de ser picado por un mosquito hembra del género *Anopheles* (el cual está infectado con malaria). Mientras el mosquito succiona la sangre, los esporozoítos parasitarios son transportados a través de la saliva del insecto hacia la circulación periférica (ver Figura 1). Estos esporozoítos se trasladarán al hígado, donde pueden invadir la célula hepática. Entre 7 y 9 días más tarde, un esporozoíto puede desarrollarse en miles de merozoítos y estos merozoítos serán liberados de nuevo a la circulación periférica para invadir e infectar otros eritrocitos sanos (*P. vivax* y *P. ovale* pueden presentar un estadio latente [hipnozoítos] pudiendo persistir en el hígado y causar recaídas al invadir el torrente sanguíneo semanas, o incluso años después). Después de esta replicación inicial en el hígado (esquizogonia exoeritrocítica), los parásitos experimentan la multiplicación asexual en los eritrocitos (esquizogonia eritrocítica).



**Figura 1.** Diagrama del ciclo de vida del parásito *Plasmodium*. Fuente: <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/>

Los merozoítos invaden los eritrocitos y una vez dentro de la célula hospedera, consumen la hemoglobina como su fuente de alimento, madurando desde la etapa de anillo hasta los trofozoítos de etapa media, y finalmente, a los esquizontes de fase tardía, en aproximadamente 48 horas. Después de la maduración, el eritrocito infectado en la fase esquizonte se romperá y liberará de 12 a 20 merozoítos, de nuevo en la sangre y perpetuará el ciclo. Mientras tanto, algunos merozoítos invasores se diferencian en formas sexuales (gametocitos) masculinas (microgametocitos) y femeninas (macrogametocitos). Si otro mosquito se alimenta de la sangre que contiene tal forma sexual de parásitos, se infecta. Los parásitos en etapa sanguínea son responsables de las manifestaciones clínicas de la enfermedad (CDC, 2017; Miller, Baruch, Marsh, & Doumbo, 2002).

- **Fase Sexual**

Los gametocitos, machos (microgametocitos) y hembras (macrogametocitos), son ingeridos por un mosquito *Anopheles* durante una succión de sangre. La multiplicación de los parásitos en el mosquito se conoce como ciclo esporogónico. Mientras está en el estómago del mosquito, los microgametocitos penetran en los macrogametocitos generando cigotos. Los cigotos a su vez se vuelven móviles y alargados (ooquinetos). Los ooquinetos invaden la pared del intestino medio del mosquito, donde se convierten en ooquistes. Los ooquistes crecen, se rompen y se liberan (esporozoítos). Los esporozoítos hacen su camino a las glándulas salivales del mosquito. La inoculación de los esporozoítos en un nuevo hospedero humano, perpetúa el ciclo de vida de la malaria tal como se puede observar en la Figura 1 (CDC, 2017).

### **1.3. La malaria y sus efectos en el eritrocito.**

El eritrocito es uno de los cuatro constituyentes de la sangre, con un volumen de alrededor de 4.5 millones de células por milímetro cúbico, que gana el título del mayor componente de la sangre. Los eritrocitos se forman en la médula ósea, viven alrededor de 120 días y se destruyen en el bazo. Aunque la membrana de los eritrocitos representa sólo el 1% del peso del mismo, desempeña un papel muy importante en el mantenimiento de la integridad celular (Uzonwanne & Obiageli, 2014). Ella presenta una morfología de discocito y es de aproximadamente 7.5 a 8.7  $\mu\text{m}$  de diámetro y de 1.7 a 2.2  $\mu\text{m}$  de espesor (Fung, 1981).

Los eritrocitos son únicos entre las células de mamíferos. No contienen núcleo ni estructuras metabólicas subcelulares. Durante su vida, los eritrocitos viajan miles de kilómetros a través de tubos de varios tamaños mientras suministran oxígeno a los tejidos. La supervivencia de prácticamente todas las demás células del cuerpo depende del correcto funcionamiento de los eritrocitos. Viajan como células individuales, que contienen una solución concentrada de hemoglobina rodeada por una membrana. A pesar de su aparente simplicidad, tienen una capacidad metabólica limitada (pero necesaria). Están expuestos a un alto contenido de oxígeno y entran en contacto con una variedad de productos químicos

endógenos y exógenos. Su capacidad de sobrevivir depende de la capacidad de la membrana para mantenerse intacta y flexible (Smith, 1987).

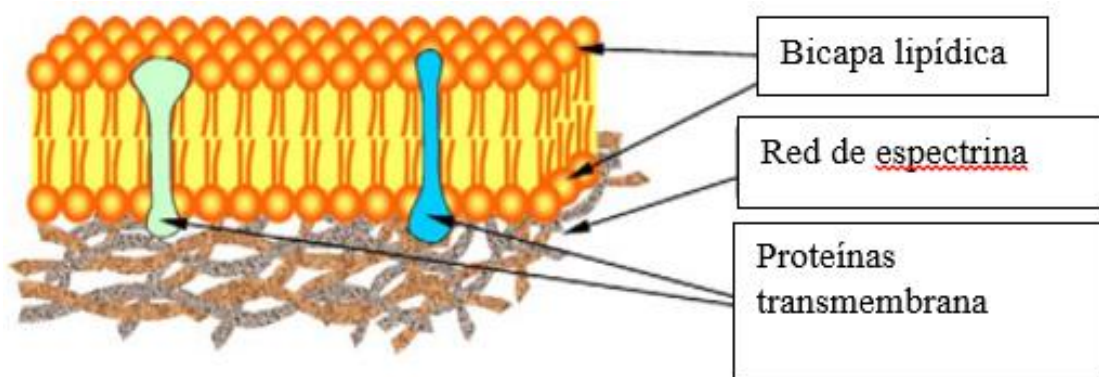
### 1.3.1. Estructura y deformación de la membrana del eritrocito

Los eritrocitos poseen una capacidad única para experimentar deformación celular al navegar a través de diversos vasos de microcirculación humana, permitiéndoles atravesar capilares que son más pequeños que su diámetro, para llevar a cabo así su papel como portadores de oxígeno entre la sangre y los tejidos (Wang & Popel, 1993). En condiciones normales, la deformación de los eritrocitos está determinada principalmente por las estructuras de la corteza de la membrana del mismo, una estructura multicomponente, formada de tres capas (ver Figura 2.):

- Bicapa de fosfolípidos con un grosor de 4-5 nm.
- Proteínas transmembranales.
- Citoesqueleto de espectrina.

El citoesqueleto es de malla triangular, unida a las bicapas de superficie. El tamaño de malla de la red de espectrina es de 60-80 nm. La red de espectrina está anclada a la bicapa de fosfolípidos a través de complejos funcionales y proteínas de anquirina. Los complejos de unión y las proteínas de anquirina pueden difundirse en la membrana lipídica (Dao, Lim, & Suresh, 2003; Kim, Kim, & Park, 2012).

La deformación de los eritrocitos es crucial para su supervivencia mientras están en circulación. La deformación se define como la capacidad de la célula de sufrir grandes



**Figura 2.** La estructura de una membrana de eritrocitos humanos. Consiste en proteínas transmembrana, la bicapa lipídica y la red de espectrina subyacente. (Dao *et al.*, 2003).

cambios morfológicos y recuperar su forma normal -al liberarse la carga o fuerza causante de la deformación- sin fragmentación o pérdida de su integridad.

En general, la deformación celular de los eritrocitos depende de tres factores:

- Tamaño y forma de las células (particularmente la relación superficie-volumen).
- Viscoelasticidad de la membrana celular.
- Viscosidad y estado del citoplasma (normalmente la viscosidad citoplasmática, pero en la malaria, la presencia del parásito afecta la deformación) (Nash, 1989).

### **1.3.2. Cambios en las propiedades mecánicas de la célula al ser infectada por *P. falciparum***

Es fundamental para la fisiopatología de la malaria por *P. falciparum* el secuestro de eritrocitos que contienen las formas maduras del parásito en la microcirculación de órganos vitales. La reducción de la deformación de los eritrocitos perjudica el flujo microcirculatorio, ya que estos deben deformarse considerablemente para pasar a través de los capilares, que tienen diámetros mucho más pequeños que los propios eritrocitos. También es probable que una deformación reducida contribuya al aclaramiento esplénico de los eritrocitos infectados, ya que las células deben pasar a través de pequeños espacios intercelulares en las sinusoides del bazo. Este es uno de los mecanismos por los cuales el bazo elimina los eritrocitos envejecidos. Estudios previos han demostrado que los eritrocitos infectados con *P. falciparum* se vuelven progresivamente menos deformables en las etapas maduras (trofozoíto y esquizonte) y la célula infectada se vuelve más esférica perdiendo así su forma bicóncava convencional (Suresh, 2006; Suwanarusk *et al.*, 2004; Ye, Phan-Thien, Khoo, & Lim, 2013).

Las protuberancias (rosetas) que se forman en la superficie de los eritrocitos durante los estadios finales de trofozoíto y esquizonte sirven como sitios de adhesión para la unión del eritrocito infectado a eritrocitos sanos, otros eritrocitos infectados, células dendríticas y superficies endoteliales (Suresh, 2006). El cambio en la forma geométrica, el desarrollo de propiedades de citoadherencia y la formación de rosetas en los eritrocitos dan como resultado un flujo obstruido de eritrocitos a través de la microvasculatura y un deterioro del

aclaramiento del bazo; siendo todos estos factores la clave para la patogenicidad de *P. falciparum* malaria (Suresh, 2006; Suwanarusk *et al.*, 2004).

El aumento de citoadherencia y la disminución de la deformabilidad de los eritrocitos infectados a menudo se consideran como factores cruciales en la patología de la malaria. La severidad de la infección de *P. falciparum* es una función del grado de obstrucción capilar causado por eritrocitos infectados en órganos como bazo, hígado, riñón y cerebro. Tal obstrucción dará lugar a la limitación del flujo sanguíneo y puede conducir a una disminución en la distribución de oxígeno y nutrientes a los órganos vitales, y la eliminación de los residuos tóxicos como el ácido láctico (Guyue, 2009).

## **1.4 PROPIEDADES ELECTROMECAÑICAS DE LOS MATERIALES**

Cada material tiene propiedades inherentes (propias). Esas propiedades permiten diferenciar un material de otro. También, definen el comportamiento de los materiales sometidos a diversas acciones -como cargas mecánicas- describiendo la capacidad del material para comprimirse, estirarse, doblarse, rayarse, abollarse o romperse, etc.

Las propiedades mecánicas de los materiales son: elasticidad, plasticidad, maleabilidad (que pueden formar láminas), ductilidad (que pueden formar hilos o alambres), dureza (resistencia a ser rayado), tenacidad (resistencia al impacto) y fragilidad. Al mencionar estas propiedades podría pensarse que sólo aplican a materiales como el hierro, la madera, el cemento, etc.; sin embargo, esas mismas propiedades aplican a materiales biológicos, como tejido, tendón, hueso, o incluso células. La alteración de los valores de esas propiedades, en tejidos, células, etc., pudiera agravar o ser causa de enfermedades.

En esta sección nos vamos a concentrar en las propiedades mecánicas de los materiales, muy especialmente la elasticidad y luego, veremos los modelos matemáticos utilizados para definirla, y cómo ha sido caracterizada experimentalmente, refiriéndonos específicamente al eritrocito. Como se verá al final de la sección, existen diversos métodos mecánicos y eléctricos que se utilizan para hacer la caracterización de materiales. En nuestro caso en particular, se usa un método eléctrico para caracterizar indirectamente las propiedades mecánicas del material, por lo que también, se hablará de las propiedades eléctricas.

### **1.4. Propiedades mecánicas**

En la Mecánica de Materiales (o Resistencia de Materiales) interesa estudiar la relación entre las fuerzas y los cambios de forma. Para ello, se utiliza una descripción matemática del comportamiento del material, en otras palabras, una ecuación constitutiva; esto es, una ecuación que relaciona el esfuerzo con la deformación producida en el cuerpo.

Las relaciones constitutivas permiten distinguir un material de otro (Belytschko, *et al.*, 2014).

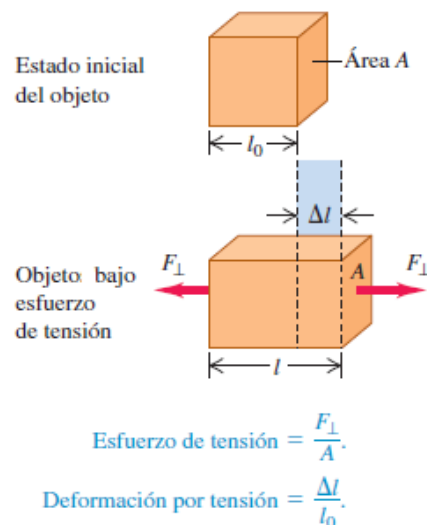
### 1.4.1. Esfuerzo y deformación

Una forma comúnmente utilizada para explicar el comportamiento elástico es el estudio del estiramiento de una barra. La Figura 3 muestra un objeto que inicialmente tiene un área de sección transversal uniforme ( $A$ ) y una longitud ( $l_0$ ). Al aplicar una fuerza perpendicular a la sección transversal ( $F_{\perp}$ ) pero en direcciones opuestas a los extremos (esto garantiza que el objeto no tenderá a moverse a la izquierda ni a la derecha), el objeto está en **tensión**. Si las fuerzas en los extremos estuvieran en dirección contraria, la barra estaría en **compresión** o contracción y las deformaciones se considerarían negativas (Hugh & Freedman, 2009).

Definimos el **esfuerzo** ( $\sigma$ ) (stress, en inglés) en la sección transversal como el cociente de las  $F_{\perp}$  entre el área de la sección  $A$ :

$$\text{Esfuerzo} = \frac{F_{\perp}}{A} \quad (1)$$

El objeto de la Figura 3 se estira una longitud:  $l = l_0 + \Delta l$  cuando se le somete a tensión. El alargamiento  $\Delta l$  no se da sólo en los extremos; todas las partes de la barra se



**Figura 3.** Un objeto en tensión. La fuerza neta que actúa sobre el objeto es cero, pero el objeto se deforma. El esfuerzo de tensión (la razón de la fuerza al área de sección transversal) produce una deformación por tensión (el alargamiento dividido entre la longitud inicial). Se ha exagerado el alargamiento  $\Delta l$  para claridad (Hugh & Freedman, 2009).

estiran en la misma proporción. La **deformación** (strain, en inglés) del objeto es igual al cambio fraccionario de longitud, que es el cociente del alargamiento  $\Delta l$  entre la longitud original  $l_0$ :

$$\text{Deformación} = \frac{l-l_0}{l_0} = \frac{\Delta l_0}{l_0} \quad (2)$$

La deformación ( $\epsilon$ ) es el estiramiento por unidad de longitud. Es el cociente de dos longitudes, con las mismas unidades, de modo que es un número adimensional.

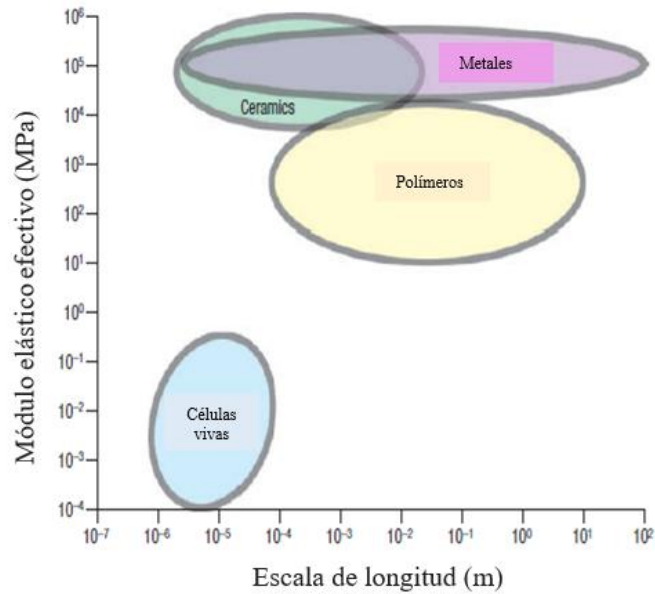
Experimentalmente, Robert Hooke utilizó un resorte al que le aplicó una fuerza y midió su cambio de elongación notando una proporcionalidad entre estas cantidades y consecuentemente entre el esfuerzo y la deformación, tal como lo indica la ecuación 3 a la que se conoce como la Ley de Hooke.

$$\frac{\text{Esfuerzo}}{\text{Deformación}} = \text{Módulo de elasticidad} \quad (3)$$

El módulo de elasticidad correspondiente se denomina **módulo de Young**, denotado por E, definido como:

$$E = \frac{\text{Esfuerzo}}{\text{Deformación}} = \frac{F_{\perp}/A}{\Delta l/l_0} = \frac{F_{\perp} l_0}{A \Delta l} \quad (4)$$

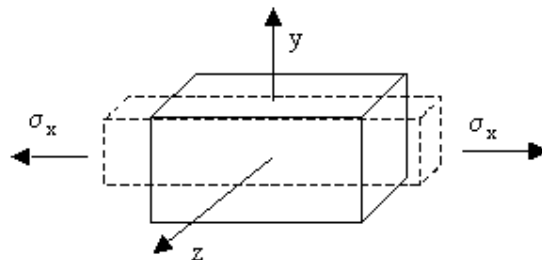
Dado que la deformación es un número adimensional, las unidades del módulo de Young son las mismas del esfuerzo. En el sistema métrico internacional, en donde la fuerza está dada en Newtons (N) y el área, en metros cuadrados (m<sup>2</sup>), la unidad del módulo de Young sería expresado en Pascales (Pa). La Figura 4 presenta una comparación del módulo de elasticidad para diversos materiales.



**Figura 4.** Rango aproximado de valores para el módulo elástico de células biológicas y comparaciones con las de metales, cerámica y polímeros (Bao & Suresh, 2003).

Ahora bien, realmente, al aplicar una carga longitudinal ocurre un cambio en la sección transversal: se produce una deformación en forma de depresión (si se trata de fuerzas de tensión) o de ensanchamiento (si se trata de compresión) tal como se aprecia en la Figura 5. La relación entre el acortamiento de una longitud situada en un plano perpendicular a la dirección de la carga aplicada ( $E_p$ ), dividido entre el alargamiento longitudinal producido ( $E_a$ ) se conoce como coeficiente de Poisson ( $\nu$ ), la cual denomina otra característica del material y su relación está dada en la siguiente ecuación:

$$\nu = -\frac{E_p}{E_a} \quad (5)$$



**Figura 5.** Coeficiente de Poisson. Al aplicar una fuerza longitudinal ocurre un efecto transversal.

### 1.4.2. Esfuerzo y tensión de corte

Otro tipo de situación de esfuerzo-deformación se denomina corte. La Figura 6 muestra un cuerpo deformado por un esfuerzo de corte (shear stress, en inglés). En la figura, fuerzas de igual magnitud, pero dirección opuesta, actúan de forma tangente a las superficies de extremos opuestos del objeto. Definimos el esfuerzo de corte ( $\tau$ ) como la relación entre la fuerza que actúa tangente a la superficie ( $F_{\parallel}$ ) con respecto al área ( $A$ ) sobre la que actúa:

$$\text{Esfuerzo de corte} = \frac{F_{\parallel}}{A} \quad (6)$$

La Figura 6 muestra que una cara del objeto sometido a esfuerzo de corte se desplaza a una distancia ( $d$ ) relativa a la cara opuesta. Definimos la deformación de corte como el cociente del desplazamiento ( $d$ ) entre la dimensión transversal ( $h$ ):

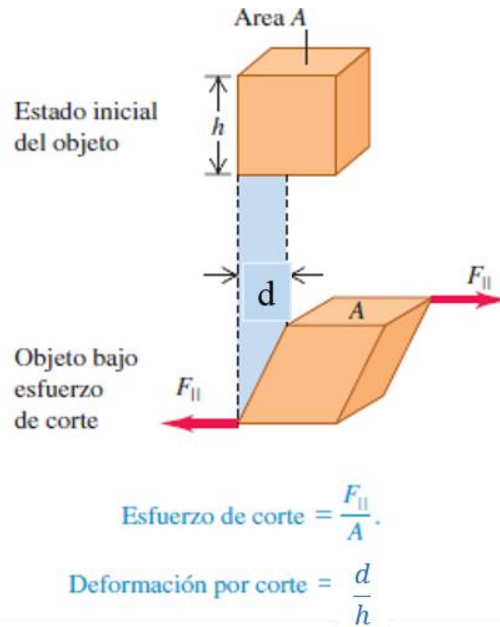
$$\text{Deformación de corte} = \frac{d}{h} \quad (7)$$

En situaciones reales, ( $d$ ) casi siempre es mucho menor que ( $h$ ). Como todas las deformaciones, la de corte es un número adimensional: un cociente de dos longitudes.

Si las fuerzas son lo suficientemente pequeñas como para que se obedezca la ley de Hooke, la deformación de corte es proporcional al esfuerzo cortante. El módulo de elasticidad correspondiente (cociente del esfuerzo de corte entre la deformación) se denomina **módulo de corte** (o de cizallamiento) y se denota por ( $S$ ):

$$S = \frac{\text{Esfuerzo de corte}}{\text{Deformación de corte}} = \frac{F_{\parallel}/A}{d/h} = \frac{F_{\parallel} h}{A d} \quad (8)$$

con  $d$  y  $h$  definidos como en la Figura 6.



**Figura 6.** Objeto sometido a un esfuerzo de corte. Se aplican fuerzas tangentes a superficies opuestas del objeto (en contraste con la situación de la Figura 3, donde las fuerzas actúan perpendiculares a las superficies) (Hugh & Freedman, 2009).

### 1.4.3. Elasticidad y plasticidad

El esfuerzo y la deformación elástica son proporcionales solo en un intervalo limitado. En realidad, como muestra la Figura 7, la relación de esfuerzo-deformación por lo general tiene una característica no lineal.

A medida que se aumente el esfuerzo en un objeto, pasará por una etapa de elasticidad, luego plasticidad y, por último, fractura tal como se ve en la Figura 7, en las curvas esfuerzo-deformación de un material hay un tramo de comportamiento perfectamente elástico en el que la relación esfuerzo-deformación es lineal (punto A), descrito por la Ley de Hooke. De ahí hasta otro punto B (de límite elástico) el material sigue un comportamiento elástico (sigue habiendo una relación entre esfuerzo y deformación, aunque no es lineal, y si se retira el esfuerzo se recupera la configuración inicial). Si se sigue aumentando la carga, el material se deforma rápidamente y si se retira el esfuerzo no se recupera la configuración inicial, quedando una deformación permanente y el cuerpo tiene un comportamiento plástico (región B-D). Si se sigue aumentando la carga, el material llega hasta un estado en el que se rompe (punto E).

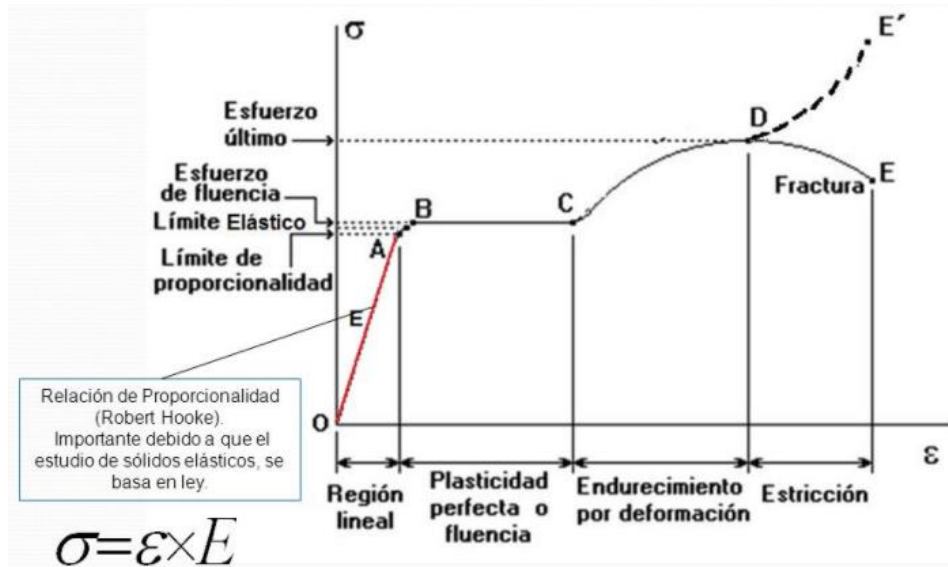


Figura 7. Relación esfuerzo-deformación de un material en todas sus etapas (Hugh & Freedman, 2009).

## 1.5. Propiedades eléctricas

Además de las propiedades mecánicas, los materiales poseen otros tipos de propiedades, como: térmicas, eléctricas, magnéticas o nucleares (en mayor o menor escala) y de ahí que digamos que un material sea de cierto tipo (Hugh & Freedman, 2009 ; Ríos, *et al.*, 2012).

En el presente trabajo, nos compete analizar ciertas propiedades eléctricas, como conductividad y permitividad, que son fundamentales para entender los experimentos realizados pues las propiedades mecánicas del eritrocito se obtuvieron indirectamente de experimentos eléctricos. Es importante resaltar que, atendiendo a sus propiedades eléctricas, los materiales se clasifican como **conductores** y **dieléctricos** (Hugh & Freedman, 2009 ; Ríos, *et al.*, 2012).; en esta sección se explicará la diferencia conceptual entre ellos.

### 1.5.1. Conductores

La mayoría de los metales (muy particularmente el cobre), son conductores, ya que permiten –en presencia de un campo eléctrico- que la corriente eléctrica (flujo de electrones) fluya fácilmente a través de ellos. La propiedad que relaciona el flujo eléctrico - en términos de la densidad de corriente ( $\mathbf{J}$ )- y el campo eléctrico ( $\vec{E}$ ) se conoce como conductividad ( $\Theta$ ).

$$\Theta = \mathbf{J}/|\vec{E}| \quad (9)$$

En la Tabla III, se pueden observar algunos valores de conductividad eléctrica para distintos materiales.

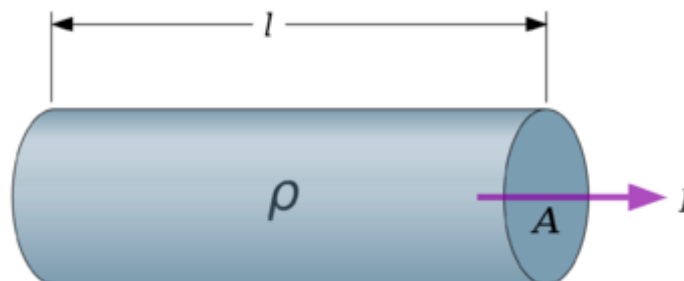
**Tabla III.**  
Conductividad de algunos materiales

Material	Conductividad eléctrica $\mu S/cm$
Carbón	0.0003
Hierro	0.1030
Agua	0.0550

Cabe señalar que el inverso de la conductividad se conoce como resistividad ( $\rho$ ) y denota la resistencia que opone el material al flujo de electrones; ambos, la conductividad y resistividad son propiedades intrínsecas del material. A manera macroscópica, se toma en cuenta la geometría del sistema y se denotan estas propiedades ya sea en términos de la conductancia (G) o la resistencia ( $R_e$ ) pues una es inversa de la otra.

Para una geometría sencilla, tipo conductor, que tiene una longitud ( $l$ ) y un área transversal al flujo eléctrico ( $A$ ) mostrada en la Figura 8, la resistencia se calcula como lo indica la ecuación 10, en donde las unidades de la resistencia están dadas en Ohmios ( $\Omega$ )

$$R_e = \rho \frac{l}{A} \quad (10)$$



**Figura 8.** Pictórico de un conductor eléctrico (Barco Ríos et al., 2012).

Macroscópicamente, la fuerza eléctrica se conoce como voltaje (V) y el flujo de electrones, como corriente eléctrica (I). La relación entre el voltaje y la corriente eléctrica, ver ecuación 11, también indica la resistencia ( $R_e$ ) y se conoce como la Ley de Ohm.

$$R_e = \frac{V}{I} \quad (11)$$

### 1.5.2. Dieléctricos

A diferencia de los materiales conductores, en los materiales dieléctricos no hay flujo de electrones libres. Las cargas eléctricas están configuradas en forma de dipolos eléctricos que consisten en dos cargas de igual magnitud ( $q$ ), pero de polaridad distinta separadas una distancia ( $d$ ), tal como se muestra en la Figura 9.

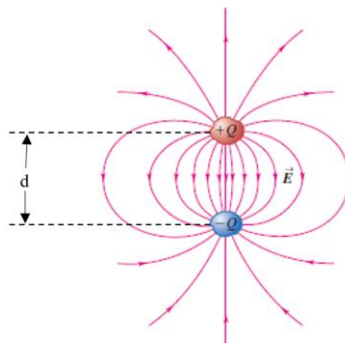
En presencia de un campo eléctrico, los dipolos en los materiales dieléctricos sólo reorientan o reacomodan sus cargas internas sin permitir un verdadero flujo de las mismas; en otras palabras, el material se polariza (ver Figura 10). El valor de la carga ( $q$ ) por la distancia ( $d$ ) se conoce como momento dipolar eléctrico; en un volumen dado, el efecto total se conoce como polarización eléctrica ( $P$ ). La relación que existe entre la polarización eléctrica y el vector de campo eléctrico ( $\vec{E}$ ) se representa en términos de la permitividad del vacío ( $\epsilon_0$ ) y la susceptibilidad eléctrica ( $\chi_e$ ) tal como muestra la ecuación 12

$$P = \epsilon_0 \chi_e E \quad (12)$$

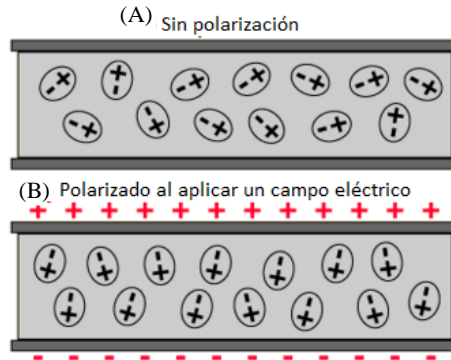
La susceptibilidad eléctrica también relaciona la permitividad del medio estudiado ( $\epsilon$ ) respecto al del vacío, tal como se muestra en la ecuación 13

$$\epsilon = \epsilon_0 (1 + \chi_e) \quad (13)$$

La susceptibilidad eléctrica y, por ende, la permitividad del medio son propiedades intrínsecas del material dieléctrico.



**Figura 9.** Dipolos eléctricos en presencia de un campo eléctrico.



**Figura 10.** Orientación de los dipolos (A) sin campo eléctrico, (B) al aplicar campo eléctrico.

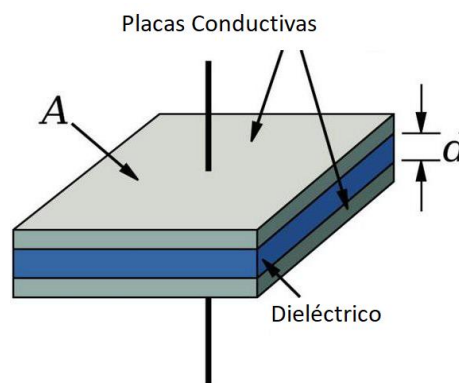
La capacitancia es el elemento eléctrico que denota el efecto macroscópico del material dieléctrico expuesto a un campo eléctrico, introduciendo ahora la geometría, tal como muestra la ecuación 14. Para tal fin, utilizamos un ejemplo sencillo como lo es el capacitor de placas paralelas mostrado en la **Figura 11**.

$$C = \epsilon \frac{A}{l} \quad (14)$$

La capacitancia también se puede dar en términos de la relación del diferencial de voltaje que se ejerce en las placas conductoras y la carga total almacenada en el dieléctrico, como se muestra en la siguiente ecuación:

$$C = \frac{q}{v} \quad (15)$$

La unidad de la capacitancia es el Farad y –según la fórmula dada arriba- corresponde a 1 Coulomb de carga por 1 Volt de diferencia de potencial. Tal unidad es bastante grande y en la práctica se utilizan submúltiplos como el microFarad ( $\mu$ Farad) (Hugh & Freedman, 2009 ; (Ríos, *et al.*, 2012).



**Figura 11.** Pictórico de un capacitor de placas paralelas.

## **1.6. Técnicas experimentales utilizadas para caracterizar las propiedades mecánicas de materiales biológicos**

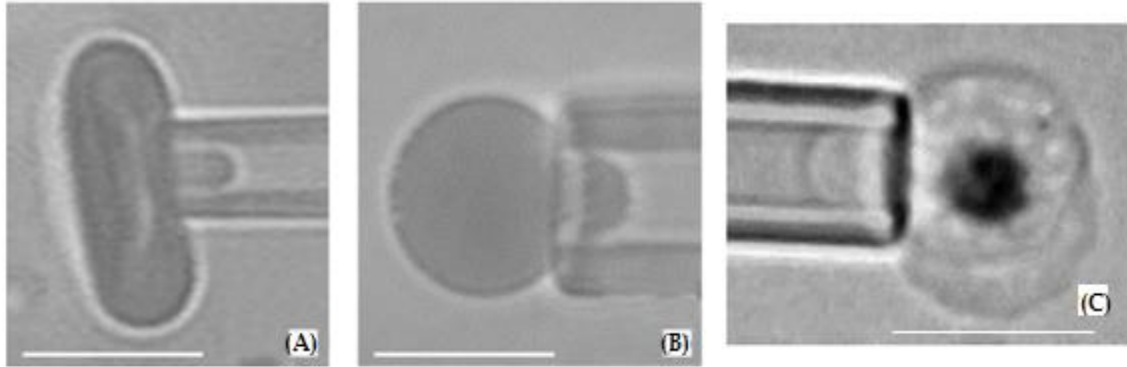
Desde la aparición de la mecánica celular, en la década de los 60's, las técnicas experimentales para investigar las propiedades mecánicas de las células biológicas se han desarrollado muy rápidamente. Para estudiar la deformación de las células, se han aplicado herramientas y técnicas tales como: filtración celular, reoscopía, microfluídica, aspiración de micropipetas, pinzas ópticas y deformación transitoria en campos eléctricos de alta frecuencia (Bao & Suresh, 2003).

En todas estas técnicas, la célula debe deformarse de alguna manera por una fuerza o tensión conocida y luego, medir su deformación. Usualmente, la superficie de la célula está comprimida o extendida. Varios instrumentos como el microscopio de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés), la trampa óptica (pinzas láser) y la aspiración de micropipeta, pueden servir con el propósito de aplicar la fuerza o tensión. Cada uno tiene sus propias fortalezas y debilidades, y a continuación, explicaremos brevemente en qué consiste cada uno de ellos (Maciaszek *et al.*, 2011; Liao *et al.*, 2014).

### **1.6.1. Aspiración con micropipeta**

En esta técnica, el comportamiento mecánico de las células vivas se estudia aplicando una presión negativa en la superficie de la célula y se aspira o succiona con la micropipeta, y la cantidad de aspiración, depende de las propiedades viscoelásticas de la membrana celular. En este procedimiento se utiliza una micropipeta de vidrio y se pueden imponer presiones de succión en el orden de pico Newton y nano Newton en la célula. Cuando la célula se aspira con una micropipeta, como se ve en la Figura 12, se puede usar la medición del borde delantero de la porción aspirada de la célula para evaluar el módulo elástico de la misma (Fung, 1981).

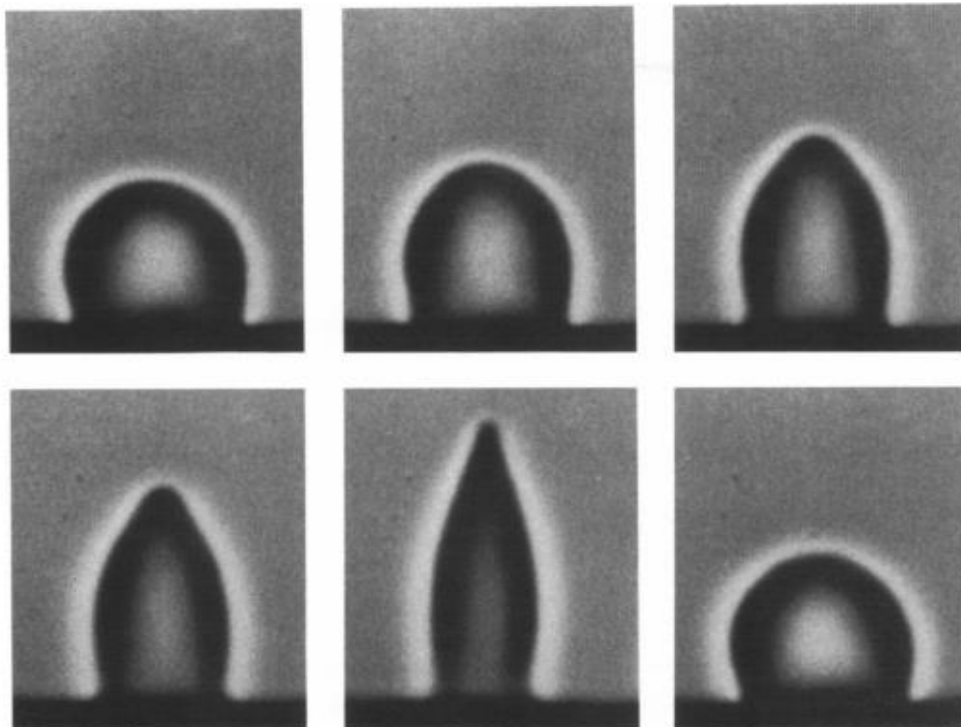
La aspiración de micropipeta se ha aplicado para medir la elasticidad de la membrana de diferentes células, tales como leucocitos, eritrocitos, condrocitos y células endoteliales (Evans *et al.*, 1976; Hochmuth, 2000). También, se ha utilizado para medir la deformación de los eritrocitos individuales en diferentes etapas de la progresión de la malaria (Jiao *et al.*, 2009; Zhou, Lim, Tan, & Quek, 2005).



**Figura 12.** Aspiración con micropipeta. (a) Aspiración de un eritrocito sano (b) Aspiración de un eritrocito hinchado. (c) Aspiración de un eritrocito infectado con *P. falciparum* en la etapa de esquizonte (Hochmuth, 2000; Zhou *et al.*, 2005).

### 1.6.2. Deformación transitoria en campos eléctricos de alta frecuencia

Esta técnica permite medir la constante elástica del eritrocito, basándose en la deformación transitoria de células individuales en un campo eléctrico no-homogéneo de alta frecuencia. Las células en solución son colocadas entre dos electrodos de puntas



**Figura 13.** Deformación aplicando campo eléctrico. Se muestra un único eritrocito en diferentes estados de deformación causados por un campo eléctrico de alta frecuencia. Las intensidades de campo eléctrico correspondientes son de izquierda a derecha 5, 20, 35, 50, 150, 0 kV/m, respectivamente (Engellhardt & Sackmann, 1983).

afiladas con una separación dada. Debido a la diferencia en conductividad del citoplasma y del medio externo, el comportamiento de la célula en el campo no-homogéneo depende de la frecuencia. Para frecuencias menores de 10 MHz, no puede despreciarse la conductividad del citoplasma. Por efecto de esto, se acumulan cargas eléctricas opuestas en los extremos de la célula que se encuentran frente a los electrodos. Este fenómeno se conoce como polarización de Maxwell-Wagner: la célula se comporta como un dipolo eléctrico y se acopla al campo eléctrico. La célula será atraída hacia uno de los electrodos por el campo de polarización. Para provocar la deformación, la amplitud se incrementa repentinamente (ver Figura 13). Mediante técnicas de microscopía se pueden medir elongaciones del orden de 200 nm (Engelhardt & Sackmann, 1983; Engelhardt, Gaub & Sackmann, 1984).

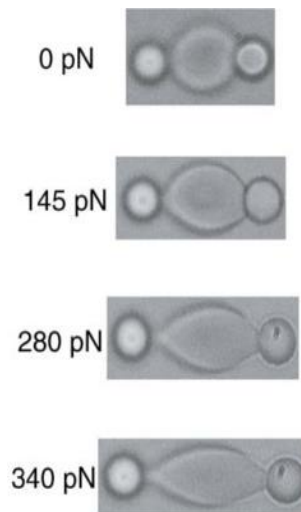
### **1.6.3. Pinzas Ópticas**

Las pinzas ópticas se han aplicado en una amplia gama de experimentos, desde enfriamiento y captura de átomos neutros hasta manipulación de bacterias vivas y virus (Ashkin & Dziedzic, 1985).

La técnica de pinzas ópticas (también llamadas trampas ópticas o laser), combinadas con técnicas de seguimiento de partícula única, permiten manipular objetos en la escala nanométrica y determinar fuerzas del orden de pico Newtons. Dado que los sistemas biológicos se organizan con esa precisión espacial mediante fuerzas de interacción de dicho orden de magnitud, la metodología permite interrumpir o imitar procesos biológicos y así, comprender los mecanismos y los principios que los rigen. La trampa se genera en un punto en el espacio en el que un haz de láser es enfocado, debido a la interacción de la radiación electromagnética con la partícula a atrapar (Wilke, 2016).

Las pinzas ópticas se han aplicado para probar las respuestas de fuerza-desplazamiento de una célula uniendo una cuenta de sílice a los extremos opuestos de la superficie de la célula, y es allí donde se enfocan los rayos láser para controlar el estiramiento de la célula como se muestra en la Figura 14. Durante la imposición de fuerzas de estiramiento controladas, en el rango de decenas a varios cientos de pico Newtons, se utiliza para evaluar experimentalmente las características de deformación. Las respuestas mecánicas de la célula durante la carga y al liberar la fuerza óptica se analizan luego para

extraer las propiedades elásticas de la membrana celular mediante el uso de varias formulaciones constitutivas diferentes de la conducta elástica y viscoelástica, ver Figura 14 (Dao *et al.*, 2003).

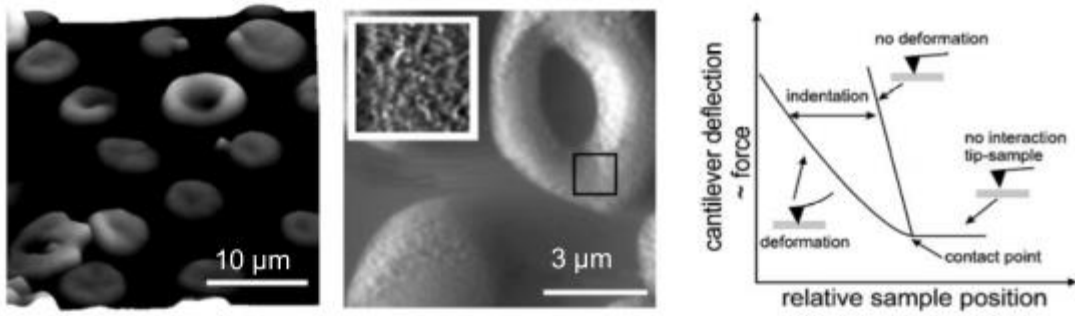


**Figura 14.** Deformaciones con pinzas ópticas. Observaciones experimentales de la deformación del eritrocito aplicando fuerzas de 0 a 340 pN (Dao *et al.* 2003).

#### 1.6.4. Microscopía de Fuerza Atómica

La microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) se ha convertido en una herramienta fundamental en varios campos de investigación permitiendo estudios de topografía, así como la obtención de información mecánica sobre sistemas biológicos en su entorno natural.

La AFM es apropiada para medir las propiedades mecánicas de las células vivas debido a su alta sensibilidad a la fuerza y su capacidad para medir las propiedades locales y globales de las células individuales en condiciones fisiológicas. Esta técnica utiliza un enfoque de escaneo mediante una punta fina montada en el extremo de un voladizo flexible que se desvía al interactuar con la superficie de la muestra. Los cambios en la altura (dirección Z) debido a las interacciones de la punta con el sustrato se detectan mediante una configuración que consiste en un láser y un detector sensible a la posición (fotodetector) como se muestra en la Figura 15. Para obtener las propiedades elásticas de las células se determina a partir de la curva de fuerza vs la distancia utilizando el modelo de Hertz (Binnig & Quate, 1986; Kim *et al.*, 2012; Targosz, Strojny *et al.*, 2006).



**Figura 15.** AFM mide la topografía y la deformación de los eritrocitos. (A) Topografía de RBC normales. (B) Textura detallada de la superficie de la membrana del eritrocito. (C) Medición de profundidad mediante penetración de la punta (Kim *et al.*, 2012).

# **CAPÍTULO II: METODOLOGÍA**

En este capítulo detallaremos la metodología experimental utilizada para observar la respuesta de los eritrocitos sanos e infectados al ser sometidos a campo eléctrico, ya que se obtendrán los parámetros de elasticidad mecánica, indirectamente, utilizando este método. Originalmente se intentó medir esas propiedades directamente utilizando pinzas ópticas y AFM en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. en México (experiencia reportada en el Anexo A), sin embargo, estando en el lugar realizando las experimentaciones nos percatamos que los equipos estaban desalineados, por lo que tuvimos que desistir y recurrir al método eléctrico aquí empleado.

Para realizar la parte experimental de este trabajo, se colocaron sobre un portaobjeto dos láminas delgadas separadas entre sí unas decenas de micrómetros, logrando así, el canal donde se vierte la preparación con las células. A su vez, las láminas son los electrodos a los cuales aplicamos un potencial eléctrico. Desde el punto de vista eléctrico, este dispositivo o cámara de experimentación es un capacitor, donde el dieléctrico (entre las placas del mismo) es la solución preparada con la muestra de células. Entre las placas (electrodos) del capacitor se formará el campo eléctrico que se aplicó a las células. Al conectar una fuente eléctrica a las placas, se crea un campo eléctrico que ejerce un efecto de polarización en el dieléctrico causando así la elongación del eritrocito presente en la muestra biológica. Las medidas realizadas permiten, de manera indirecta, obtener el módulo de elasticidad de las células (Engelhardt, H. Gaub, H. & Sackmann, 1984).

La muestra biológica consiste en una mezcla de eritrocitos (sanos o infectados) diluidos en un medio compuesto por ácido cítrico, citrato de sodio y dextrosa (ACD) con una solución de medir. Esta muestra se coloca entre las dos placas del dispositivo descrito, sirviendo como material dieléctrico del capacitor logrado con las láminas u hojillas. Al variar la amplitud del voltaje aplicado a las placas se produce un efecto en el eritrocito, el cual es registrado como una imagen digital por una cámara acoplada al microscopio. Una vez obtenida las imágenes, se procesan los cambios de forma de los eritrocitos, y utilizando un conjunto de ecuaciones matemáticas, que relacionan las fuerzas eléctricas y mecánicas, se obtienen los parámetros de elasticidad deseados.

A continuación se detallarán cada uno de los pasos que se llevaron a cabo para realizar la experimentación.

## **2. Muestra biológica**

Es importante notar que de manera general, la muestra biológica se considera una mezcla de eritrocitos (sanos o infectados) en una solución viscosa (medio). Para que se produzca una elongación del eritrocito, producto de un campo eléctrico, se debe crear una fuerza de polarización conocida como Maxwell-Wagner la cual se produce al tener una diferencia en las conductividades del medio y del eritrocito, de aquí, la importancia del tipo de soluciones a utilizar para crear la muestra biológica (Engelhardt & Sackmann, 1988a). A continuación se detallará paso a paso los insumos y procedimientos necesarios para la preparación de la muestra biológica:

### **2.1.1 Preparación de los eritrocitos**

Se obtuvo la sangre de donantes voluntarios por punción venosa, lo cual es una práctica aprobada por un comité de bioética de la República de Panamá, para hacer este tipo de experimentaciones. Una vez se contó con la sangre, se procedió a preparar los eritrocitos, agregando un volumen de 1 mL de anticoagulante CPDA (Citrato, Fosfato, Dextrosa, Adenina) por cada 9 mL de sangre. La sangre con el anticoagulante se centrifugó a 2,500 rpm, por 8 minutos (min) a 10°C y se extrajo el sobrenadante, para eliminar la capa intermedia que contiene las células blancas. Este proceso se repitió de 2 a 3 veces para quedarse sólo con los eritrocitos. Al obtener sólo los eritrocitos o glóbulos rojos (RBC), se estimó el volumen del pellet y se re-suspendió en igual volumen de medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) y se almacenó a 4°C (W. Trager & J. Jensen, 1976). Cabe señalar que esta dilución se conoce como RBC50/50.

### **2.1.2 Preparación del medio**

El medio está compuesto de dos soluciones: ACD (ácido cítrico, citrato de sodio y dextrosa) y solución de medir. Para preparar el ACD, se diluyó en agua inyectable 0.15 M ácido cítrico ( $C_6H_8O_7$ ), 0.087 M citrato de Sodio ( $Na_3C_6H_5O_7$ ) y 0.122 M dextrosa, y se aforó hasta que se obtuvo el volumen deseado. Se ajustó el pH de la solución entre 7.2 a 7.4

utilizando hidróxido de sodio (NaOH 1 N) y ácido clorhídrico (HCl 1 N) según fuese necesario. También, se midió la conductividad de la solución siendo la utilizada de 15 mS/cm. Posteriormente, se filtró la solución utilizando un filtro de 0.2  $\mu\text{m}$  y se almacenó a 4°C hasta su uso (Engelhardt & Sackmann, 1988b).

Por otro lado, para preparar la solución de medir, se disolvió 250 mM de manitol ( $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$ ), 30 mM de glucosa y 1 mM de di-cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), y se aforó hasta que se obtuvo el volumen deseado (Engelhardt & Sackmann, 1988b). Se midió el pH de la solución, siendo este de 5.39 y este no fue ajustado para no alterar la conductividad de la solución, la cual era de 301  $\mu\text{S}/\text{cm}$

### **2.1.3 Preparación de la muestra biológica**

Para preparar la muestra final, se tomó 100  $\mu\text{L}$  de RBC50/50 y se diluyó en 300  $\mu\text{L}$  de ACD (esta dilución se llamará de ahora en adelante Er-ACD). De esta dilución, se tomó 30  $\mu\text{L}$  y se mezcló en 400  $\mu\text{L}$  de solución de medir; de la solución resultante se tomó 15  $\mu\text{L}$ , que es lo que se llamó la muestra biológica o el material dieléctrico. Es importante resaltar que esta muestra se conserva en buen estado durante un periodo de 15 min debido al pH de la solución de medir, siendo este el tiempo límite para realizar el experimento (Engelhardt & Sackmann, 1988b).

## **2.2 Muestra biológica infectada**

En caso de que se esté preparando la muestra biológica con eritrocitos infectados, se deben seguir los mismos pasos antes mencionados durante la preparación del eritrocito sano y el medio. A diferencia del eritrocito sano, se procura que la muestra biológica infectada cuente con el parásito en su estadio tardío, por lo que se deben seguir una serie de pasos adicionales, los cuales serán explicados a continuación:

### **2.2.1 Preparación del suero humano**

Para obtener el suero humano, se mantuvo la sangre del donante en reposo alrededor de 3 horas (h) y luego, se centrifugó a 3,500 rpm a 4°C por 15 min (min). Después, se colectó el suero sobrenadante en tubos de 50 mL y se centrifugó nuevamente a fin de obtener un suero libre de eritrocitos y demás componentes de la sangre. Después, se

transfirió el suero a tubos de 50 mL y se realizaron alícuotas en lotes de 25 mL. Se rotularon con la fecha e iniciales del donante. Posteriormente, se inactivó el suero en baño María a 56°C por 30 min, se dejó enfriar a temperatura ambiente (TA) y se almacenó a -20°C hasta su uso (Trager, 1995; W. Trager and J. Jensen, 1976).

### **2.2.2 Preparación del medio suplementado**

Para preparar el medio suplementado, se disolvió RPMI 1640 (Sigma Aldrich), 25 mM HEPES, 15 mM hipoxantina, 50 mg/mL gentamicina, rojo fenol 0.0053 g y 200 mM L-glutamina en agua estéril. Se ajustó el pH a 7.18 utilizando NaOH o HCl 1N y se completó el volumen deseado. Se realizó la filtración de la mezcla con un filtro de acetato de celulosa y se sirvió en envases estériles. Se suplementó la solución de RPMI con 10% de suero humano, 2% de bicarbonato de sodio y se gaseó con una mezcla de gases balanceados (90% Nitrógeno, 5% oxígeno y 5% dióxido de carbono); esto lo se llamó RPS (L. Coronado *et al.*, 2016; W. Trager & J. Jensen, 1976).

### **2.2.3 Cultivo de *P. falciparum***

El *P. falciparum* se cultivó siguiendo, parcialmente, el método descrito por Trager y Jensen (W. Trager and J. Jensen, 1976). Se usaron eritrocitos humanos O+ en un medio RPMI 1640 suplementado; los cultivos se mantuvieron a 37°C en la mezcla gaseosa balanceada descrita arriba a un 2% de hematocrito (porcentaje de volumen de glóbulos rojos) y fueron sincronizados con sorbitol (afecta la permeabilidad de la membrana de eritrocitos infectados en estadio tardío), para trabajarlo a un estadio determinado del parásito.

### **2.2.4 Aislamiento de eritrocitos infectados con *P. falciparum* a través de una columna magnética**

Es conocido en la literatura que el *P. falciparum* tiene propiedades paramagnéticas debido a la hemozoína que va generando a medida que crece y por lo tanto, se sabe que en las etapas tardías es donde se tiene una mayor acumulación de la misma (Lore M. Coronado, Nadovich, & Spadafora, 2014). Por este motivo, para preparar la muestra biológica del eritrocito infectado en etapas tardías de trofozoíto/esquizonte, se utilizó el método de separación magnética siguiendo el protocolo de L. Coronado (2013) y

(Coronado, Tayler, Correa, Giovani, & Spadafora, 2013), el cual recomienda un uso alto de parasitemia (3-10%) en el cultivo para obtener una mayor acumulación de eritrocitos en etapa tardía.

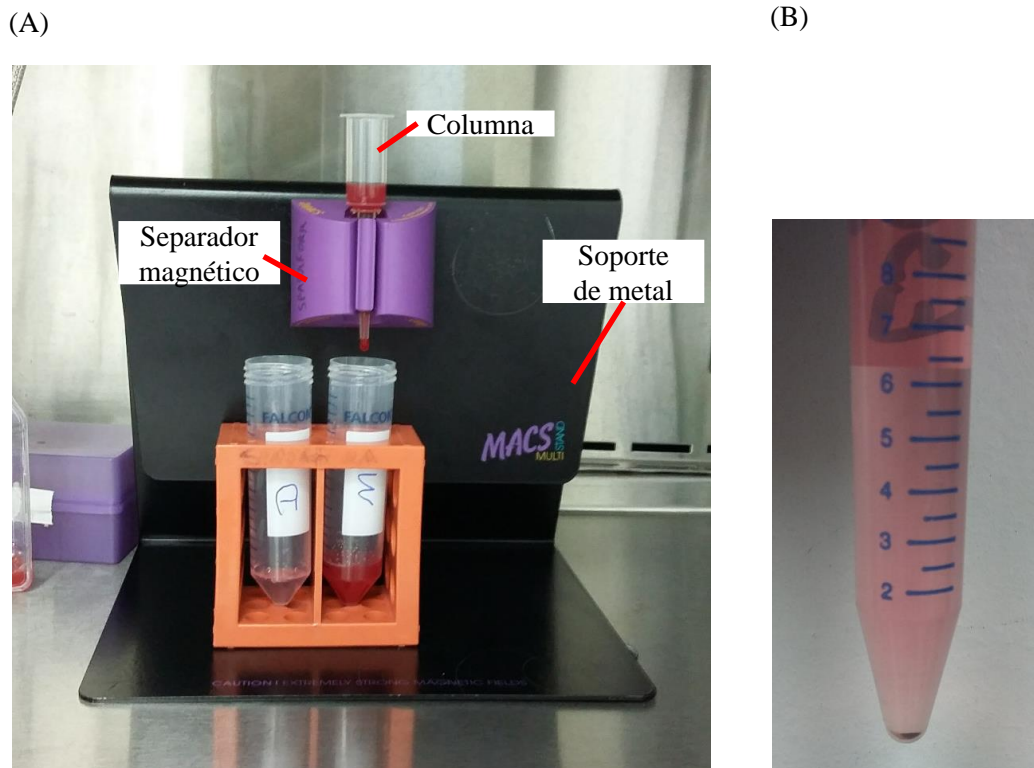
Para el aislamiento de esquizontes, se ensambló una configuración como la mostrada en la Figura 16. Tal como se puede observar, se utilizó una columna magnética LS, un separador MidiMACS Magnético y un soporte de metal MultiStand MACS de Miltenyi BioTec. Primero, se conectó el separador magnético al soporte de metal y luego, se colocó la columna magnética en el separador. En el momento que estas piezas están acopladas, inmediatamente se crea un campo magnético que va a permitir aislar las células infectadas en estadio tardío, de los otros estados y de los eritrocitos sanos.

Para crear la solución de trabajo, se mezcló 23.2 mL de RPMI 1640 y 750  $\mu$ L de bicarbonato de sodio al 7.5% en un tubo de 50 mL. Luego, se tomó 3 mL de la solución de trabajo y se agregaron a la columna magnética para equilibrarla, y se desechó el flujo remanente en un tubo de descarte. La retención de los eritrocitos infectados en estado esquizonte inicia al agregar 5 mL del cultivo de *P. falciparum* a la columna magnética, cuando la mayoría de los eritrocitos infectados en este estado quedarán atrapados en la columna magnética y el resto se decantará de regreso al tubo de cultivo.

Una vez que se recogió la última gota del cultivo, se agregó 1 mL de solución de trabajo para expulsar los eritrocitos que hayan quedado restantes en la columna magnética (excluyendo los esquizontes que están bajo el campo magnético). Posteriormente, se agregaron otros 3 mL de la solución de trabajo a la columna para terminar de limpiarla y ya en este punto el líquido que sale de la columna debe ser mayormente solución de trabajo por lo que se recogió en el tubo de descarte.

Finalmente, se separó la columna del separador magnético y se colocó encima de un tubo de 15 mL. Se agregó 3 mL de solución de trabajo a la columna para extraer los eritrocitos infectados con parásitos en etapa tardía que quedaron atrapados en las perlas de la columna. Se centrifugó el tubo de 15 mL que contenía los eritrocitos infectados con parásitos en etapa tardía durante 5 min a 15,000 rpm y a TA, para que se formara un

sedimento oscuro de los eritrocitos parasitados. Se retiró el sobrenadante y se diluyeron los parásitos recolectados en 50  $\mu$ L de RPMI suplementado; a esta dilución se le llamó ERs.



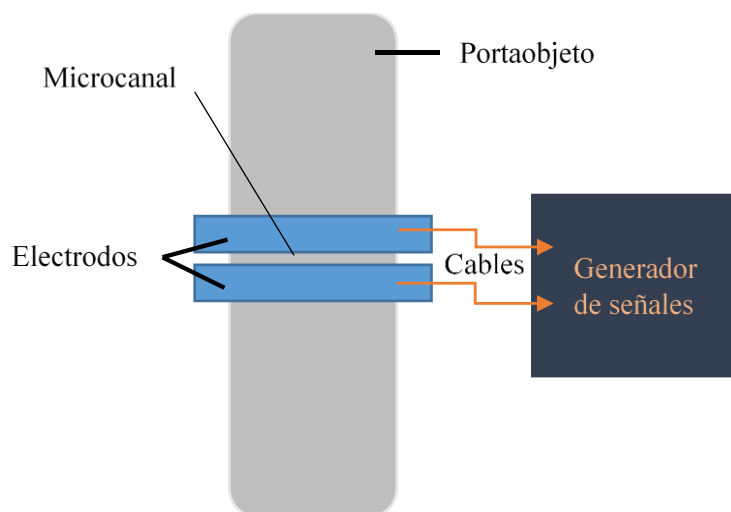
**Figura 16.** Configuración para el aislamiento de esquizontes. (A) Columnas LS, un separador MidiMACS Magnético y MultiStand MACS de Miltenyi BioTec. (B) Pellet de eritrocitos infectados en etapas tardías del parásito después de haberlo pasado por la columna magnética y centrifugado.

### 2.2.5 Preparación de la muestra biológica infectada

Una vez aislado los parásitos en el estadio de trofozoíto/esquizonte, se tomó 20  $\mu$ L de ERs y se colocó en 10  $\mu$ L de ACD (a esta solución se le llamó ERs-ACD). Luego, se colocó 10  $\mu$ L de albúmina de suero bovino a 1 mg/mL durante 5 min; posteriormente, se lavó el microcanal con 10  $\mu$ L de solución de medir; después, se colocó 30  $\mu$ L de la solución ERs-ACD en 30  $\mu$ L de solución de medir; de ahí se tomó 15  $\mu$ L y se colocó en el microcanal.

## 2.3 Elaboración del capacitor

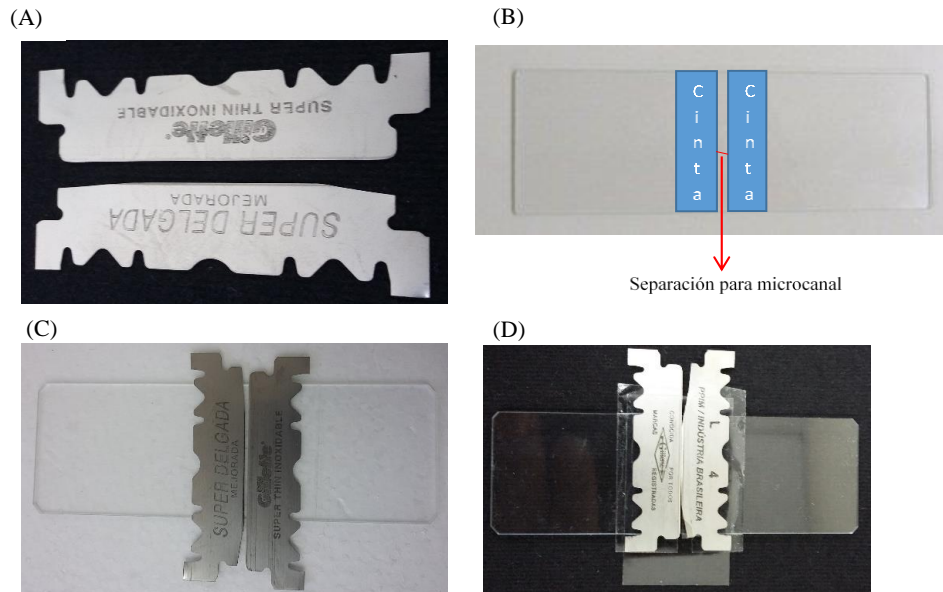
El capacitor consiste en una estructura de dos electrodos ubicados en paralelo con una separación (microcanal) entre ellos de 20  $\mu\text{m}$  a 60  $\mu\text{m}$  colocados sobre un portaobjeto, como se muestra en la Figura 17. Como se puede apreciar en la misma figura, los electrodos del capacitor se conectan a una fuente o generador de señales con lo que se produce el campo eléctrico. La intensidad del campo eléctrico al que se somete la muestra, está determinada por el tamaño del microcanal, por lo que era necesario mantenerlo en el rango antes mencionado.



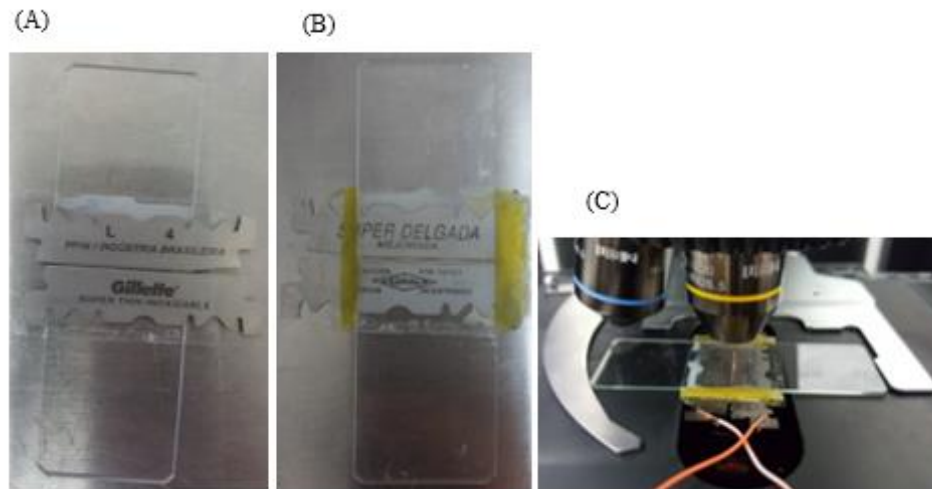
**Figura 17.** Diagrama del capacitor diseñado.

Debido al tamaño micrométrico con el que se está trabajando, se utilizaron como electrodos, hojas de afeitar convencionales (Gillette) hechas de acero inoxidable. El proceso para colocar las hojillas en el portaobjeto y alcanzar la separación deseada no fue tarea sencilla. Primero, se cortó la hojilla por la mitad, a una de ellas se le hizo un corte diagonal en las esquinas para facilitar la obtención de la separación deseada en el microcanal (Figura 18A). Posteriormente, para sujetar las hojillas al portaobjeto se utilizó cinta adhesiva doble contacto colocándola una frente a la otra como se muestra en la Figura 18(B). Con la ayuda del microscopio, se verificó la distancia del microcanal. Si no se encontraba a la distancia deseada, se movía manualmente una de las hojillas hasta obtener dicha distancia, quedando como se muestra en la Figura 18(C). Luego, se colocó un trozo de cinta adhesiva arriba de cada hojilla y sobre estas, se colocó el cubre objeto, como se muestra en la Figura 18(D), para evitar fugas de la muestra biológica ya que esta se pudiera

evaporar y/o deshidratar al exponerse a la luz del medio ambiente. Finalmente, se introdujo el material biológico en el microcanal con una micropipeta, creando así, el dieléctrico del capacitor y en vista de que es un material líquido, se sellaron con cera los bordes para evitar que se derramara, tal como se muestra en la Figura 19.



**Figura 18.** Posicionamiento de las placas (electrodos). (A) Corte de las hojillas. (B) Cinta adhesiva sobre el portaobjeto dejando una separación entre ellas sumamente pequeña (C) Colocar la hojilla que no está cortada en la cinta adhesiva (D) Por último se coloca el cubreobjeto sobre las Gillette.

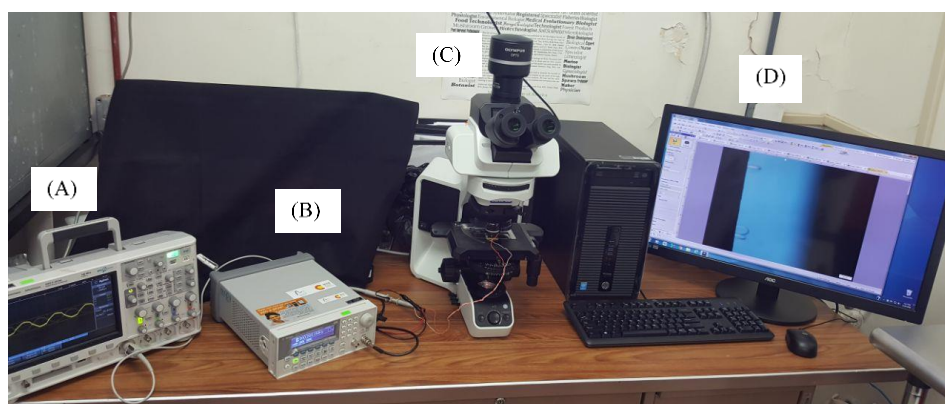


**Figura 19.** Configuración final del capacitor puesto en el microscopio. (A) Colocación de la muestra en el microcanal. (B) Muestra en el microcanal sellado con cera de vela derretida. (C) Muestra en el microscopio para aplicar campo eléctrico gradualmente.

## 2.4 Configuración del experimento

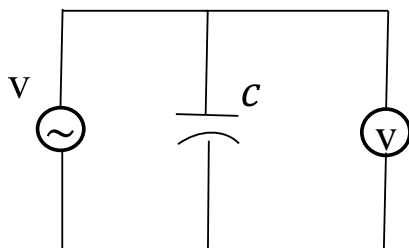
Tal como se muestra en la Figura 19, aunado al capacitor con la muestra biológica, el experimento requiere de:

- Un medidor de señales eléctricas, en este caso, un osciloscopio Agilent Technologies DSCO-X 2014<sup>a</sup> (Figura 20A)
- Un generador de señales, en este caso, Agilent 33220A de 0 a 20 MHz (Figura 20B)
- Un microscopio, en este caso, Olympus BX53, utilizando un objetivo de 100x, que cuenta con una cámara DP37 para captar imágenes y videos (Figura 20C) y un computador (Figura 20D).



**Figura 20.** Equipos utilizados en el experimento. (A) Medidor de señales. (B) Generador de señales. (C) Microscopio. (D) Computador.

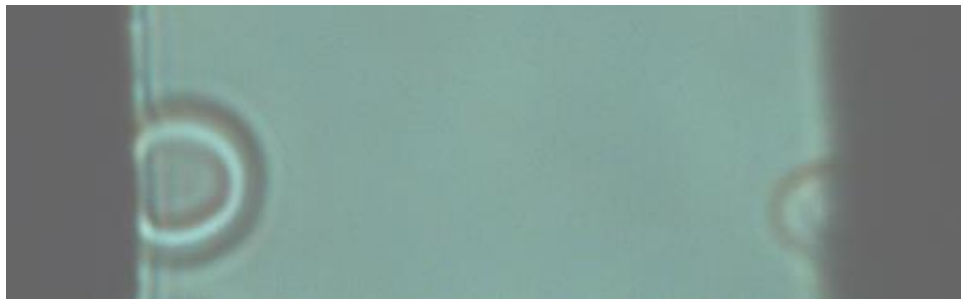
La Figura 21, muestra el circuito eléctrico para que se entiendan las conexiones de una forma más sencilla. El generador de señales está directamente conectado a las placas del capacitor que se encuentra en el microscopio, cerrando el circuito eléctrico. Adicionalmente, el osciloscopio está conectado en paralelo con el generador de señales para poder medir la señal de voltaje. Finalmente, cabe señalar que la computadora está conectada a la cámara del microscopio y se procesan las imágenes con el software CellSens.



**Figura 21.** Circuito eléctrico del experimento

## 2.5 Ejecución del experimento

Una vez armado el sistema, como se muestra en la Figura 20, se aplicó un voltaje en forma de una onda sinusoidal y se varió la amplitud del voltaje en un rango de 0 a 18 Vpp, pues es la capacidad de voltaje del equipo. Cabe señalar que el experimento se hizo a una frecuencia de 1 MHz, ya que para frecuencias mayores de 10 MHz tanto la solución como el eritrocito se comportan como aislantes y el eritrocito, se desplaza libremente en el medio, lo que no permite ejecutar el experimento. Para frecuencias menores de 0.1 MHz, los eritrocitos rotan en un eje paralelo a los electrodos, lo que tampoco permite ejecutar el experimento. Sin embargo, para las frecuencias que se encuentran en el rango  $0.1 \text{ MHz} < f_{\text{exp}} < 10 \text{ MHz}$ , y utilizando la solución ACD, y la solución de medir para asegurar un diferencial significativo, entre la conductividad del medio viscoso y el eritrocito, la polarización de Maxwell-Wagner es apreciable (Engelhardt, H. Gaub, H. & Sackmann, 1984), tal como se muestra en la Figura 22.

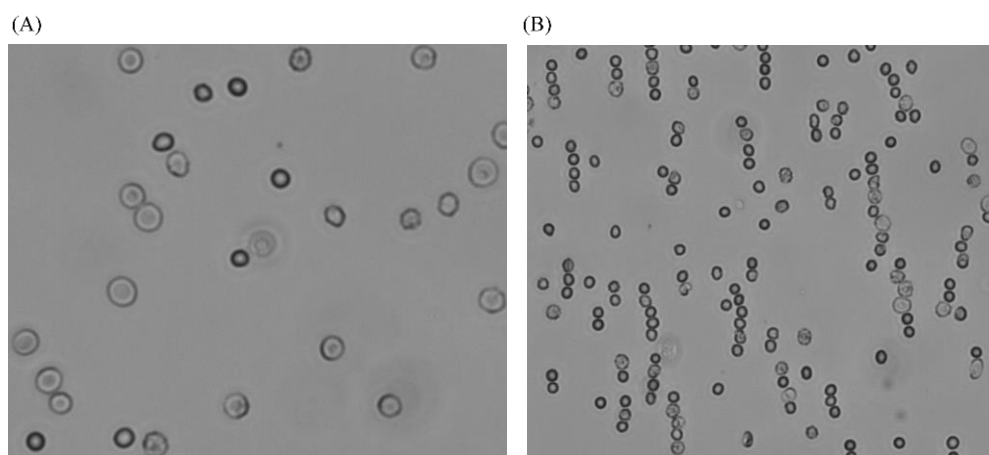


**Figura 22.** Imagen de un eritrocito polarizado a bajo voltaje.

Cabe resaltar la importancia de la solución en la que se colocan los eritrocitos, pues originalmente se habían diluidos en PBS 1X y glucosa (0.3 y 0.5 M), y tal como, se muestra en la Tabla IV y en la Figura 23, ni siquiera al rango de frecuencia entre 0.1 MHz y 10 MHz, se observó un efecto de elongación en el eritrocito (se atraían entre ellos, pero no se elongaban), pues la diferencia entre las conductividades del medio viscoso con PBS/glucosa y del eritrocito, eran mínimas y no se lograba la polarización. En la Tabla V, se muestra las conductividades de las soluciones.

**Tabla IV.** Efecto de la variación de la respuesta a distintos valores de frecuencia utilizando PBS.

Frecuencia	Voltaje (Vpp)	Respuesta
50 Hz	0-3	Formación de hidrólisis
200-500 Hz	0-10	No se observó ningún efecto
20 KHz-500 KHz	0-20	Los eritrocitos se alineaban entre ellos, pero no se deformaban
1-5 MHz	0-10	Los eritrocitos se alineaban entre ellos, pero no se deformaban



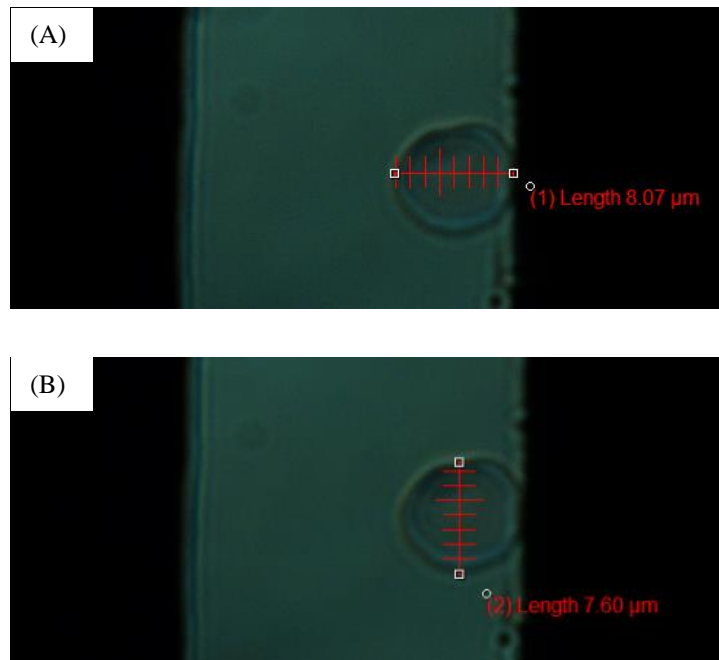
**Figura 23.** Prueba de frecuencia y eritrocitos en EDTA + PBS. (A) sin campo eléctrico. (B) expuestos a campo eléctrico a una frecuencia de 100 KHz a 8 Vpp. Esta imagen fue tomada utilizando un objetivo de 60X.

**Tabla V.** Conductividad de las soluciones.

Solución	Conductividad
PBS	18 mS/cm
Glucosa	15 mS/cm
ACD	15 mS/cm
Solución de medir	301 $\mu$ S/cm

## 2.6 Procesamiento de imágenes

A medida que se incrementa la amplitud del voltaje, en pasos unitarios, se captaron imágenes que corresponden a cada uno de esos estados. Para analizar estas imágenes se utilizó el software CellSens, el cual permite medir las dimensiones del eritrocito, tanto del eje vertical como del horizontal, tal como se muestra en la Figura 24.

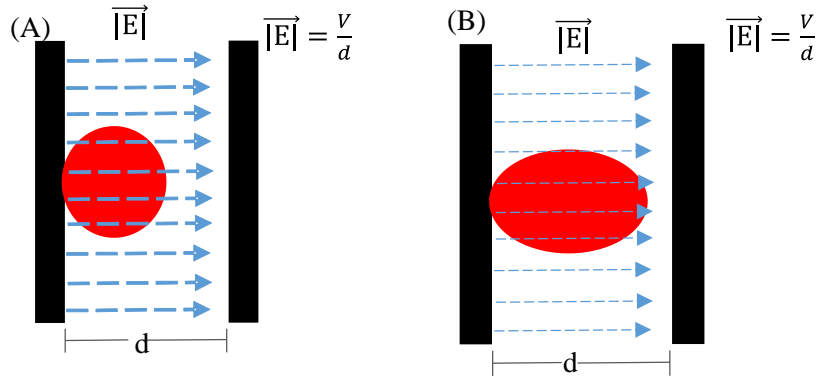


**Figura 24.** Imagen de un eritrocito con sus medidas. A) Medida horizontal (eje x), B) Medida vertical (eje y).

## 2.7 Relación electromecánica

Como se ha podido observar de la ejecución del experimento, al aplicar un voltaje eléctrico se produce un cambio de forma en el eritrocito. La relación electromecánica que existe se puede explicar físicamente de la siguiente manera. Primero, tal como se muestra en la Figura 25, se aplica un voltaje a los electrodos del capacitor, creando una diferencia de potencial, lo que a su vez crea un campo eléctrico entre dichas placas, cuya magnitud está dada por la ecuación (16).

$$|\vec{E}| = \frac{V}{d} \quad . \quad (16)$$



**Figura 25.** Diagrama del eritrocito sometido a un campo eléctrico (A) a un voltaje bajo pero creando la polarización de Wagner-Maxwell y (B) a un voltaje mayor creando la elongación.

La relación que existe entre la intensidad de campo eléctrico y la fuerza está dada por donde  $q$  es la carga eléctrica y la ecuación (17) indica la magnitud de dicha fuerza.

$$F = q|\vec{E}|, \quad (17)$$

En vista de que la carga eléctrica está relacionada con la capacitancia del material y la intensidad del campo eléctrico, con la diferencia de potencial, la ecuación (17) puede reescribirse donde  $C$  es la capacitancia de la muestra biológica y  $d$  es la distancia entre los electrodos.

$$F(t) = \frac{Cv^2}{d}, \quad (18)$$

Cabe señalar que la capacitancia de la muestra biológica tiene una mezcla de dieléctricos pues se cuenta con la permitividad relativa de la membrana del eritrocito ( $\epsilon_i = 4.44$ ) y la permitividad relativa del medio ( $\epsilon_h = 78$ ) (Gascoyne *et al.*, 2002). Si asumimos que los eritrocitos tienen una forma esférica, para usar la forma más simple de la ecuación de Maxwell-Garnet, la permitividad efectiva de la muestra biológica está dada por donde  $f$  es la fracción de volumen de las partículas esféricas y donde  $n$  es el número de eritrocitos y  $D_e$  es el diámetro del eritrocito.

$$\epsilon_{eff} = \epsilon_h \frac{1+2f \frac{\epsilon_i - \epsilon_h}{\epsilon_i + 2\epsilon_h}}{1-f \frac{\epsilon_i - \epsilon_h}{\epsilon_i + 2\epsilon_h}} \quad (19)$$

$$f = \frac{4\pi}{3} D_e^3 n, \quad (20)$$

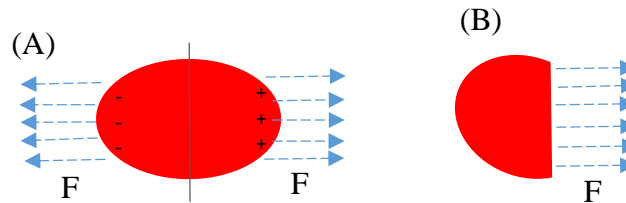
Al resolver la ecuación (19) con los datos de nuestro experimento, la permitividad relativa efectiva de la muestra biológica es muy cercana a la del permitividad relativa del medio ( $\epsilon_h = 78$ ) lo que es congruente con la relación de volumen del medio con respecto a la de los eritrocitos.

La fuerza calculada con la ecuación (18) corresponde a la fuerza neta entre placas; sin embargo, el eritrocito ocupa una pequeña fracción del área de las placas por lo que se debe calcular la fuerza ejercida sobre el eritrocito tomando en consideración la relación de áreas de la sección transversal del eritrocito ( $A_e$ ) con respecto al de las placas ( $A_p$ ), de ahí, cabe señalar que esta fuerza varía en el tiempo ya que el voltaje varía sinusoidalmente; sin embargo, el promedio temporal de dicha fuerza lo podemos expresar de la siguiente manera donde  $V$  es la magnitud del voltaje eléctrico.

$$F_{eritrocito} = \frac{A_e C v^2}{A_p d} \quad (21)$$

$$\|F_{eritrocito}\| = \frac{1}{2} \frac{A_e C V^2}{A_p d}, \quad (22)$$

Esta fuerza provoca en el eritrocito un cambio de forma, hasta alcanzar una condición de equilibrio. Cuando esto sucede, se inducen fuerzas internas en la membrana del eritrocito que equilibran las fuerzas externas producidas por el campo eléctrico, tal como se muestra en la Figura 26.



**Figura 26.** Diagrama de cuerpo libre. (A) Eritrocito en condición de equilibrio. (B) Corte transversal para analizar cómo las fuerzas internas se producen en la membrana del eritrocito.

Esta fuerza interna está relacionada con el nivel de esfuerzos ( $\sigma$ ) a través de donde  $A_m$  es el área de la membrana.

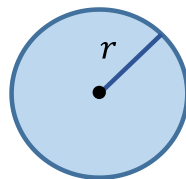
$$\sigma = \frac{1}{2} \frac{A_e}{A_p} \frac{CV^2}{d} \frac{1}{A_m}, \quad (23)$$

Por otro lado, el cambio de forma puede incluir o no una elongación del material, sin embargo, en general ocurre una elongación. En el caso del experimento realizado con el eritrocito, se puede establecer dicha elongación calculando el perímetro antes y después del cambio de forma. Utilizando el concepto de diagramas de cuerpos libres se puede elegir una sección en donde se puedan determinar de forma simple tanto las fuerzas internas como el nivel de elongación del material. En este caso, esto ocurre en la sección transversal media de la célula. Se asume que antes de la elongación, el perímetro del eritrocito tiene una forma circular ( $P_o = 2\pi r$ ) mientras que después de la elongación tiene una forma de elipsoide ( $P_e = 2\pi \sqrt{\frac{a^2 + b^2}{2}}$ ), tal como se muestra en la Figura 27.

En vista de que las deformaciones unitarias responden a un efecto geométrico, estas se pueden definir como:

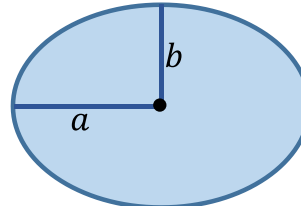
$$\varepsilon = \frac{P_e - P_o}{P_o} \quad (24)$$

Perímetro circular



$$P_o = 2\pi r$$

Perímetro elipsoide



$$P_e = 2\pi \sqrt{\frac{a^2 + b^2}{2}}$$

**Figura 27.** Perímetro del eritrocito antes y después del cambio de forma.

Finalmente, como mencionamos en el capítulo I, la relación entre los esfuerzos y las deformaciones conllevan a la obtención del módulo de elasticidad o de Young.

## 2.8 Metodología computacional

En base a la experiencia desarrollada en áreas como la ingeniería, donde se utilizan modelos computacionales basados en el método de elementos finitos para realizar diversos tipos de análisis, reduciendo así los costos de diseño y de construcción de prototipos, similarmente, desde hace algunos años, se desarrollan modelos computacionales de sistemas biológicos, esta vez para reducir la realización de costosos experimentos de laboratorio. Se han desarrollado, por ejemplo, modelos basados en elementos finitos (FEM por sus siglas en inglés) para huesos, dientes y órganos, así como también el modelado celular, el cual es mucho más complejo.

- **Método de los Elementos Finitos (FEM)**

Las limitaciones de la mente humana son tales que no puede captar el comportamiento del complejo mundo que la rodea en una sola operación global. Por ello, una forma natural de proceder de ingenieros, científicos, economistas, consiste en separar los sistemas en sus componentes individuales o “elementos” cuyo comportamiento pueda conocerse sin dificultad, y a continuación reconstruir el sistema original para estudiarlo a partir de dichos componentes. En muchos casos se obtiene un modelo adecuado utilizando un número finito de componentes bien definidos (Zienkiewicz, 2007).

Con la llegada de los computadores digitales, los problemas discretos pueden resolverse generalmente sin dificultad aun cuando el número de elementos sea muy elevado.

Muchos sistemas físicos son complejos, y su formulación matemática resulta ser un sistema de ecuaciones diferenciales cuya solución analítica no se conoce o no existe. Lo que se hace en estos casos es recurrir a soluciones aproximadas mediante métodos numéricos. Uno de los métodos más usados hoy día es el de elementos finitos (FEM, por sus siglas en inglés), en el cual se divide el sistema continuo en una cantidad de partes pequeñas o elementos. El sistema así dividido en partes se puede expresar (de manera aproximada) por un sistema de ecuaciones algebraicas para los cuales sí existe solución

analítica. Existen diferentes softwares basados en el método FEM como es el caso del software ANSYS el cual estaremos utilizando para realizar la simulación.

ANSYS es un ecosistema de programas para diseño, análisis y simulación de partes por FEM, incluye las fases de preparación de mallado, ejecución y post proceso (análisis de resultados). El programa ejecuta análisis de piezas, estructuras sometidas a fenómenos físicos, a esfuerzos térmicos, fluidos, vibración y aplicaciones específicas.

ANSYS cuenta con dos formas de trabajo; APDL en la que se trabaja a través de comandos y Workbench la cual es una interfaz gráfica de usuario amigable en donde se trabaja en base a la operación que se desea realizar. Dentro de la plataforma de Workbench, la cual utilizamos durante esta investigación, encontramos el módulo de **Mechanical**, siendo esta una herramienta de ANSYS para resolver situaciones muy particulares en diseño mecánico como elementos estructurales lineares, no lineares y análisis dinámico.

El proceso empieza con la creación de un modelo geométrico. Luego, el programa subdivide el modelo en partes pequeñas de formas sencillas, llamadas elementos, que están conectadas en puntos comunes llamados nodos. El proceso de subdividir el modelo en elementos se conoce como mallado. Los programas de análisis de elementos finitos consideran al modelo como una red de elementos interconectados. Posteriormente, se pasa a la aplicación de las cargas, al cálculo y análisis de los resultados y finalmente, al procesamiento de la información. En resumen, todos estos pasos están agrupados como tres procesos: el pre-proceso involucra la creación de la geometría, la definición de los materiales y el mallado. El proceso solución, incluye la aplicación de las cargas y la obtención de la solución. Finalmente, el post-proceso, incluye la visualización y tabulación de los resultados.

En este capítulo se verá los pasos que se realizaron para llevar a cabo la simulación.

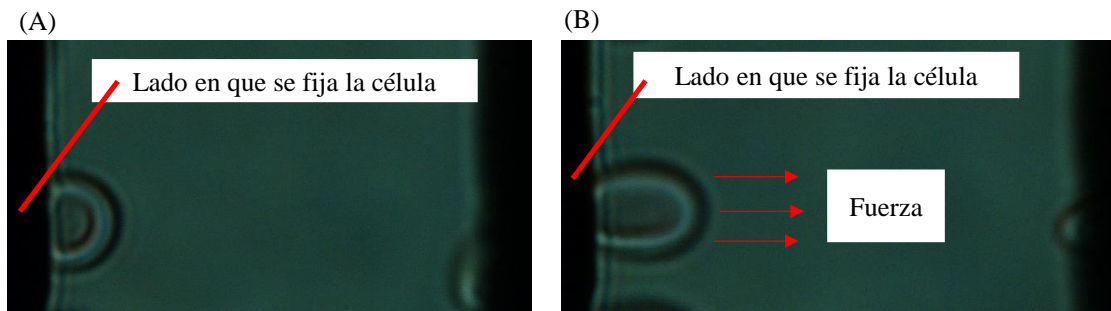
- **Simulación**

Para realizar la simulación o modelo se utilizó ANSYS versión 18.1 Academic, un software basado en FEM como técnica de análisis. Se modela tanto el eritrocito sano como

el eritrocito infectado con *P. falciparum*; para ello se procede según las siguientes etapas: realización de la geometría, definición del comportamiento de los materiales, definición de las condiciones de frontera, generación del mallado y obtención de los resultados.

### 2.8.1 Simulación del eritrocito sano

Para las simulaciones se propone el modelo que representa el comportamiento del eritrocito fijo en uno de los extremos y ejerciendo una fuerza en el otro extremo del eje horizontal, lo que nos permite comparar los resultados de la simulación con los resultados obtenidos experimentalmente pues el lado fijo representa uno de los electrodos y el otro es el extremo libre de la célula, tal como se muestra en la Figura 28.



**Figura 28.** Eritrocito en el capacitor (A) Eritrocito fijo en uno de los electrodos. (B) Eritrocito deformado cuando el campo eléctrico ejerce fuerza sobre él.

### 2.8.2. Geometría bicóncava para el eritrocito sano

Para la morfología de un eritrocito bicóncavo como se muestra en la Figura 29, la superficie del eritrocito se puede describir analíticamente mediante la siguiente ecuación: donde  $R$  es el radio y  $C_0$ ,  $C_1$ ,  $C_2$  son parámetros que describen la particular forma de la curva. Esta ecuación describe una variedad de formas de superficie. Utilizando los siguientes valores para los parámetros: se describe la forma bicóncava promedio (Evans & Skalak, 1980).

$$y = R\sqrt{1 - (x^2 + z^2)/R^2[C_0 + C_1(x^2 + z^2)/R^2 + C_2(x^2 + z^2)/R^4]} \quad (24)$$

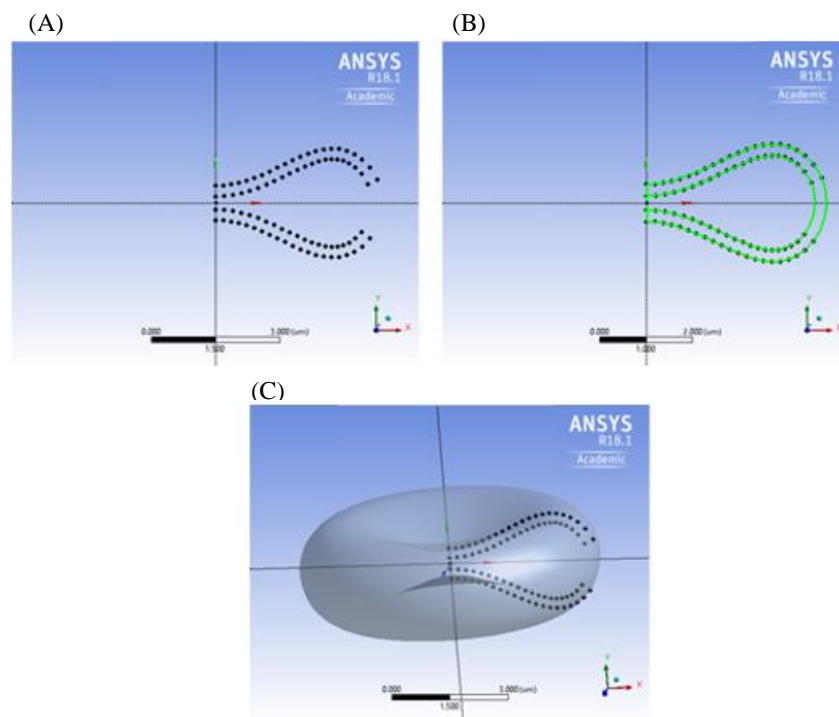
$$R = 3.20 \mu\text{m},$$

$$C_0 = 0.1035805,$$

$$C_1 = 1.001279 \text{ y}$$

$$C_2 = 0.561381$$

Para efectos de nuestra simulación, se desarrolló la geometría bicóncava con un radio  $R= 3.20 \mu\text{m}$  y un espesor de  $0.25 \mu\text{m}$ , pues son valores promedios de estos parámetros para el eritrocito. Como se puede apreciar en la Figura 29 (A), primeramente se crearon los puntos (keypoints), los cuales se calcularon con la ecuación (24) para el plano x-y. Luego, esos puntos se unieron con líneas curvas como se aprecia en la Figura 29 (B) y al unir todas las líneas se creó una superficie. Finalmente, se generó un volumen por revolución tal como se muestra en la Figura 29 (C). En vista de que se cuenta con dos partes, la membrana y el citoplasma, cada una de ellas se modeló como un volumen diferente por lo que una vez se tiene el volumen antes descrito, se debe hacer lo que en la terminología de ANSYS se llama



**Figura 29.** Modelado para el eritrocito sano. (A) Generación de puntos internos y externos. (B) Generación de curvas internas y externas. (C) Generación de áreas y volúmenes.

operación booleana de sustracción, lo que permitió separar e introducir el volumen del citoplasma dentro del de la membrana, resultando así en dos volúmenes.

En esta etapa contamos con dos volúmenes y por restricciones del mismo software en este caso se requiere aplicar las condiciones de frontera en áreas y no en puntos, por lo que

fue necesario añadir a los lados de la estructura del eritrocito dos asideros o “casquitos”, tal como se muestra en la Figura 30.

### 2.8.3. Definición de las propiedades de los materiales del eritrocito sano

Para realizar la simulación suponemos que la membrana se comporta como un material flexible, lineal, elástico isotrópico (las propiedades del material no dependen de la dirección) y homogéneo. Esta simulación se alimentó con los parámetros del módulo de Young y el coeficiente de Poisson que representa una medida del estrechamiento de sección de un prisma de material elástico lineal e isotrópico cuando se estira longitudinalmente y se adelgaza en las direcciones perpendiculares a la del estiramiento.

El módulo de Young usado es  $E = 272.58 \text{ Pa}$  el cual se obtuvo promediando los resultados de los experimentos de tensión y deformación de los eritrocitos sometidos a campo eléctrico, los cuales fueron determinado como se explica en el siguiente capítulo. Por otro lado, el coeficiente de Poisson para la membrana, 0.49, se obtuvo de lo reportado en la literatura.

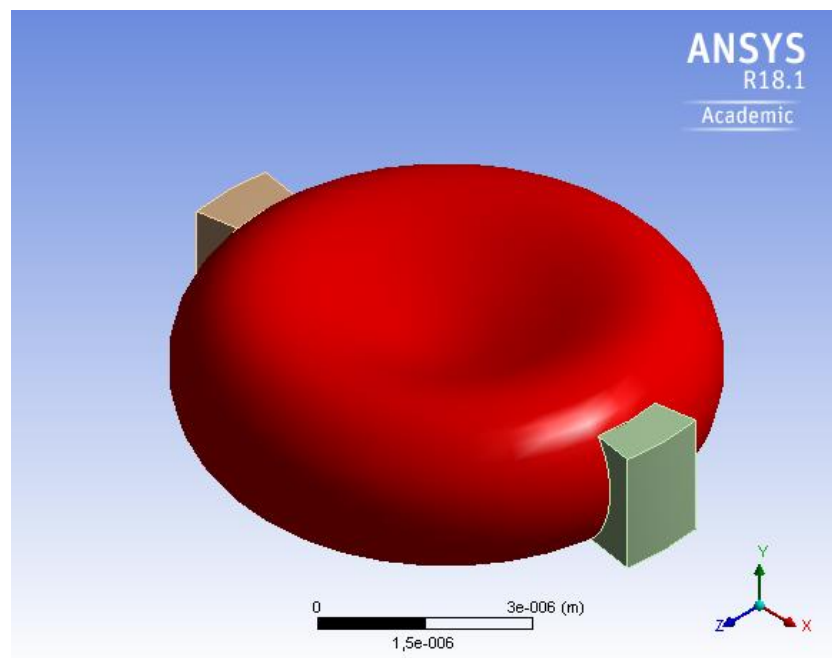


Figura 30. Geometría bicóncava con asideros.

Adicionalmente se debe definir las propiedades del citoplasma, el cual realmente es un fluido viscoso; sin embargo, en la literatura se puede encontrar que el mismo se ha podido modelar asumiéndolo como un sólido, de material incompresible de baja rigidez, utilizando un módulo de Young  $E=1$  Pa y coeficiente de Poisson 0.4999 (Dao *et al.*, 2003; Ida Laila & Ahmad, 2013). En la Figura 31 se muestra la interfaz de ANSYS donde se le asignan las propiedades del material a la geometría usada, las propiedades que se encuentran dentro del cuadro rojo son las definidas por nosotros las otras (módulo de corte y módulo de volumen) son calculados por el programa a partir del (E) y ( $\nu$ ).

Properties of Outline Row 4: Membrana

	A	B	C
1	Property	Value	Unit
2	Material Field Variables	Table	
3	Isotropic Elasticity		
4	Derive from	Young's Modulus and Poisson's ...	
5	Young's Modulus	272,58	Pa
6	Poisson's Ratio	0,49	
7	Bulk Modulus	4543	Pa
8	Shear Modulus	91,47	Pa

Properties of Outline Row 3: Citoplasma

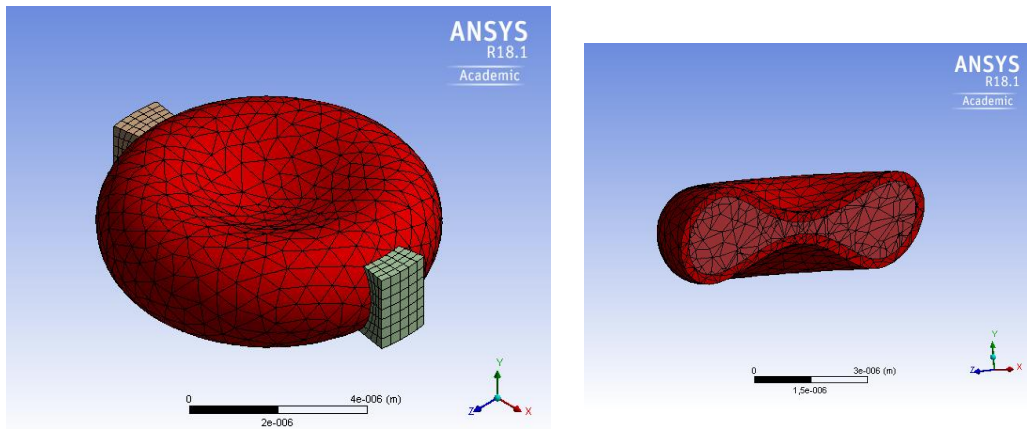
	A	B	C
1	Property	Value	Unit
2	Material Field Variables	Table	
3	Isotropic Elasticity		
4	Derive from	Young's Modulus and Poisson's ...	
5	Young's Modulus	1	Pa
6	Poisson's Ratio	0,4999	
7	Bulk Modulus	1666,7	Pa
8	Shear Modulus	0,33336	Pa

Figura 31. Interfaz material elástico isotrópico en ANSYS.

#### 2.8.4. Mallado

En este modelo, el eritrocito consiste en sólo dos componentes: membrana y citoplasma. Tanto la membrana como el citoplasma fueron representados por un tipo de elemento llamado SOLID 187 el cual es un elemento 3-D que tiene un comportamiento de desplazamiento cuadrático y es muy adecuado para modelar mallas irregulares. El elemento está definido por 10 nodos que tienen tres grados de libertad en cada nodo. El elemento tiene la capacidad de analizar: plasticidad, hiper-elasticidad, fluencia, rigidez por estrés,

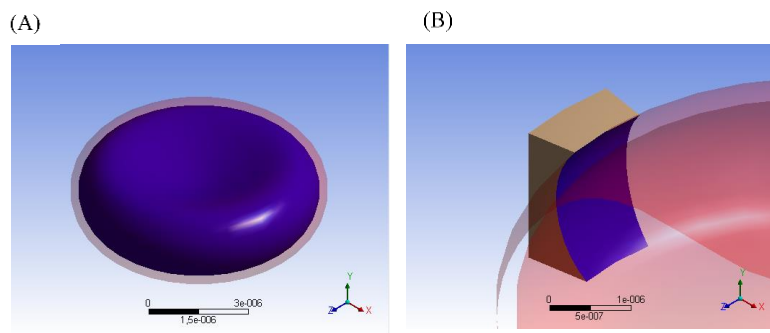
gran desviación y grandes capacidades de deformación. El mallado se realizó utilizando elementos hexaédricos y tetraédricos con un tamaño de aproximadamente  $2.4 \mu\text{m}$ ; La cantidad de nodos en la membrana y el citoplasma es de 13,801 y 6,593 respectivamente (Ver Figura 32).



**Figura 32.** Mallado.

### 2.8.5. Definición de las condiciones de frontera

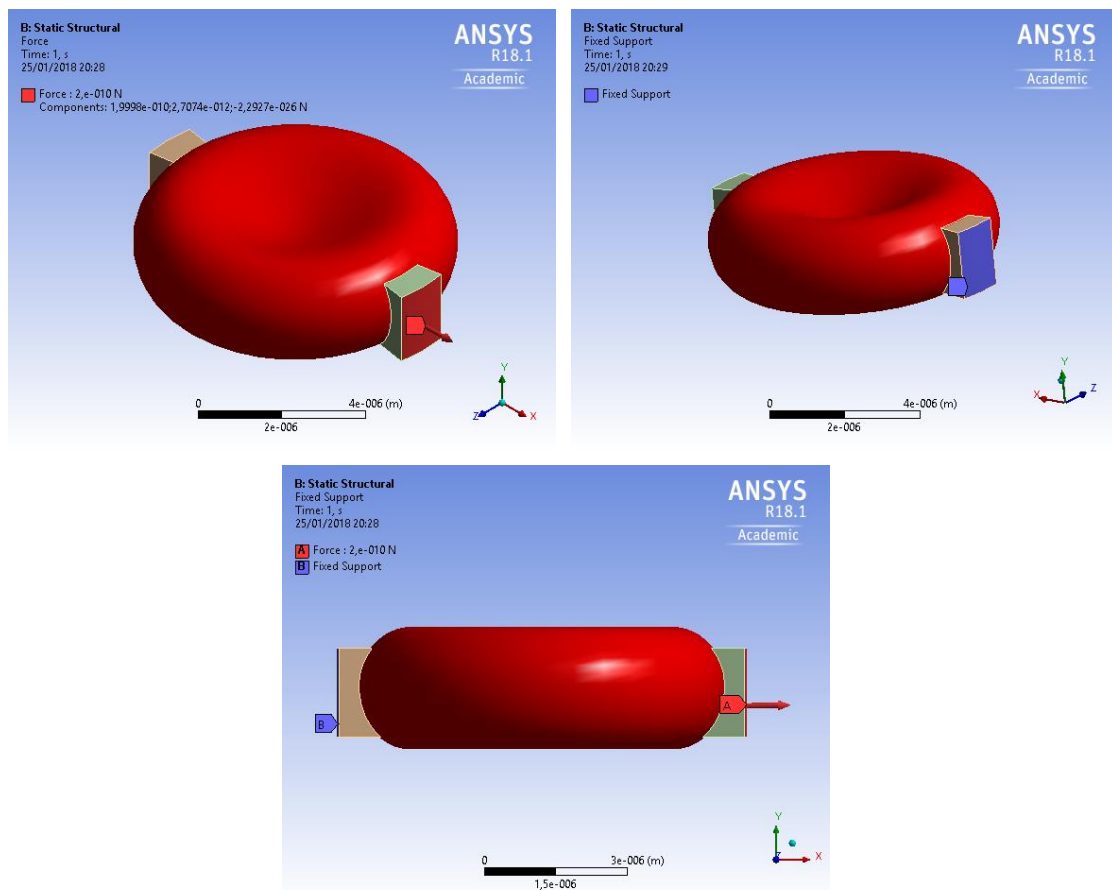
Los cuerpos de contacto físico no se superponen, por lo tanto, establecemos una relación entre las dos superficies para evitar que se intercalen en el análisis indicando que las geometrías están unidas entre sí como “bonded”, es decir, como una soldadura (Figura 33).



**Figura 33.** Asignación de las condiciones de frontera. (A) Definición de la unión entre membrana y citoplasma como una soldadura. (B) Definición de la unión entre la membrana y los asideros como una soldadura.

Como se muestra en la Figura 34, se fijó la geometría en el extremo A (esto restringe los movimientos de la célula en ese extremo) y posteriormente se aplicó la fuerza en el extremo B en la dirección  $x$ .

Una vez impuestas las condiciones de fronteras se le indicó a ANSYS los resultados que se quieren obtener de la simulación y se generó la solución. Los resultados de la simulación los discutiremos en el siguiente capítulo en la sección de resultados computacionales.



**Figura 34.** Asignación de la fuerza. En el extremo A se fija la geometría y en el extremo B se aplica la fuerza en dirección X.

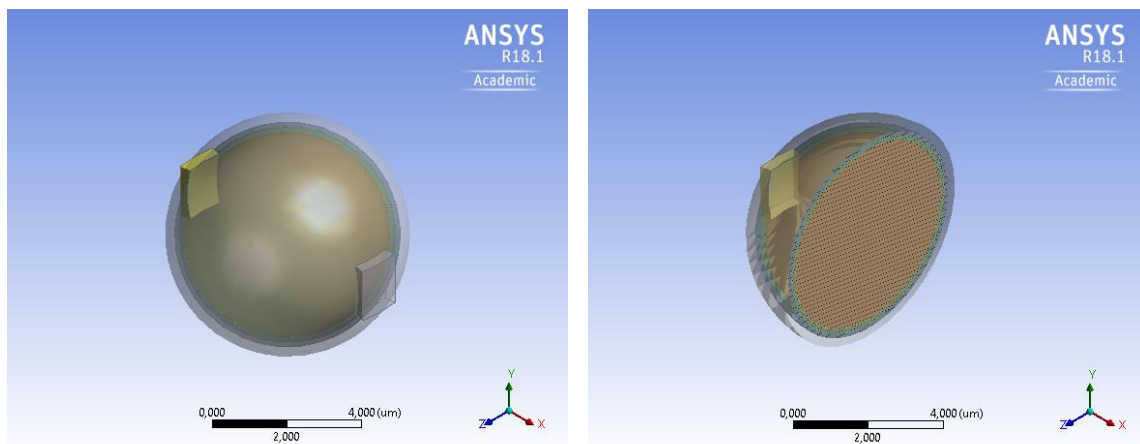
## 2.9 Geometría del eritrocito infectado en el estadio esquizonte

El proceso para simular el eritrocito infectado conlleva los mismos pasos que para el eritrocito sano. La mayor diferencia se encuentra en la geometría del mismo y la definición del material, pues ahora se debe incluir el efecto del *P. falciparum*.

### 2.9.1 Geometría Eritrocito infectado

En la etapa de esquizonte, el eritrocito infectado experimenta una marcada reducción en volumen y superficie y asume una forma más o menos esférica (Esposito *et al.*, 2010; Serebrennikova *et al.*, 2010; Shi, Li, Yin, Tan, & Lim, 2009). Los merozoítos se multiplican y forman un grupo apretado que puede ocupar el 80% del volumen del eritrocito infectado (Serebrennikova *et al.*, 2010).

Representamos el estadio de esquizonte como una esfera en donde se modela el eritrocito infectado como un esferoide con un radio  $R=3.20 \mu m$  y un espesor  $0.25 \mu m$  (Figura 35). El parásito se modela como una esfera, con un radio  $R=2.75 \mu m$  y un espesor de membrana de  $0.15 \mu m$ .



**Figura 35.** Geometría eritrocito infectado en el estadio de esquizonte.

### 2.9.2 Definición de las propiedades de los materiales del eritrocito infectado.

Según se ha reportado en la literatura, ocurren cambios en el módulo de Young de la membrana, con respecto a la del eritrocito sano, debido a cambios químicos producto de la

presencia del parásito. También la geometría del eritrocito cambia por la presencia del parásito a una estructura esférica.

Para efectos de simular el comportamiento del eritrocito infectado se ha utilizado para la membrana del eritrocito un módulo de Young de 639.6 Pa (J. Mills *et al.*, 2005) y un coeficiente de Poisson de 0.49. Para el citoplasma de la membrana se utilizó un módulo de Young 1 Pa. Para la membrana del parásito se utilizó un módulo de Young de 292 Pa y un coeficiente de Poisson de 0.49. Para el citoplasma del parásito se definió utilizando un módulo de Young de 3 Pa como se aprecia en la Figura 36.

El resto de la simulación se realizó de manera similar al eritrocito sano, en el sentido de que se debe hacer el mallado, asignar las condiciones de fronteras y las fuerzas para proceder con el análisis.

Properties of Outline Row 6: Membrana RBC1			
	A	B	C
1	Property	Value	Unit
2	Material Field Variables	Table	
3	Isotropic Elasticity		
4	Derive from	Young's Modulus and Poisson's Ratio	
5	Young's Modulus	292	Pa
6	Poisson's Ratio	0,49	
7	Bulk Modulus	4866,7	Pa
8	Shear Modulus	97,987	Pa

Properties of Outline Row 4: Citoplasma RBC1			
	A	B	C
1	Property	Value	Unit
2	Material Field Variables	Table	
3	Isotropic Elasticity		
4	Derive from	Young's Modulus and Poisson's Ratio	
5	Young's Modulus	3	Pa
6	Poisson's Ratio	0,4999	
7	Bulk Modulus	5000	Pa
8	Shear Modulus	1,0001	Pa

Properties of Outline Row 5: Membrana RBC			
	A	B	C
1	Property	Value	Unit
2	Material Field Variables	Table	
3	Isotropic Elasticity		
4	Derive from	Young's Modulus and Poisson's Ratio	
5	Young's Modulus	470,4	Pa
6	Poisson's Ratio	0,49	
7	Bulk Modulus	7840	Pa
8	Shear Modulus	157,85	Pa

Properties of Outline Row 3: Citoplasma RBC			
	A	B	C
1	Property	Value	Unit
2	Material Field Variables	Table	
3	Isotropic Elasticity		
4	Derive from	Young's Modulus and Poisson's Ratio	
5	Young's Modulus	1	Pa
6	Poisson's Ratio	0,4999	
7	Bulk Modulus	1666,7	Pa
8	Shear Modulus	0,33336	Pa

**Figura 36.** Propiedades del material para el eritrocito infectado.

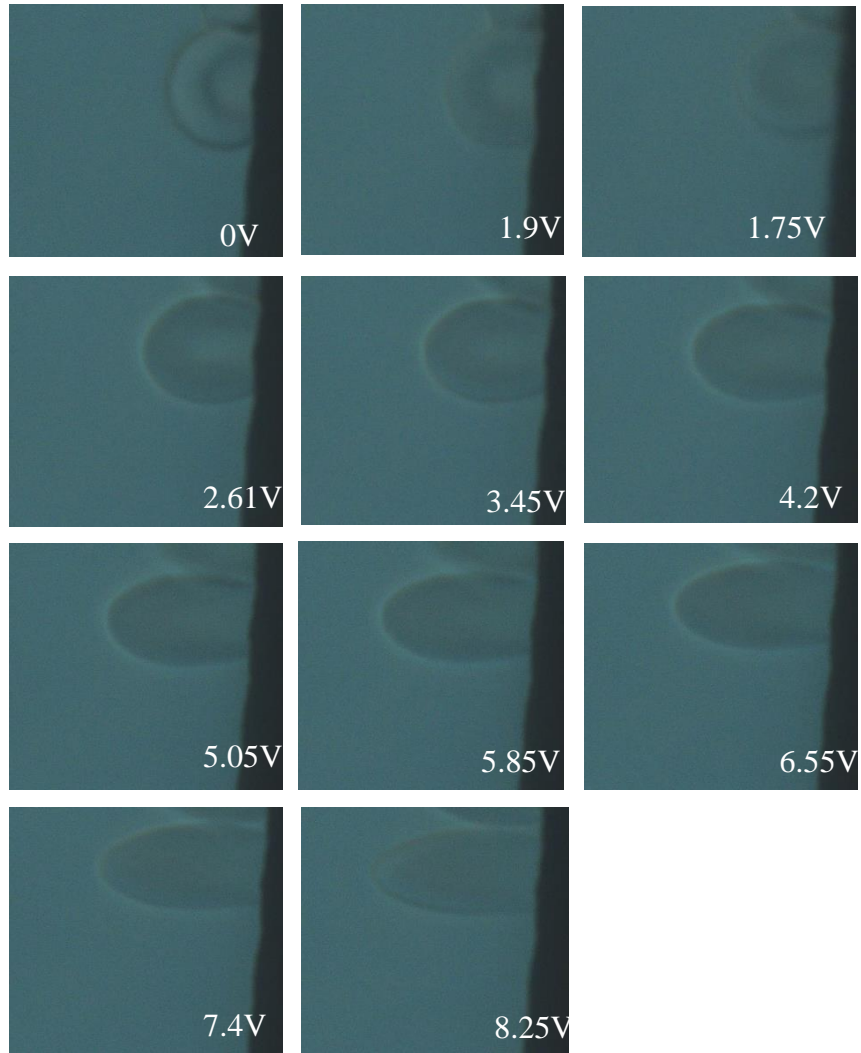
# **CAPÍTULO III: RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN**

### **3. RESULTADOS EXPERIMENTALES**

En esta sección procederemos a presentar los resultados de las experimentaciones con los que hemos caracterizado la membrana del eritrocito en términos del módulo de elasticidad, (valor que se utilizó en la simulación computacional). También se presentan los resultados computacionales.

#### **3.1.1 Resultados de los eritrocitos sanos**

Se realizaron una serie de experimentos en los que se utilizaron eritrocitos sanos para caracterizar sus propiedades de deformación. Se utilizó una frecuencia fija de 1 MHz y se aumentó gradualmente el voltaje como se observa en la Tabla VI en la parte de datos de entrada y se capturaron las imágenes como se muestra en la Figura 37. En esta sección se muestra tabla y figura de un experimento, pero en total se hicieron 10 experimentos, por lo que la información de los nueve restantes está en el anexo A. Es importante mencionar que los eritrocitos fueron expuestos a campo eléctrico sólo una vez para asegurar la integridad de las células.

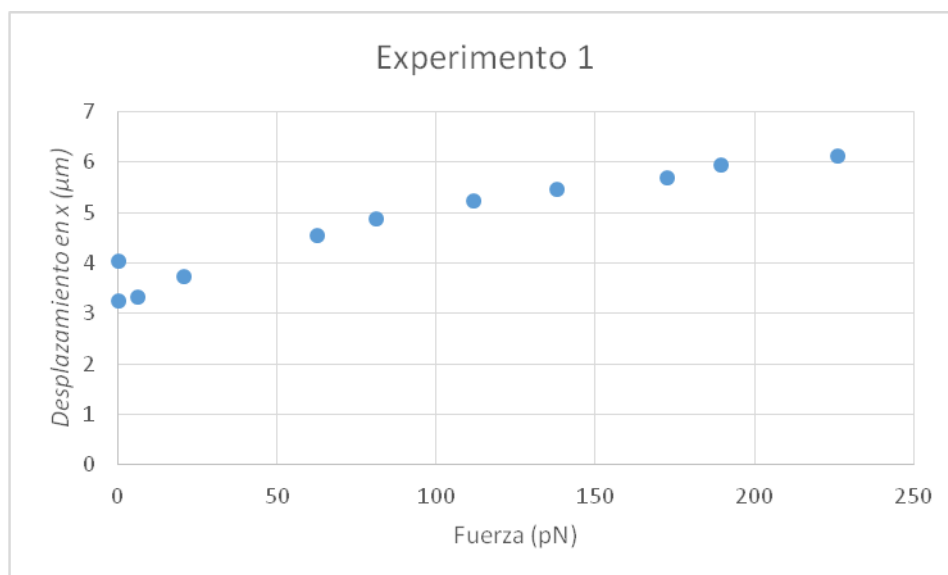


**Figura 37.** Elongación de eritrocitos producto de la variación de voltaje a 1 MHz. Esta imagen fue tomada utilizando un objetivo de 100X.

**Tabla VI.** Datos de entrada y salida del experimento 1.

Nombre de la imagen	Datos de entrada				Datos de salida	
	Amplitud (V)	Separación electrodos ( $\mu\text{m}$ )	Intensidad del campo (V/m)	Fuerza (pN)	Radio eje x ( $\mu\text{m}$ )	Radio eje y ( $\mu\text{m}$ )
0060	0	50	0	0	3.67	3.68
0061	0.9	50	18000	5.22	3.60	3.83
0062	1.73	50	34600	15.5	4.03	3.43
0063	2.6	50	52000	31.2	4.37	3.24
0064	3.4	50	68000	47.9	4.57	3.07
0065	4.25	50	85000	68.6	4.88	2.94
0066	5.1	50	102000	92.2	5.16	2.84
0067	5.9	50	118000	122	5.31	2.82
0068	6.7	50	134000	149	5.45	2.75
0069	7.5	50	150000	184	5.64	2.73
0070	8.45	50	169000	224	5.63	2.69

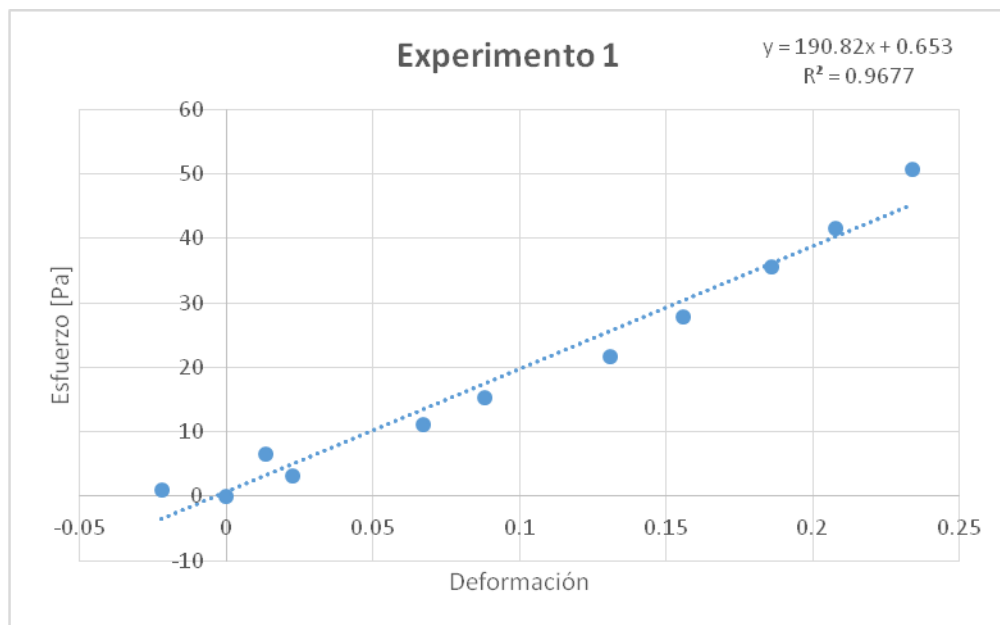
Al analizar las imágenes se midió el diámetro inicial y el diámetro final producto de cada voltaje aplicado, tanto para el eje horizontal ( $x$ ) como para el eje vertical ( $y$ ). Con estos datos fue posible ver los desplazamientos en  $x$  que ocurrían en el eritrocito a medida que se aumentaba el voltaje, como se muestra en la Figura 38.



**Figura 38.** Desplazamiento vs Fuerza.

Con los datos de la Tabla VI, se pudo calcular los esfuerzos utilizando la ecuación (1) y calcular las deformaciones utilizando la ecuación (2) para cada célula, y así, obtener el módulo de elasticidad obtenido a través de la ecuación (4). También, se calculó a cuánto equivale la fuerza con respecto a la intensidad de campo utilizando la ecuación (22), pues recordemos que el esfuerzo directo (realmente aplicado) se hizo eléctricamente pero se necesitaba conocer el esfuerzo mecánico para realizar los cálculos.

En la Figura 39, se muestran los esfuerzos  $\varepsilon$  y deformaciones  $\sigma$  para un experimento, en donde se puede apreciar el aumento en la deformación, producto del aumento del esfuerzo. Se realiza una regresión y se calcula la pendiente de dicha línea, que en este caso en particular, por el nivel de esfuerzo en el que nos encontramos, corresponde a una línea recta que representa el módulo de Young. Este procedimiento se realizó para 10 experimentos, presentamos aquí 1 de ellos; los restantes se pueden encontrar en el Anexo A.



**Figura 39.** Esfuerzo vs Deformación.

Con la misma secuencia de pasos que acabamos de explicar se analizaron los datos correspondientes a todos los experimentos (ver anexo A).

Cabe señalar que existen diferencias en los valores obtenidos en los diferentes experimentos, pero tales variaciones se pueden explicar con las razones que mencionamos a continuación:

- a) Movimiento de la célula debido al flujo y la excitación eléctrica, lo cual afecta la posición de la célula respecto a la cámara.
- b) Supuesto, que es un aproximado, sobre la forma geométrica utilizada en el modelo propuesto para el análisis.
- c) Diferencia en las células entre un donante y otro, y la longevidad de los eritrocitos en circulación.

Finalmente, en vista de que dichas diferencias afectan el resultado final, se procedió a calcular el promedio de los módulos de Young, como se muestra en la Tabla VII, obteniendo un resultado de **272.58 Pa**, el cual se utilizará en el modelo computacional pues todos mostraron la misma característica lineal. En la Figura 40, se muestra el comportamiento de un material estando según lo obtenido en los experimentos en la parte inicial, donde se aprecia la linealidad.

**Tabla VII.** Módulo de Young por experimento.

<b>Experimentos</b>	<b>Módulo de Young [Pa]</b>
<b>1</b>	190.8
<b>2</b>	235.97
<b>3</b>	219.43
<b>4</b>	144.13
<b>5</b>	187.43
<b>6</b>	759.51
<b>7</b>	323.06
<b>8</b>	130.39
<b>9</b>	361.05
<b>10</b>	174.05
<b>Promedio</b>	<b>272.582</b>

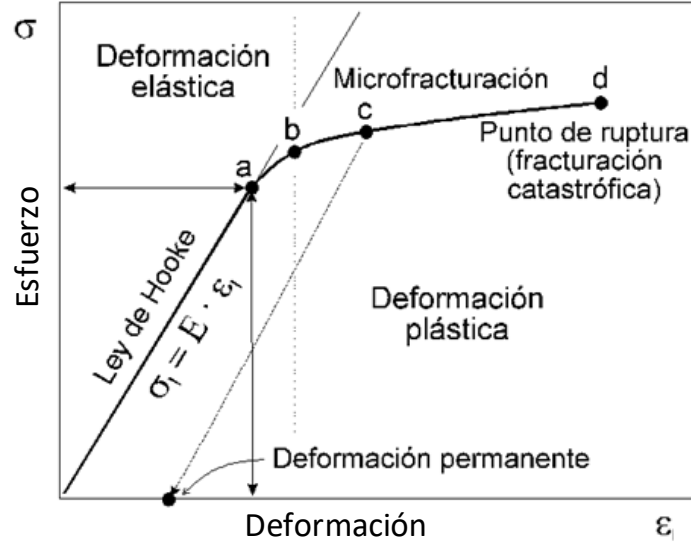


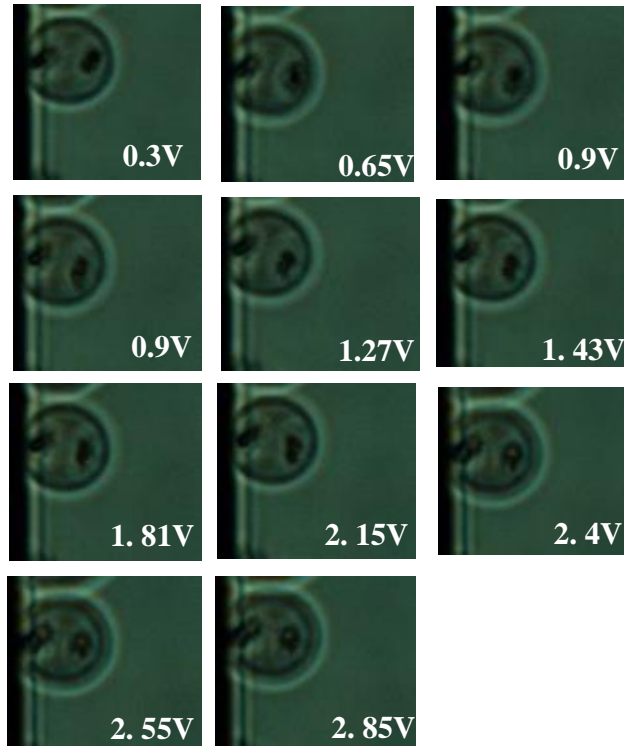
Figura 40. Comportamiento de un material.

### 3.1.2 Resultados de los eritrocitos infectados con *P. falciparum*

Para el cálculo de esfuerzos, deformaciones, desplazamientos y módulo de Young se realizó el mismo procedimiento en el estudio de los eritrocitos infectados con *P. falciparum* que en los eritrocitos sanos.

En la Figura 41, se muestra una secuencia de imágenes de un eritrocito infectado con *P. falciparum* en las etapas tardías. De igual manera, se ha expuesto la muestra a diferentes voltajes y, como es de notar, no se observa ningún cambio geométrico cuando ya se encuentra en su forma esférica. En esta sección mostramos un experimento; el resto de ellos se encuentra en el Anexo A.

En la Tabla VIII, se muestran los datos de salida y vemos que los cambios al medir el radio, tanto para el eje horizontal ( $x$ ) como para el eje vertical ( $y$ ), son mínimos; quizás no está ocurriendo ningún cambio y esos pequeños cambios que vemos es debido al movimiento de la célula y nuestras limitantes experimentales. Al no ver elongaciones no se pueden cuantificar los esfuerzos y deformaciones y por lo tanto no pudimos obtener el módulo de Young del eritrocito infectado con el parásito.



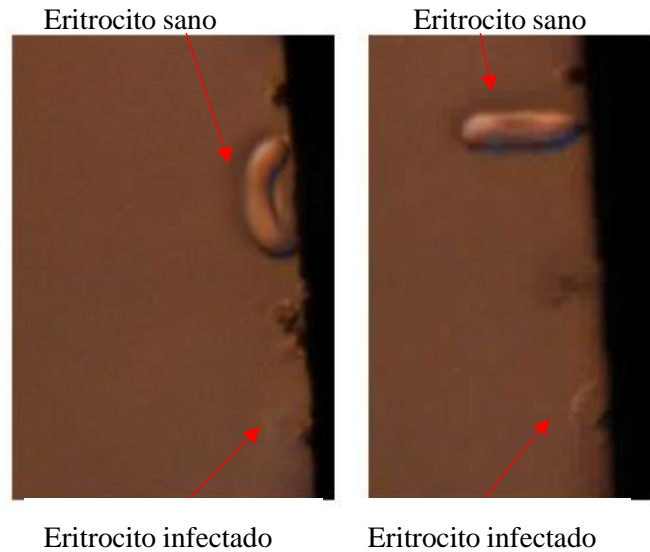
**Figura 41.** Eritrocitos infectados con *P. falciparum*. Variación de voltaje 0 a 2.85V a 1 MHz. Imagen tomada utilizando un objetivo de 100X.

**Tabla VIII.** Datos de entrada y datos de salida de un eritrocito infectado con *P. falciparum*.

Nombre de la imagen	Datos de entrada			Datos de salida	
	Amplitud (V)	Separación electrodos ( $\mu\text{m}$ )	Intensidad del campo (V/m)	Radio eje x ( $\mu\text{m}$ )	Radio eje y ( $\mu\text{m}$ )
RBCi 0011	0.3	32.5	9,239	2.51	3.54
RBCi 0012	0.65	32.5	20,018	2.62	3.45
RBCi 0013	0.9	32.5	27,718	2.40	3.52
RBCi 0014	1.275	32.5	39,267	2.65	3.55
RBCi 0015	1.435	32.5	44,195	2.50	3.54
RBCi 006	1.81	32.5	55,744	2.59	3.58
RBCi 007	2.15	32.5	66,215	2.70	3.52
RBCi 008	2.4	32.5	73,914	2.70	3.52
RBCi 009	2.55	32.5	78,534	2.54	3.48
RBCi 0010	2.85	32.5	87,773	2.43	3.39

En la Figura 42, se aprecia como un eritrocito sano; al aplicar campo eléctrico se reorienta, mientras que a un eritrocito infectado con *P. falciparum* no sufre ningún cambio apreciable.

Una de las razones por la cual no pudimos ver ningún efecto en el eritrocito infectado fue por las limitaciones del equipo, al no permitir aplicación de mayores voltajes. Algo muy interesante que pudimos observar de estos experimentos fue que al colocar la muestra con los eritrocitos infectados el voltaje máximo que pudimos alcanzar fue de 3.5 V mientras que con los eritrocitos sanos alcanzamos voltajes de hasta 9 V, lo que puede explicarse por un cambio de conductividad en la muestra.



**Figura 42.** Efecto del campo eléctrico sobre eritrocito sano y cuando está infectado con *P. falciparum*.

## 3.2. RESULTADOS COMPUTACIONALES

Para comprender el comportamiento de un modelo es fundamental visualizar adecuadamente los resultados para el análisis. El software que utilizamos, Mechanical ANSYS, ofrece una variedad de tipos de resultados como: esfuerzo (stress), deformaciones (strain), tensiones de Von Mises, desplazamientos, entre otras.

Estos resultados se pueden analizar utilizando la interfaz gráfica de usuario en base a una tabla de colores que permite mostrar los resultados en los contornos, en la totalidad o en una parte del modelo, para diversas variables de salida.

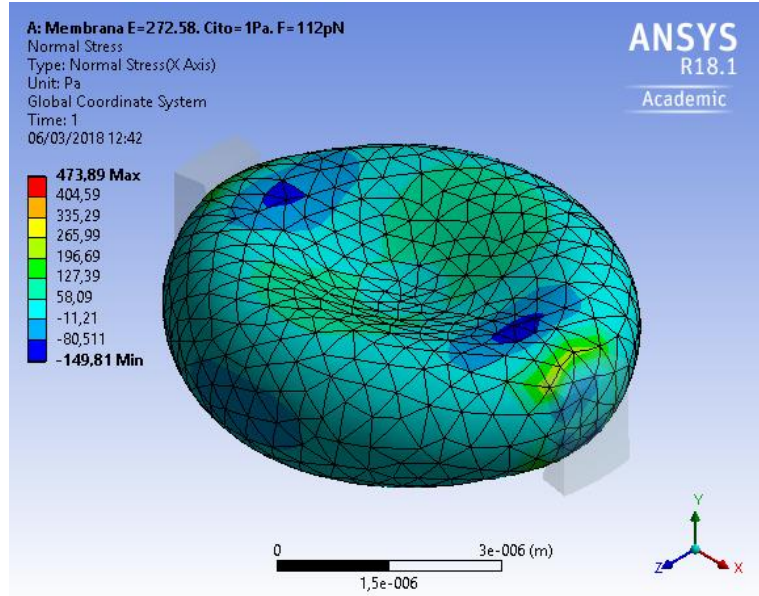
Adicionalmente, se pueden tabular series temporales de valores. Es posible también personalizar los resultados, aplicando operaciones matemáticas a los resultados primarios para obtener las magnitudes que mejor se ajusten al propósito de la simulación.

### 3.2.1 Resultados eritrocito sano

En esta sección se presenta el modelo y simulación para una fuerza de 112 pN que replica una de las utilizadas en los experimentos. Como resultado nos interesa observar los esfuerzos (stress), las deformaciones (strain) y los desplazamientos producidos, siendo estos últimos los que podemos comparar con los experimentos.

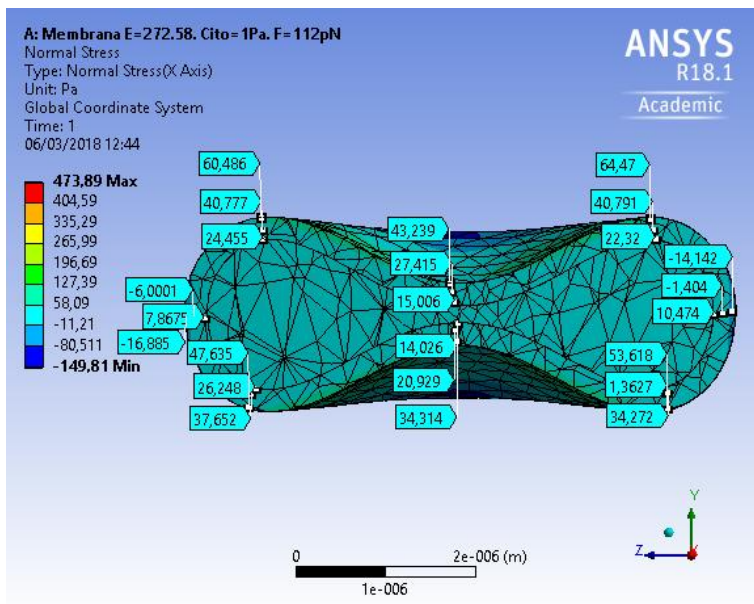
Los resultados correspondientes a la distribución de los esfuerzos normales en la dirección  $x$  (stress) se aprecian en la Figura 43. En las escalas de colores el rojo representa el esfuerzo de mayor magnitud, mientras que el azul, el menor. Es importante aclarar que el signo indica si el esfuerzo es de tensión, si es positivo (+) y de compresión, si es negativo (-).

En este caso, predominan los tonos azules, correspondientes a un rango de esfuerzo entre 58.09 hasta -80.51 Pa. Los mayores niveles de esfuerzos alcanzados se observan en el área de la célula donde se aplican las condiciones de fronteras.



**Figura 43.** Mapa de colores del esfuerzo normal (stress) para una fuerza de 112 pN.

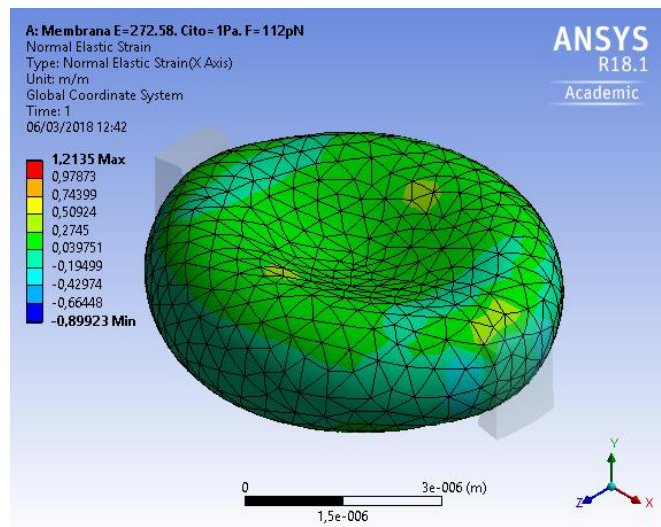
Al realizar un corte transversal y ubicar puntos en el espesor de la membrana, vemos que los esfuerzos varían y esto debido a la forma de la geometría como se aprecia en la Figura 44.



**Figura 44.** Corte transversal de la geometría. Esfuerzo normal en la dirección x (stress) para una fuerza de 112 pN.

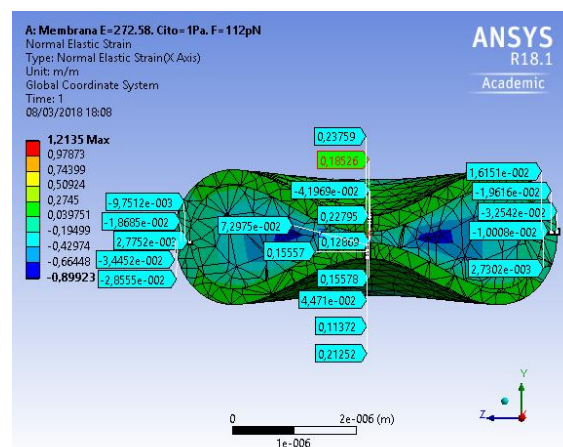
El otro aspecto que nos interesa son las deformaciones longitudinales en la dirección  $x$  (strain) que ocurren en la célula producto del alargamiento acumulativo en todos los elementos del material.

La Figura 45, muestra la deformación longitudinal en la dirección  $x$  que presenta la célula al ser sometida a una fuerza de 112 pN. Observamos en el mapa de colores que la capa externa de la célula presenta deformaciones en un rango de 0.274 hasta -0.429 m/m.



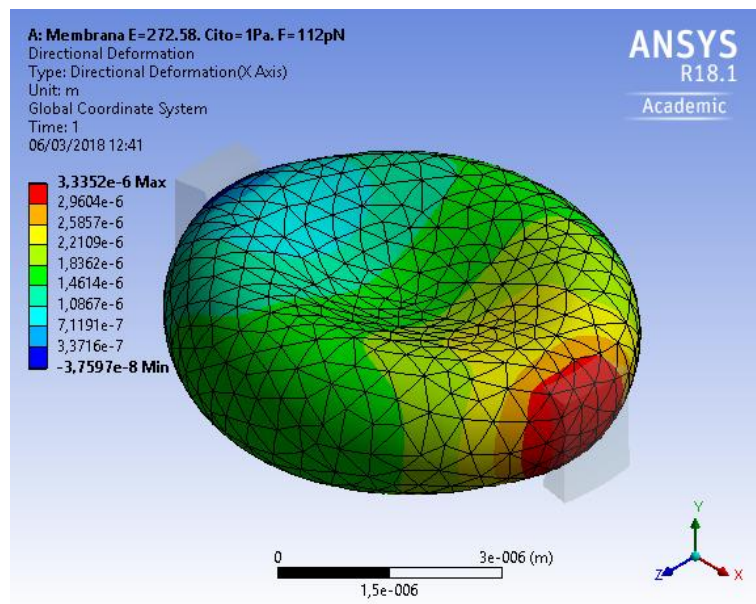
**Figura 45.** Deformación (strain) para una fuerza de 112 pN.

En la Figura 46, se muestra un corte transversal donde se observa cómo cambian notablemente las deformaciones a lo largo del espesor de la membrana en diferentes zonas.



**Figura 46.** Corte transversal de la geometría. Deformación normal en la dirección  $x$  (strain) para una fuerza de 112 pN.

Finalmente, se presentan los desplazamientos que sufre la célula para la fuerza aplicada. Como se aprecia en la Figura 47, los mayores desplazamientos ocurren cerca de la zona en donde se aplica la fuerza: el extremo anterior de la figura (zona roja); allí los desplazamientos máximos son de  $3.33 \mu\text{m}$ . En el extremo posterior (zona azul) los desplazamientos fueron mínimos y en el centro de la célula y hacia los bordes se obtuvieron desplazamientos entre  $2.96 \mu\text{m}$  a  $1.08 \mu\text{m}$ .

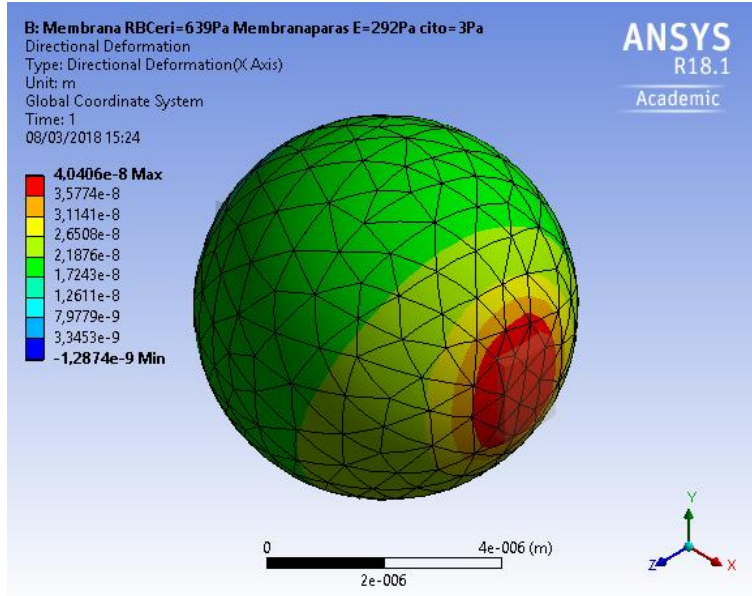


**Figura 47.** Desplazamiento en el eje x para una fuerza de 112 pN.

También se realizaron simulaciones para distintas fuerzas las cuales se muestran en el anexo C.

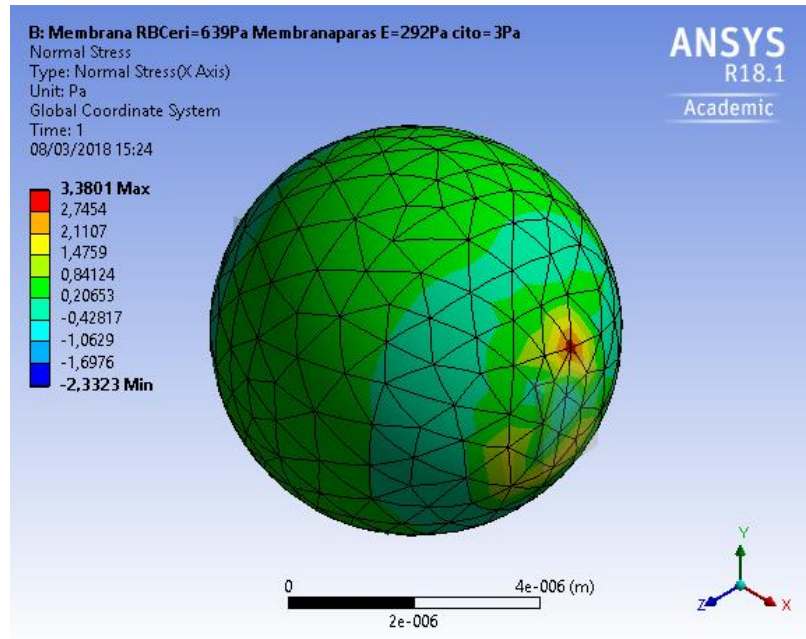
### 3.2.2. Resultados eritrocito infectado con *P. falciparum* en el estadio de esquizonte

Para la simulación del eritrocito infectado con *P. falciparum* se utilizó una fuerza de 3 pN (la máxima fuerza alcanzada en la parte experimental). En la Figura 48 podemos apreciar que los desplazamientos son mínimos lo cual concuerda con lo observado experimentalmente. Los mayores desplazamientos ocurren cerca de la zona en donde se aplica la fuerza: el extremo anterior de la figura (zona roja); allí los desplazamientos máximos son de  $0.04 \mu\text{m}$ . En el extremo posterior (zona azul) los desplazamientos fueron mínimos de  $-0.0012 \mu\text{m}$  y en el centro de la célula y hacia los bordes se obtuvieron desplazamientos entre  $0.031 \mu\text{m}$  y  $0.0079 \mu\text{m}$ .



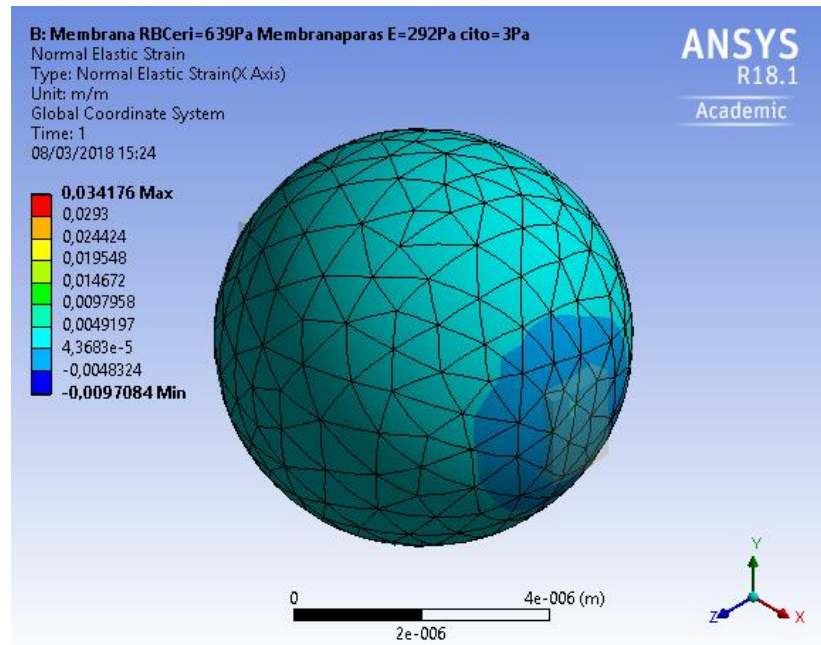
**Figura 48.** Desplazamiento en el eje x para una fuerza de 3 pN.

En la Figura 49, se aprecia la distribución de los esfuerzos normales en la dirección x (stress), predominan los tonos verde y azul, correspondientes a un rango de esfuerzo entre 0.20 hasta -1.69 Pa. Los mayores niveles de esfuerzos alcanzados se observan en el área de la célula donde se aplican las condiciones de fronteras.



**Figura 49.** Mapa de colores del esfuerzo normal (stress) para una fuerza de 3 pN.

La Figura 50, muestra la deformación longitudinal en la dirección  $x$  que presenta la célula al ser sometida a una fuerza de 3 pN. Observamos en el mapa de colores que hacia el centro de la célula presenta deformaciones entre 0.009 y 4.368 m/m.



**Figura 50.** Deformación (strain) para una fuerza de 3 pN.

Los esfuerzos, desplazamientos y deformaciones están distribuidos en el volumen, y por lo tanto varían punto a punto, debido a esto, no se pueden comparar directamente con los datos obtenidos experimentalmente, en donde no se vieron cambios significativos por las limitaciones del equipo.

## DISCUSIÓN

Para cuantificar los parámetros usados para caracterizar el modelo de la membrana del eritrocito, se realizó una búsqueda en la literatura. Se encontró que se ha reportado un amplio rango para el módulo de Young de la célula, que va desde  $2 \times 10^1$  hasta  $3 \times 10^5$  Pa (Li *et al.*, 2008). Algunos de los valores reportados son:  $500 \pm 50$  Pa (Bareil, 2007), 74.5 – 745 Pa, (Discher, 2001), 298–745 Pa (Waugh, 1987) y 154 Pa (Dao *et al.*, 2003). En esos trabajos se utilizaron diferentes técnicas para caracterizar el material, a saber: pinzas ópticas (lasser), pipetas, microscopía de fuerza atómica y campo eléctrico; por otra parte, los análisis de los diversos experimentos se hicieron siguiendo diferentes métodos. También, se ha trabajado en rangos de fuerzas diferentes, según las limitaciones de cada equipo. Todo ello contribuye a las diferencias en los valores reportados.

Con los esfuerzos y deformaciones obtenidos experimentalmente pudimos calcular el módulo de Young para el eritrocito sano, el cual se encuentra en un rango de 130.39 a 759.51 Pa, con una media aritmética de 272.58 Pa, estando este rango en concordancia con lo que indica la literatura.

La relación de esfuerzos y deformaciones obtenidas de los experimentos nos indica un comportamiento lineal del material para el rango de fuerzas utilizadas (hookeano).

Al analizar los desplazamientos obtenidos mediante la simulación, en la Figura 29, se observó un comportamiento similar: a medida que aumenta la fuerza los desplazamientos aumentan. El desplazamiento máximo alcanzado experimentalmente, al aplicar una fuerza de 112 pN, fue de 3.96  $\mu\text{m}$ . El desplazamiento máximo obtenido en la simulación, para el mismo valor de fuerza, fue de 3.33  $\mu\text{m}$ , un valor que concuerda con el experimental.

Respecto a los esfuerzos y deformaciones observados en la célula debe subrayarse que estos están distribuidos en el volumen y por lo tanto, varían de punto a punto, por esa razón, no se pueden comparar directamente con los datos obtenidos experimentalmente.

En el caso del eritrocito infectado con *P. falciparum*, se pudo observar que en los experimentos se comprueba lo expuesto en la literatura, donde se ha demostrado que los eritrocitos infectados con *P. falciparum*, se vuelven progresivamente menos deformables en las etapas maduras (trofozoíto y esquizonte) y la célula infectada, se vuelve más esférica, perdiendo así, su forma bicóncava convencional (Suresh, 2006; Suwanarusk *et al.*, 2004; Ye *et al.*, 2013).

Al aplicar el campo eléctrico a los eritrocitos parasitados en las etapas tardías, se vio que esta excitación no provoca desplazamientos en la célula. Esto puede deberse principalmente a dos factores: primero, no se pudo aplicar mayores fuerzas, pues no se contaba con el equipo adecuado, y segundo, ha sido reportado en la literatura que los eritrocitos parasitados por *P. falciparum* son rígidos y poco deformables (Mills *et al.*, 2005). La rigidez que sufre el eritrocito durante el desarrollo del parásito, está asociada a varias proteínas que se derivan del parásito, entre las cuales, al menos cinco están asociadas a la membrana del eritrocito tales como: proteína de membrana de eritrocitos del *P. falciparum* 1 y 2 (PfEMP1 y PfEMP2), y proteína rica en histidina asociada a knob (KAHRP o PfHRP1) (Magowan *et al.*, 1988), y la proteína de membrana 3 de eritrocito *P. falciparum* (PfEMP3); todas ellas se exportan desde el parásito e interactúan con el esqueleto de la membrana del eritrocito (Glenister *et al.*, 2002).

# **CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## CONCLUSIÓN

**1.0** El propósito de este trabajo fue modelar computacionalmente, utilizando el método de Elementos Finitos- un eritrocito sano o infectado con *P. falciparum*, para evaluar su deformación y elasticidad. Para cumplir dicho propósito, se realizaron experimentos en el laboratorio para caracterizar el material a utilizar en la simulación del eritrocito sano. Posteriormente, empleando los parámetros determinados en el laboratorio, se desarrolló el modelo computacional para el eritrocito sano y para el infectado con *P. falciparum* en la etapa tardía.

**2.0** Para la parte experimental, se construyó un dispositivo, tipo capacitor eléctrico, en el que se colocó la muestra con células y se les aplicó un campo eléctrico, con lo que indirectamente se produjo una fuerza mecánica que produjo una elongación en la célula. Con los esfuerzos y deformaciones obtenidos se calculó, a partir de las imágenes fotográficas de la célula, el módulo de Young para el eritrocito sano, resultando en un rango de 130.39 a 759.51 Pa, con una media aritmética de 272.58 Pa. Este valor para el módulo de elasticidad del eritrocito concuerda con lo indicado la literatura.

**3.0** Para la parte de simulación, se desarrolló un modelo computacional para el eritrocito sano, el cual fue alimentado por el módulo de Young obtenido de los experimentos y se pudo aplicar un rango de fuerzas y ver la respuesta de la célula simulada. Los desplazamientos así obtenidos concuerdan con lo observado experimentalmente.

**4.0** Adicionalmente, se desarrolló un modelo computacional para el eritrocito infectado con *P. falciparum*. Se utilizó un módulo de elasticidad de 639.6 Pa, que es el valor reportado en la literatura (debido a las limitaciones con los equipos disponibles, en cuanto a rango de fuerzas, no se procedió a la determinación experimental del módulo de elasticidad, como sí se hizo en el caso del eritrocito sano). Cualitativamente, se pudo comprobar la mayor rigidez reportada en la literatura para el eritrocito infectado con *P. falciparum* en etapas tardías.

## RECOMENDACIONES

- 1.0** Modelar el eritrocito como un material hiperelástico y comparar con el material Hookeano utilizado en este trabajo, evaluar cuál de ellos emula mejor el comportamiento del eritrocito.
  
- 2.0** Simular el citoplasma del eritrocito como un fluido utilizando la herramienta CFD (Computational Fluid Dynamics) de ANSYS Workbench. En este trabajo se simuló como un sólido de baja rigidez.
  
- 3.0** Para caracterizar experimentalmente el material del eritrocito infectado con *P. falciparum* se necesita un equipo que permita alcanzar voltajes más altos y con una mejor regulación eléctrica.
  
- 4.0** Un modelo más realista debería caracterizar separadamente el material del parásito; aquí hemos simulado como un todo el eritrocito con el parásito en su interior.

## BIBLIOGRAFÍA

- AHMAD, I. L., & AHMAD, M. R. 2013. **A Two Component Red Blood Cell Model for Single Cell Mechanic**. ARP Journal of Engineering and Applied Sciences, 1–7.
- ASHKIN, A., & DZIEDZIC, J. M. 1985. **Observation of radiation-pressure trapping of particles by alternating light beams**. Physical Review Letters, 54(12), 1245– 1248.
- BAO, G., & SURESH, S. 2003. **Cell and Molecular Mechanics of Biological Materials**. Nature Materials, 2(11), 715–725.
- BARCO RÍOS, H., ROJAS CALDERÓN, E., & RESTREPO PARRA, E. 2012. **Física: Principios de Electricidad y Magnetismo**. Manizales, Colombia. Primera Edición, Julio de 2012.
- BELYTSCHKO T., LIU W., MORANV B. & ELKHODARY K. 2014. **Nonlinear Finite Elements for Continua and Structures**. Wiley, Segunda Edición. Pondicherry, India. 400 pág.
- BINNIG, G., & QUATE, C. F. 1986. **Atomic Force Microscopy**. Physical Review Letters, 56(9), 930–933.
- CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2017. **DPDx -Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern-Malaria**. Retrieved January 8, 2018, from <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/>
- CEREZO, L. 2015. **Departamento de Control de Vectores**. Boletín Epidemiológico, 26: Malaria. 26-29
- CEREZO, L. 2016. **Departamento de Control de Vectores**. Boletín Epidemiológico, 52: Malaria. 3-4.
- CEREZO L. 2017. **Departamento de Control de Vectores**. Boletín Epidemilógico, 45: Malaria. 3-4.

- CEREZO L. 2017. **Departamento de Control de Vectores**. Boletín Epidemiológico, 50: Malaria. 3-4.
- CORONADO, L. M., NADOVICH, C. T., & SPADAFORA, C. 2014. **Malarial hemozoin: From target to tool**. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects, 1840(6), 2032–2041.
- CORONADO, L. M., TAYLER, N. M., CORREA, R., GIOVANI, R. M., & SPADAFORA, C. 2013. **Separation of *Plasmodium falciparum* Late Stage-infected Erythrocytes by Magnetic Means**. Journal of Visualized Experiments www.jove.com Video 73, e50342.
- CORONADO, L., MONTEALEGRE, S., CHAVERRA, Z., MOJICA, L., ESPINOSA, C., ALMANZA, A CORREA, R., STOUTE, J. A., GITTENS, R. A. & SPADAFORA, C. 2016. **Blood stage Plasmodium falciparum exhibits biological responses to direct current electric fields**. PLoS ONE, 11(8), 1–21.
- DAO, M., LIM, C. T., & SURESH, S. 2003. **Mechanics of the human red blood cell deformed by optical tweezers**. Journal of the Mechanics and physics of solid, 51, 2259–2280.
- DIEZ-SILVA, M., DAO, M., HAN, J., LIM, C.-T., & SURESH, S. 2010. **Shape and Biomechanical Characteristics of Human Red Blood Cells in Health and Disease**. MRS Bulletin / Materials Research Society, 35(5), 382–388.
- ENGELHARDT, H. GAUB, H. & SACKMANN, E. 1984. **Viscoelastic Properties of Erythrocyte membranes in high-frequency electric fields**. Nature, 307, 378–380.
- ENGELHARDT, H., & SACKMANN, E. 1983. **On the Measurement of Shear Elastic Moduli and Viscosities of Erythrocyte Plasma Membranes by Transient Deformation in High Frequency Electric Fields**. Biophysical Journal. Biophysical Society, 54, 495-508.
- ENGELHARDT, H., & SACKMANN, E. 1988. **On The Measurement of Shear Elastic Moduli and Viscosities of Erythrocyte Plasma Membranes by**

- Transient Deformation in High Frequency Electric Fields.** Biophysical Journal, 54, 495–508.
- EVANS, E. A., WAUGH, R., & MELNIK, L. 1976. **Elastic area compressibility modulus of red cell membrane.** Biophysical Journal, 16(6), 585–595.
- FUNG, Y. C. 1981. **Biomechanics. Mechanical Properties of Living Tissues.** Springer Science + Business Media New York.
- GASCOYNE, P., MAHIDOL, C., RUCHIRAWAT, M., SATAYAVIVAD, J., WATCHARASIT, P., & BECKER, F. 2002. **Microsample Preparation by Dielectrophoresis: Isolation of Malaria.** Lab on a Chip, 22, 70.
- GUYUE, J. 2009. **Mechanical Models for Malaria Infected Erythrocytes (tesis doctoral).** National University of Singapore.
- HEALTH ORGANIZATION, W. 2016. **World Malaria Report 2016.**
- HJELMSTAD K. 1997. Fundamentals of Structural Mechanics. Meg Weist. Springer. 420 pág.
- HOCHMUTH, R. M. 2000. **Micropipette Aspiration of Living Cells.** Journal of Biomechanics, 33(1), 15–22.
- FRANCIS S., MARK Z., HUGH, Y., & FREEDMAN, R. 2009. **Física Universitaria.** Undécima Edición. Pearson Educación. Mexico. Volumen 1. 860 pág.
- IMWONG, M., HIEN, T. T., THUY-NHIEN, N. T., DONDORP, A. M., & WHITE, N. J. 2017. **Spread of a single multidrug resistant malaria parasite lineage (PfPailin) to Vietnam.** The Lancet Infectious Diseases, 17(10), 1022–1023.
- JIAO, G. Y., TAN, K. S. W., SOW, C. H., DAO, M., SURESH, S., & LIM, C. T. 2009. **Computational modeling of the micropipette aspiration of malaria infected erythrocytes.** International Federation for Medical and Biological Engineering (IFMBE)., 23, 1788–1791.

- JIMÉNEZ, J. N. 2005. **Diversidad genética de *Plasmodium falciparum* y sus implicaciones en la epidemiología de la malaria.** *Biomédica*, 25, 588–602.
- KIM, Y., KIM, K., & PARK, Y. 2012. **Measurement techniques for red blood cell deformability: recent advances.** *Intechopen*, 1, 167–194.
- LIAO, G.-B., CHEN, Y.-Q., BAREIL, P. B., SHENG, Y., CHIOU, A., & CHANG, M. S. 2014. **Radiation pressure on a biconcave human Red Blood Cell and the resulting deformation in a pair of parallel optical traps.** *Journal of Biophotonics*, 7(10), 782–7.
- MALARIA.COM.2018. **When was malaria discovered?.** Retrieved January 7, 2018, from <http://www.malaria.com/questions/when-malaria-discovered>
- GERE J. & GOODNO B. 2009. **Mecánica de Materiales. Séptima Edición. México. Gengage Learning.** 1025 pág.
- MACIASZEK, J. L., ANDEMARIAM, B., & LYKOTRAFITIS, G. 2011. **Microelasticity of red blood cells in sickle cell disease.** *Journal of Strain Analysis for Engineering Design*, 46(5), 368–379.
- MESHNICK, S. R., & DOBSON, M. J. 2002. **The History of Antimalarial Drugs.** P. J. Rosenthal Human Press Inc. 15–26.
- MILLER, L. H., BARUCH, D. I., MARSH, K., & DOUMBO, O. K. 2002. **The pathogenic basis of malaria.** *Nature*, 415(6872), 673–679.
- NASH, G. B. 1989. **Abnormalities in the mechanical properties of red blood cells caused by *Plasmodium falciparum*.** *Blood Journal*. 742, 855–861.
- Paludismo, La Historia del Paludismo.** Retrieved January 7, 2018, from <http://www.paludismo.org/historia/>
- SMITH, J. E. 1987. **Erythrocyte Membrane: Structure, Function and Pathophysiology.** *Veterinary Pathology*, 2447 1-476 (1 987)

- SURESH, S. 2006. **Mechanical response of human red blood cells in health and disease: Some structure-property-function relationships.** *Journal of Materials Research*, 21(8), 1871–1877.
- SUWANARUSK, R., COOKE, B. M., DONDORP, A. M., SILAMUT, K., SATTABONGKOT, J., WHITE, N. J., & UDOMSANGPETCH, R. 2004. **The Deformability of Red Blood Cells Parasitized by *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*.** *The Journal of Infectious Diseases*, 189(2), 190–194.
- TALISUNA, A. O., BLOLAND, P., & D’ALESSANDRO, U. 2004. **History, dynamics, and public health importance of malaria parasite resistance.** *Clinical Microbiology Reviews*, 17, 235–254.
- TARGOSZ, M., STROJNY, W., DULIN, I., & SZYMON, M. 2006. **Stiffness of normal and pathological erythrocytes studied by means of atomic force microscopy.** *Biochemical and Biophysical Methods*, 66, 1–11.
- TRAGER W. & JENSEN J. 1976. **Human Malaria Parasites in Continuous Culture.** *Science*, 673–675.
- TRAGER, W. 1995. **Cultivation of Malaria Parasites.** *Methods in Cell Biology*, 45(C), 7–26.
- TRAVASSOS, M. A., & LAUFER, M. K. 2009. **Resistance to antimalarial drugs: molecular, pharmacological and clinical considerations.** *Pediatric Research*, 65(5 Pt 2), 64R–70R.
- UZONWANNE, B., & OBIAGELI, V. 2014. **Induced Sickling of Erythrocytes Via Bending and the Effect of Mechanical Properties on Cell Pore Entry** (tesis de maestría). African University of Science and Technology, Abuja, Nigeria.
- WANG, C. H., & POPEL, S. 1993. **Effect of red blood cell shape on oxygen transport in capillaries.** *Mathematical Biosciences*, 116, (1) 89–110.

- WHO. 2016. **Do all mosquitoes transmit malaria?**. Retrieved from <http://www.who.int/features/qa/10/en/>
- WHO. 2017. **Key points: World malaria report 2017**. Retrieved from <http://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2017/en/>
- WHO. 2017. **Malaria Key Facts**. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>
- WILKE, P. N. **Pinzas ópticas y su aplicación en biología**. Bitácora Digital. 1–5.
- WU, T. 2003. **Atomic Force Microscope Imaging of Human Red Blood Cells and Their Mechanical Properties**. Thesis Submitted for the Degree of Master of Engineering.
- YE, T., PHAN-THIEN, N., KHOO, B. C., & LIM, C. T. 2013. **Stretching and relaxation of malaria-infected red blood cells**. *Biophysical Journal*, 105(5), 1103–1109.
- ZIENKIEWICZ O. 2007. **El Método de los elementos finitos**. Editorial Reverté, S.A. Tercera Edición. Barcelona, España. 905 pág.
- ZHOU, E. H., LIM, C. T., TAN, K. S. W., & QUEK, S. T. 2005. **Finite Element Modeling of the Micropipette Aspiration of Malaria-infected Red Blood Cells**. *Proceedings of the 3rd International Conference on Experimental Mechanics*, Singapore 5852, 763–767.

**ANEXO A**

**ANEXO B**

**ANEXO C**

**ANEXO D**