

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

**IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE ASPIRACIÓN POR MICROPIPETAS
PARA LA MEDICIÓN DE PROPIEDADES MECÁNICAS EN CÉLULAS VIVAS**

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA
CON OPCIÓN EN: BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

LIBIA DARANA GUTIÉRREZ CHAIRES

Hermosillo, Sonora.

Julio de 2014.

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del Comité de Tesis designado para revisar la Tesis de Libia Darana Gutiérrez Chaires la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito para obtener el Título de Licenciada en Biología con Opción en Biotecnología.

Dr. Amir Darío Maldonado Arce
Director de Tesis

M.C. Gerardina Nubes Ortiz
Sinodal Secretario

Dr. Gerardo Paredes Quijada
Sinodal

Dr. Marco Antonio López Torres
Suplente

DEDICATORIA

A mi familia, a mi madre Griselda Chaires por haberme inculcado el gusto por aprender, el apoyo que me brindó en cada muestreo y cada migraña subsecuente.

A mi padre, Francisco Gutiérrez por su apoyo, consejos y el interés que siempre mostró por todo lo referente a mi carrera.

A mis hermanas, Akari y Paola, por las vueltas infinitas a revisar los erizos, por su compañía y todas las veces que me dejaron explicarles el proyecto como si fuera la primera vez.

A mis tías y tíos, y mis abuelos; que siempre han estado al pendiente de mis avances en la universidad, apoyándome y siempre orgullosos de todos mis progresos.

A Cynthia Pizarro, mi mejor amiga, por los ensayos de exposición, y la calma en mis momentos de frustración, gracias.

A Haydeé Rivera, mi compañera, asistente, copiloto, fotógrafa, enfermera y guía. Por estar conmigo en cada paso y todas las etapas, por ser el apoyo, la fuerza en todos los desvelos y madrugadas. Muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Universidad de Sonora, por todos los años de conocimiento que brindó al abrirme sus puertas a la formación humana y académica que sin duda me han hecho mejor persona.

Al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, por haberme recibido en su carrera y conocer tantísimas personalidades.

Al Dr. Amir Maldonado, por su gran apoyo todo este tiempo, los consejos y la grata experiencia ser su tesista. Por siempre motivarme a ir un poco más allá y todas las oportunidades que se me dieron por ser su estudiante.

Al comité de tesis, Dr. Gerardo Paredes, M. C. Gerardina Nubes y al Dr. Marco Antonio López Torres por su apoyo en la formación de este trabajo de investigación.

A CONACYT por el apoyo del proyecto “Difusión en membranas fluidas heterogéneas” (128192).

Al departamento de Física por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio de biofísica. Y gracias muy especialmente a Dr. Heriberto Acuña y al Dr. Ramón Íñiguez por siempre estar pendientes de cada paso y tropiezo, agradezco infinitamente su apoyo para la realización de este proyecto. Muchas gracias.

CONTENIDO

	DEDICATORIA	i
	AGRADECIMIENTOS	ii
	LISTA DE TABLAS	iii
	LISTA DE FIGURAS	iv
	RESUMEN	v
I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	ANTECEDENTES	2
	II.1. Técnicas para medir propiedades mecánicas de células	2
	II.1.1. Aspiración por micropipetas	2
	II.1.2. Composición por substrato	3
	II.1.3. Microscopio de fuerza atómica	4
	II.1.4. Pinzas ópticas	5
	II.1.5. Esferas magnéticas	6
	II.2. Medición de las Propiedades Elásticas	6
	II.3. Generalidades del Erizo de Mar	13
	II.3.1. Reproducción	13
	II.3.2. El Óvulo del Erizo de Mar	14
III.	JUSTIFICACIÓN	15
IV.	HIPÓTESIS	16
V.	OBJETIVOS	17
VI.	METODOLOGÍA	18
	VI.1. Fabricación de Micropipeta	18
	VI.2. Diseño del experimento	19
	VI.3. Extracción de gametos para su manipulación con micropipetas	21
	VI.3.1. Recolección de especímenes	21
	VI.3.2. Obtención de gametos	22
	VI.4. Medición de las propiedades elásticas	23

VII.	RESULTADOS	24
VII.1.	Fabricación de micropipetas	24
VII.2.	Montaje de sistema de aspiración por micropipetas	25
VII.3.	Obtención de muestras	31
VII.3.1	Obtención de gametos	31
VII.4.	Medición de las propiedades elásticas	32
VII.5.	Resultados de las mediciones	33
VIII.	DISCUSIONES	42
VIII.1.	Montaje del sistema de micropipetas para la medición del módulo elástico	42
VIII.2.	El uso de óvulos de erizo de mar para cálculo de módulo elástico	43
IX.	CONCLUSIONES	46
X.	RECOMENDACIONES	47
XI.	LITERATURA CITADA	48
XII.	APENDICE I. Registro de valores obtenidos para calcular el módulo elástico (E) Datos Experimentales Completos.	50

LISTA DE TABLAS

Tabla I	Los valores para el módulo de elástico en N/m^2 con su estimación de error.	41
Tabla II	Registro de valores obtenidos para calcular el módulo elástico (E). Datos Experimentales Completos.	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ejemplo de aspiración con micropipetas de una célula aislada.	3
Figura 2	Ejemplo de la técnica para medir motilidad celular, composición por sustrato	4
Figura 3	Diagrama de la técnica microscopia de fuerza atómica	5
Figura 4	Sencilla ejemplificación del método de pinzas ópticas	5
Figura 5	Ejemplificación de la técnica de esferas magnéticas	6
Figura 6	La diferencia en altura Δh entre la micropipeta y el nivel del agua en el recipiente, determinan la presión aplicada a la célula $\Delta P = \rho g \Delta h$.	7
Figura 7	Fotografía de un experimento de succión	8
Figura 8	Óvulo de erizo de mar succionado en una micropipeta, con los parámetros utilizados	9
Figura 9	Diferencia en el comportamiento mecánico ante succión de una célula “líquida” (neutrófilo) y una “sólida” (condrocito).	10
Figura 10	Ilustración de los resultados esperados en los experimentos de succión con micropipetas.	12
Figura 11	Estirador PC-10 de Narishige.	18
Figura 12	Microforja MF-900.	19
Figura 13	Micropipeta típica obtenida con el procedimiento descrito en el texto	19
Figura 14	Diseño del elastómetro celular. Figura tomada de Mitchinson y Swann, 1965.	20
Figura 15	El elastómetro celular atrapando un óvulo de erizo de mar. Figura tomada de Mitchison y Swann, 1965.	20
Figura 16	Primer diseño que incluía dos recipientes de agua, llave de paso, jeringa y manguera plástica.	21
Figura 17	Localización de Bahía Estela, y el lugar de muestreo “Cerro Prieto”.	22
Figura 18	La inyección de KCl 0.5 M en la región oral del erizo de mar	22
Figura 19	Óvulo de erizo de mar succionado en una micropipeta, con los parámetros utilizados	23
Figura 20	El estirado PC-10 de Narishige, en el proceso de creación de dos micropipetas a partir de un capilar de borosilicato.	24

Figura 21	Micropipeta obtenida mediante el proceso descrito de estiramiento y microforjado.	25
Figura 22	Primer diseño del montaje experimental ya montado con todos sus componentes	26
Figura 23	Micromanipulador NMN-21 de Narishige	27
Figura 24	Segundo diseño experimental	28
Figura 25	Segundo diseño montado con todas las componentes ya mencionadas	29
Figura 26	Sistema de micropipetas montado en el microscopio	30
Figura 27	Hembras de <i>E. vanbrunti</i> después de la inyección de KCl 0.5 M.	31
Figura 28	Óvulos de erizo de mar almacenados	31
Figura 29	Una serie experimental. La figura muestra cuatro imágenes del mismo óvulo sometido a diferentes presiones de succión.	32
Figura 30	El desplazamiento del dispositivo, ayudado de la plataforma de elevación manual.	33
Figura 31	Gráfica de la serie 2, con las 5 mediciones para el óvulo respectivo.	34
Figura 32	Gráfica de la serie 4, con las 5 mediciones para otro óvulo.	34
Figura 33	Gráfica con datos de 5 series que fueron tomadas el primer día después de obtener los gametos.	35
Figura 34	Gráfica de la serie 12, la cual contiene los datos de 6 mediciones hechas a un óvulo el segundo día después de la obtención de los gametos.	36
Figura 35	Gráfica con 7 datos de la serie 14 tomados en el día dos después de la obtención de los gametos.	36
Figura 36	Gráfica que contiene todos los datos de siete series (siete óvulos distintos), tomadas al segundo día.	37
Figura 37	Gráfica de la serie 16, correspondiente al día 30 con sus siete mediciones.	38
Figura 38	Gráfica de la serie 17 con sus 7 mediciones, correspondientes al día 30.	38
Figura 39	Gráfica con todos los datos obtenidos el día 30.	39
Figura 40	Gráfica con los datos obtenidos para todos los óvulos estudiados.	40
Figura 41	Gráfica con ajustes lineales a los tres grupos de datos experimentales.	40
Figura 42	Representación de las estructuras internas del óvulo.	44
Figura 43	La fotografía de un óvulo después de tomar las medidas, se puede apreciar la protuberancia que indica una deformación permanente en la membrana.	45

RESUMEN

En este estudio se montó un sistema experimental de aspiración con micropipetas con el propósito de medir el módulo elástico de óvulos de erizo de mar sin fecundar. Las micropipetas se fabricaron de capilares de vidrio en un estirador de alta temperatura; la forma final fue obtenida en una microforja; las micropipetas fueron montadas en un micromanipulador para ser observadas en un microscopio óptico invertido. Para poner en práctica el instrumento diseñado y fabricado, se realizaron 17 mediciones con óvulos de 6 erizos de mar. La aspiración de los óvulos se llevó a cabo aplicando una presión de succión controlable mediante un mecanismo hidráulico (presión hidrostática); la deformación de los óvulos se determinó midiendo directamente sobre las fotografías tomadas en el microscopio. Este procedimiento nos permitió determinar el módulo elástico de los óvulos estudiados. Se encontró que el módulo elástico (E) de las células aumenta en función del tiempo transcurrido a partir del momento en que se obtienen los gametos, es decir, la célula se hace más rígida, lo cual puede comprometer procesos básicos para este tipo de célula (fecundación, mitosis). Con nuestro trabajo encontramos que el promedio de E para los óvulos sin fertilizar de *E. vanbrunti* es de $338 \pm 224.91 \text{ N/m}^2$, $663.5 \pm 399.97 \text{ N/m}^2$ y $2613.09 \pm 997.96 \text{ N/m}^2$; estos valores corresponden a las tres fechas en que se hicieron los estudios (días 1, 2 y 30 después de la obtención de los gametos) cercanos a los encontrados en la literatura, $E = 1070 \pm 174 \text{ N/m}^2$ (Mitchinson et al, 1954). El instrumento diseñado y construido servirá para posteriores investigaciones con células en el Laboratorio de Biofísica de la Universidad de Sonora.

I. INTRODUCCIÓN

El óvulo del erizo de mar ha sido usado durante décadas en una gran variedad de estudios que han contribuido a la comprensión de los fundamentos celulares de la fertilización y herencia (Ernst, S. 1997).

El extendido uso del óvulo del erizo de mar como un modelo comparativo, es gracias a que su fecundación es externa, por lo que las condiciones ideales son mucho más sencillas de reproducir, que si se tratara de una modelo de fecundación interna.

Una de las primeras investigaciones que relacionan al óvulo del erizo de mar con el estudio de las propiedades mecánicas, data de 1954 donde fueron utilizados óvulos de erizo de mar de distintas especies y para poder medir tales propiedades se creó el elastómetro celular, lo que hoy conocemos como técnica de aspiración por micropipetas (Mitchinson, et al 1954).

El estudio de las propiedades mecánicas en materiales biológicos se ha realizado extensivamente y con ello han surgido varias técnicas que permiten medir de forma cuantitativa y cualitativa propiedades tales como elasticidad, rigidez, tracción, en niveles que van desde moleculares hasta tejido y/o sistema. Como resultado de estas técnicas se han logrado establecer las relaciones entre la forma y la funcionalidad entre los componentes de las células, ya que la flexibilidad celular va a variar dependiendo de la función que tenga cada célula (Van Vliet, et al 2003).

Es importante conocer los valores de elasticidad de las células en condiciones normales antes de emprender estudios donde se modifique su entorno, ya sea agregando contaminantes, modificando sustratos o cualquier otra variable. La técnica de aspiración con micropipetas, es muy usada en los análisis de creación de vesículas con fosfolípidos, ya que tienen que comprobar su capacidad de deformación.

El objetivo del presente estudio, es implementar la técnica experimental de aspiración con micropipetas para determinar el módulo elástico de óvulos de erizo de mar, en el laboratorio de Biofísica de la Universidad de Sonora. Para ello, diseñamos un instrumento en base a material encontrado en la literatura, el cual probamos con óvulos de erizo de mar. Nuestro instrumento puede servir a nuevas investigaciones con óvulos u otro tipo de células.

II. ANTECEDENTES

II.1. Técnicas para medir propiedades mecánicas de células

En la literatura se pueden encontrar reportes de diversas técnicas experimentales diseñadas para medir las propiedades mecánicas de células. En esta sección describiremos las técnicas que sirven para medir dichas propiedades en células aisladas. Existen también técnicas que permiten medir las propiedades mecánicas en grupos de células. Sin embargo, no los abordaremos porque la heterogeneidad de la respuesta no permite llegar a resultados concluyentes. Además, los estudios con células aisladas son interesantes porque pueden esclarecer cómo la célula reacciona a procesos mecánicos extracelulares.

Considerando que las propiedades mecánicas están relacionadas con la forma en la que la célula responde a una fuerza, la respuesta de una célula a una presión da lugar a la siguiente clasificación: elasticidad, plasticidad, fragilidad y dureza. La elasticidad es el tipo de respuesta a una fuerza que permite al material volver a su estado original, una vez retirada la fuerza que lo deformaba, mientras que la plasticidad es la propiedad que hace que la materia conserve dicha deformación, aun después de que la fuerza aplicada se haya retirado. La fragilidad está relacionada con la resistencia interna que no permite que se experimente cambio de ningún tipo, y por último la dureza es la respuesta del material que impide ser rayado o atravesado por otro material.

Existe una gran cantidad de técnicas usadas en el estudio de propiedades mecánicas de células aisladas, pero se hablará de las que exploran las propiedades mecánicas que más nos interesan (flexibilidad y módulos elásticos): aspiración por micropipetas, composición de substrato, seguimiento con partículas, microscopio de fuerza atómica, espectroscopia de alta resolución, pinzas ópticas y pinzas magnéticas.

II.1.1. Aspiración por micropipetas: La técnica de aspiración por micropipetas ha sido muy utilizada para estudiar la deformación dependiente del tiempo en células individuales sujetas a presión extracelular; se han realizado estudios en células blandas como neutrófilos y glóbulos rojos y otras más rígidas como condrocitos y células endoteliales, donde se encontró que los primeros tenían un comportamiento parecido al de una gota

líquida con una tensión superficial de $30 \text{ pN}/\mu\text{m}$ y una viscosidad del orden de 100 Pa s , mientras que los condrocitos y las células endoteliales se comportaban como sólidos con módulos elásticos de $500 \text{ pN}/\mu\text{m}^2$ (0.5 kPa) (Hochmuth, 2000). Se puede succionar total o parcialmente la célula dentro de un capilar de vidrio y se aplican presiones del rango de 0.1 - 1000 Pa con una resolución de 0.1 Pa . La presión se mantiene durante cierto tiempo, mientras la deformación dentro del capilar es vigilada vía microscopio óptico con una resolución de $\pm 23 \text{ nm}$. Por lo que la aspiración por micropipetas permite correlacionar la presión y la deformación celular. Las micropipetas y las paredes de cristal deben estar cubiertas 1% de agar para evitar la adhesión celular. Esta técnica es usada para calcular el módulo elástico, la viscosidad aparente de la membrana celular y las constantes de tiempo de la deformación y/o relajación como se aprecia en la figura 1. (Van Vliet, et al 2003).



Figura 1. Ejemplo de aspiración con micropipetas de una célula aislada.

II.1.2. Composición de sustrato: se usa para medir los efectos de la rigidez del sustrato en la motilidad celular. Es una alternativa que manipula la composición de los químicos del sustrato y por lo tanto afecta sus propiedades. Esto se puede hacer cambiando la concentración de uno de los componentes en un gel polimérico. Es importante mantener el mismo ambiente químico de la población celular, incluyendo la concentración y actividad de las moléculas activas en el sustrato que interactuaran con las células (Van Vliet, et al 2003). Es aplicada básicamente para estudiar la motilidad celular (figura 2), pero la fuerza y deflexión impuesta por la célula no son cuantificadas, por lo que no es el mejor método para analizar las propiedades mecánicas de una célula en la que no es necesario cuantificar la motilidad, como es el caso del óvulo del erizo de mar.

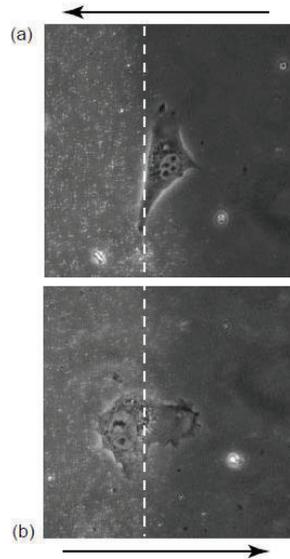


Figura 2. Se aprecia la migración de las células al pasar de un sustrato con distinta composición, imagen tomada de (Van Vliet et al 2003). La línea punteada es el límite entre la composición blanda y rígida del sustrato.

II.1.3. Microscopio de fuerza atómica (MFA): El mecanismo básico reside en una punta que va moviéndose a una velocidad constante, el movimiento de esta punta es rastreado por un láser que refleja la parte posterior de la micropalanca a un sensible fotodiodo como se ejemplifica en la figura 3. Este aparato convierte la luz láser en voltaje y este a su vez es convertido en desplazamiento determinando $V(x)$ experimentalmente. En desventaja, las fuerzas que se manejan son muy pequeñas (10-15 pN) y pueden ser enmascaradas por fluctuaciones térmicas, además del “efecto de fondo”, debido a la rigidez del sustrato donde se encuentran las células adheridas, estas pueden llegar a parecer más rígidas de lo que en verdad son (Gavara, y Chadwick, 2012). En las imágenes generadas por MFA no son por el reflexión o transmisión de fotones o electrones, sino por la aplicación de una fuerza mecánica local en la superficie de la muestra en una o más direcciones espaciales, lo que puede provocar errores en la topografía de la imagen, pero al mismo tiempo que da resultados de la superficie celular, también da datos de rigidez en la zona estudiada (Hochmuth, 2000).

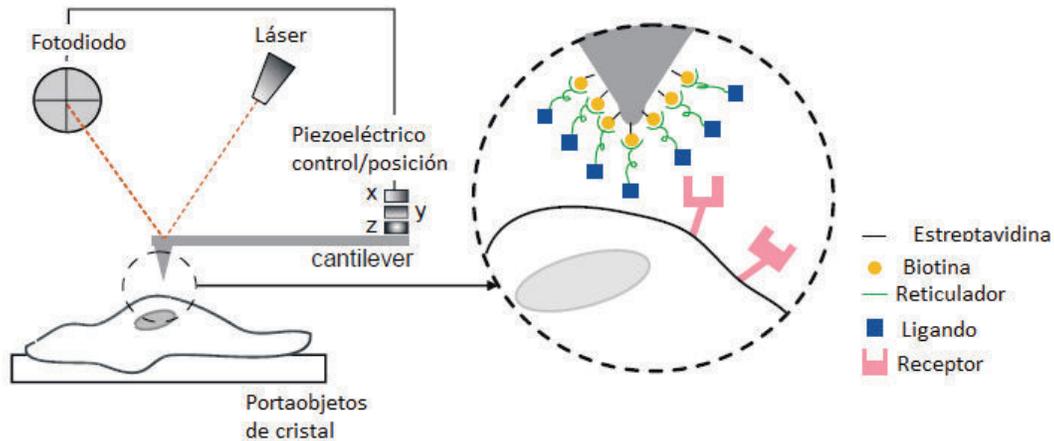


Figura 3. Ejemplificación de la técnica de microscopía de fuerza atómica, con todas sus partes.

II.1.4. Pinzas ópticas: Como la mayoría de métodos ópticos está basado en el control del desplazamiento de objetos dieléctricos que están pegados a una membrana celular o bien dentro de ella. Así mismo, este tipo de técnicas ópticas, se basan en la conservación del momento del fotón. Y esto es cuando el haz de luz es transmitido a través de un objeto dieléctrico de un alto índice de refracción, los fotones de un haz láser enfocado son sujetos a cambios del momento como consecuencia de la refracción cuando el haz entra y sale del objeto. En este cambio de momento, una fuerza de restauración es ejercida en el objeto, observada como un retroceso, en la dirección de mayor flujo de fotones (es decir, hacia el centro del gradiente de intensidad de fotones que es, de hecho, el punto focal del haz de láser) (figura 4). Esta trampa óptica se estabiliza con las fuerzas de repulsión cuando el gradiente alrededor del eje del láser domina sobre el resto de los gradientes, por lo que son necesarias lentes de gran apertura numérica (Van Vliet, et al 2003).

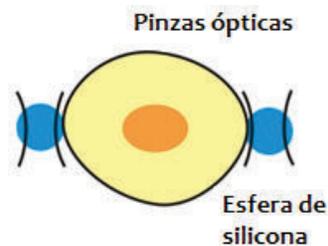


Figura 4. Sencillo ejemplo del método de pinzas ópticas.

II.1.5. Esferas magnéticas: Aquí las esferas actúan como un “agarre” en los gradientes del campo electromagnético (figura 5), y esta fuerza magnética local impone desplazamientos. Las esferas, cuyos tamaños están en intervalos de 250 nm a 5 micras de diámetro, se pueden unir por uniones ligando-específicas o no específicas, a la superficie de la célula. La magnitud de la fuerza es controlada y calibrada directamente por la intensidad del campo, y la posición de las esferas se mantiene por un circuito de retroalimentación con análisis de imágenes en tiempo real, atrapando a la esfera en un pozo potencial. Se pueden observar las deformaciones viscoelásticas de células y membrana, pero las fuerzas utilizadas suelen ser muy pequeñas (Van Vliet, et al 2003).

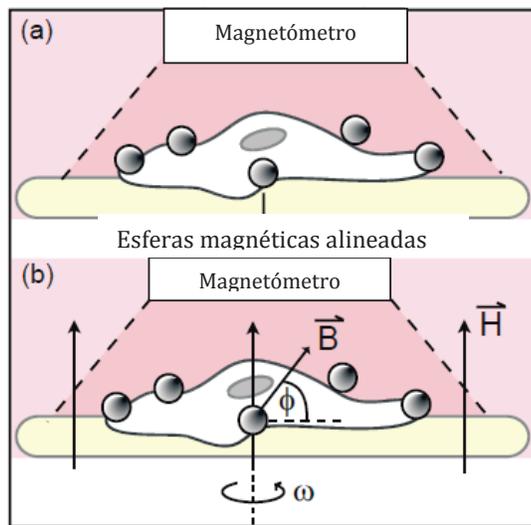


Figura. 5. Ejemplificación sencilla del método de las esferas magnéticas, figura tomada de (Van Vliet, et al 2003).

II.2. Medición de las propiedades elásticas

Dado que en este trabajo estudiaremos las propiedades mecánicas del óvulo del erizo de mar, es necesario tener un mecanismo experimental para aplicar presiones controlables de valor conocido. En nuestro caso este mecanismo utiliza la presión hidrostática generada por la diferencia en altura, Δh , entre la superficie del agua contenida en el recipiente de nuestro montaje y la micropipeta con el óvulo a aspirar (figura 6). Dado que la micropipeta

está conectada al recipiente, cuando el nivel de agua en este último es más bajo que la altura de la micropipeta, existe una presión hidrostática de succión en ella. Esta presión de succión (dirigida hacia el recipiente) ocasionará que el óvulo tienda a introducirse en la pipeta, según su elasticidad o rigidez. Es posible determinar el valor de la presión de succión a partir de la ecuación para la presión hidrostática de la mecánica de fluidos:

$$\Delta P = \rho g \Delta h \quad (1)$$

En esta fórmula, ΔP es la presión de succión, ρ es la densidad del agua utilizada, g es la aceleración debida a la gravedad y Δh es la diferencia de nivel entre el agua en el recipiente y la micropipeta (figura 6). De esta manera, variando la diferencia de alturas Δh , al succionar agua con la jeringa o al hacer descender el recipiente con agua, se puede variar la presión de succión aplicada ΔP .

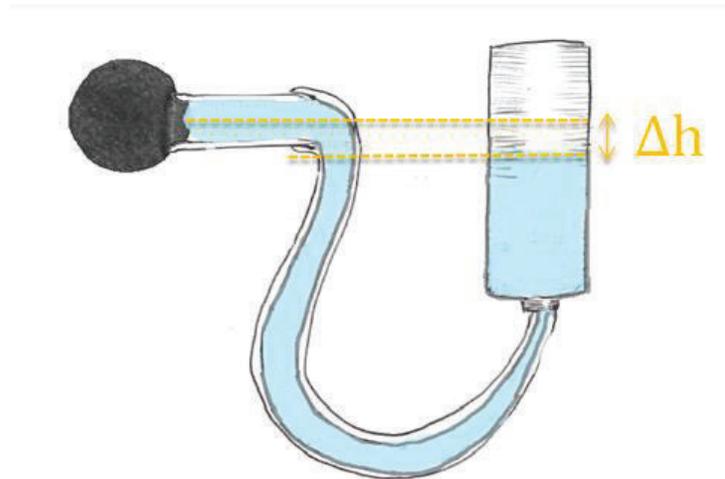


Figura 6. La diferencia en altura Δh entre la micropipeta y el nivel del agua en el recipiente, determinan la presión aplicada a la célula $\Delta P = \rho g \Delta h$. En el caso esquematizado, la presión es de succión pues el nivel del agua es más bajo en el recipiente.

Con el montaje anteriormente descrito se pueden aplicar presiones de succión y por lo tanto atrapar y deformar células, tal como se muestra en la figura 7. Esto es debido a que la presión interna de la pipeta es menor que la presión en el exterior (presión atmosférica). Como resultado, hay un desbalance de presiones que empuja a la célula hacia el interior de la micropipeta.

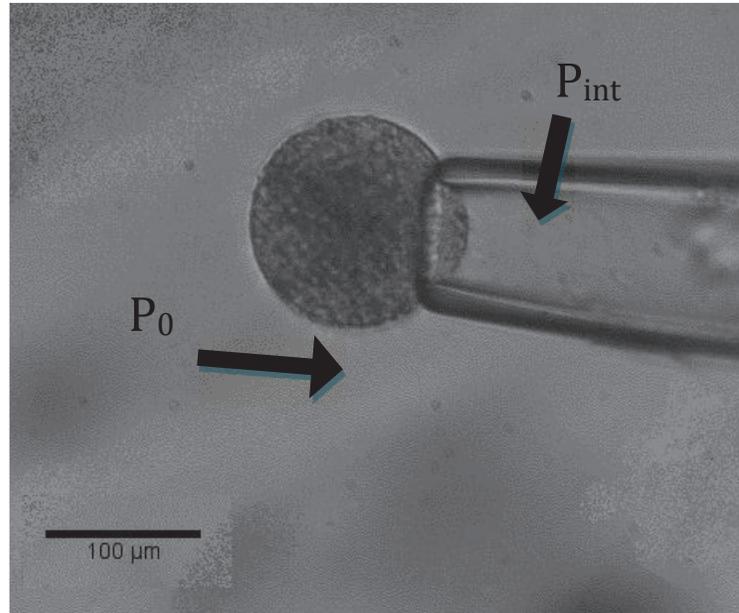


Figura 7. Fotografía de un experimento de succión. En el interior de la micropipeta, la presión (P_{int}) es menor que la presión externa (P_0) debido a la diferencia en presión hidrostática del sistema (ecuación 1). El resultado es que el óvulo es empujado hacia el interior de la micropipeta.

Como veremos posteriormente en la teoría, las dimensiones que son necesarias de medir son el radio de la micropipeta R_p y la distancia de penetración en la micropipeta del óvulo succionado L_p . Estas dimensiones se muestran en la figura 8.

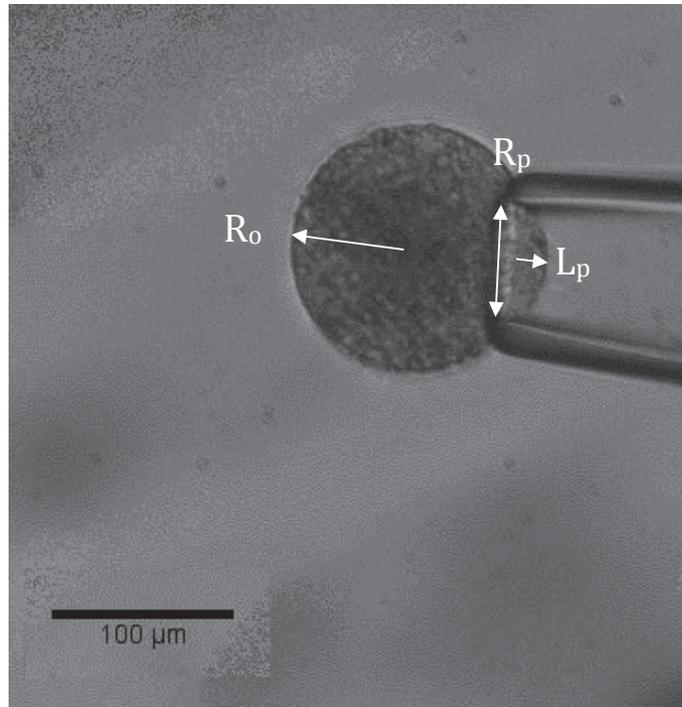


Figura 8. Óvulo de erizo de mar succionado en una micropipeta. Se señalan los parámetros geométricos que se miden para determinar la deformación de la célula. R_p es el radio de la pipeta, L_p es la longitud de la parte del óvulo dentro de la micropipeta y R_o es el radio del óvulo.

Cuando se succionan células biológicas, estas se deforman respondiendo a la presión de succión externa, como se muestra en la figura 8. Se ha encontrado que existen dos tipos posibles de comportamiento elástico: células que tienen un comportamiento tipo “líquido” o células que tienen un comportamiento de tipo “sólido elástico” (Hochmuth, 2000). En la figura 9 se ilustran ambos comportamientos; la célula del tipo “líquida” es un neutrófilo, mientras que la “sólida” es un condrocito. En el caso “líquido”, la célula tiene una tendencia a fluir y penetra con relativa facilidad en la pipeta, llegando a tener distancias de penetración L_p mayores que el radio mismo de la micropipeta R_p . En cambio, en el caso sólido, la célula presenta mayor oposición a la deformación y la distancia de penetración L_p no llega a ser mucho mayor que el radio de la pipeta R_p . Es importante determinar el tipo de comportamiento, “líquido” o “sólido” de la célula bajo estudio, porque de esto depende el tipo de teoría que se emplea para analizar los resultados.

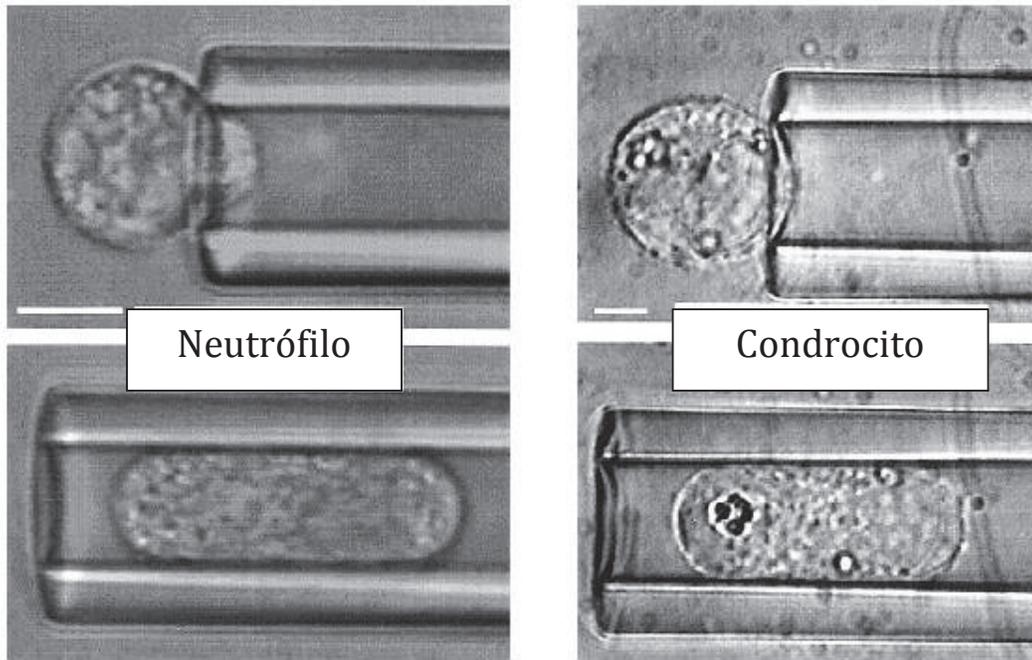


Figura 9. Diferencia en el comportamiento mecánico ante succión de una célula “líquida” (neutrófilo) y una “sólida” (condrocito). Figura tomada de [Hochmuth, 2000]. Nótese la diferencia en la penetración de ambas células en la pipeta (fotografías superiores).

Para saber si una célula determinada se comporta de manera “líquida” o “sólida” es necesario hacer el experimento y visualizar su deformación. Como mostraremos en la sección de resultados, el óvulo del erizo de mar estudiado se comporta de manera “sólida”, lo cual concuerda con los resultados de Mitchison y Swann (Mitchison, et al 1954). Por esta razón, nuestro análisis será realizado en términos del comportamiento tipo sólido elástico.

En este caso, la distancia de penetración de la célula en la pipeta L_p es proporcional a la presión de succión aplicada ΔP : $L_p \sim \Delta P$. La ecuación completa es (Hochmuth, 2000):

$$\Delta P = \frac{2\pi}{3} \phi E \frac{L_p}{R_p} \quad (2)$$

Donde R_p es el radio de la micropipeta y ϕ es un factor que depende de la geometría (relación entre el espesor del vidrio de la pipeta y el radio de la misma); este factor es del orden de $\phi = 2.1$, valor que nosotros consideraremos constante en nuestros cálculos. El coeficiente E es el módulo elástico de la célula.

Para entender el significado del módulo elástico E , imaginemos que se succionan células diferentes en pipetas del mismo radio R_p . Imaginemos también que succionamos de tal forma que la deformación L_p de cada célula es igual. Vemos entonces de la ecuación anterior, que la presión de succión ΔP es proporcional al módulo elástico E (puesto que

todos los demás valores son constantes e iguales para cada célula). Entonces, para conseguir la misma deformación, valores altos de E implican una presión ΔP alta (la célula es “rígida”), mientras que para valores bajos de E se requieren una presión ΔP más baja (la célula es “flexible”). Esta es la razón de denominar “módulo elástico” a la variable E, puesto que su valor determina el grado de rigidez o elasticidad de la célula.

En la literatura se han reportado valores del módulo elástico para diferentes células. Por ejemplo, para condrocitos se ha determinado $E = 103 \text{ pN}/\mu\text{m}^2$ (Hochmuth, 2000).

La ecuación 2 sugiere un procedimiento experimental para determinar el módulo elástico E. Si recordamos que las variables que se miden en nuestro experimento son la presión de succión ΔP , así como la distancia de penetración L_p y el radio de la micropipeta R_p , vemos que hay una relación de proporcionalidad entre ΔP y el cociente L_p/R_p . Esto es, si en un plano x-y se grafica L_p/R_p en el eje de las abscisas y ΔP en el eje de las ordenadas, la ecuación predice que los puntos se deben acomodar a lo largo de una recta de pendiente $\frac{2\pi}{3}\varphi E$. Recordemos que la ecuación de una recta que pasa por el origen es $y = mx$, donde m es la pendiente. Entonces, para determinar E, es necesario trazar una gráfica ΔP vs L_p/R_p , ajustar los datos a una recta para obtener la pendiente m; dado que $m = \frac{2\pi}{3}\varphi E$, de aquí se puede despejar y calcular el valor de E.

En la figura 10 ilustramos este procedimiento con puntos ficticios. En dicha figura, los cuatro puntos representan una serie de medidas para un óvulo; cada punto tiene la información de una presión de succión ΔP y de una deformación L_p . En la figura se ha trazado ΔP vs L_p/R_p . Los puntos se acomodan más o menos a lo largo de una recta. Con un programa de ajuste, se encuentra la recta que mejor describe a los puntos (trazada en la figura 10). De la pendiente de dicha recta se encuentra el módulo elástico, como se ha descrito en el párrafo anterior.

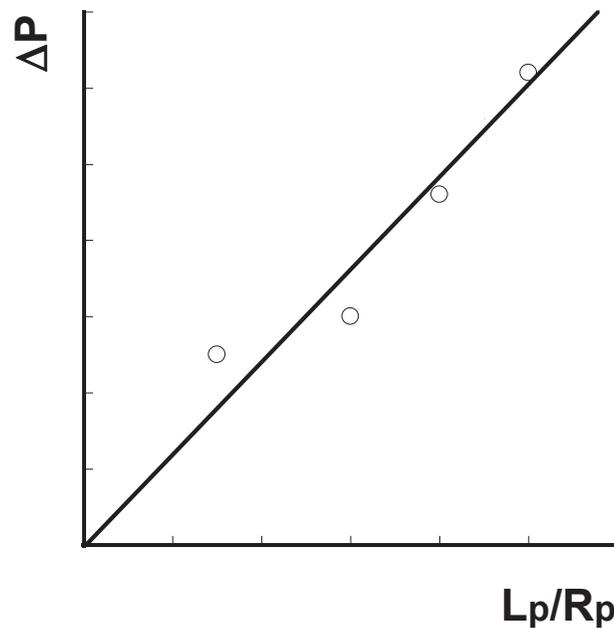


Figura 10. Ilustración de los resultados esperados en los experimentos de succión con micropipetas. Los puntos representan puntos experimentales ficticios (se ha graficado la presión de succión ΔP en función del cociente L_p/R_p). La recta es un ajuste a los datos; de la pendiente de esta recta se obtiene el módulo elástico de la célula, con el procedimiento descrito en el texto.

En nuestros experimentos, determinamos E de esta forma, graficando la presión ΔP aplicada en función del cociente entre la deformación conseguida y el radio de la micropipeta L_p/R_p . De la gráfica experimental se obtiene la pendiente, de la cual se obtiene el valor del módulo elástico dividiendo por los factores necesarios. Cabe hacer notar que, dado que en la ecuación que define al módulo elástico E , este parámetro aparece en la pendiente de la gráfica ΔP vs L_p/R_p , no es necesario tener los valores absolutos de ΔP , sino solamente variaciones de un punto a otro, pues con estas se puede calcular la pendiente. Esta ha sido la aproximación que hemos seguido, para evitar buscar el cero de presión $\Delta P = 0$.

II.3 Generalidades del Erizo de Mar

Los erizos de mar son invertebrados exclusivamente marinos, pertenecientes a la clase *Echinoidea*, del phylum de los equinodermos. Este phylum tiene como característica una simetría pentarradial y se caracterizan por tener un exoesqueleto formado por placas calcáreas, forma pseudoesférica y espinas móviles punzantes, relativamente largas, y les sirven para desplazarse.

Los erizos de mar son regularmente pequeños, su tamaño va de 6 a 12 centímetros de diámetro, aunque algunas especies pueden llegar a medir 36 cm. Su rango de colores es muy variado; va desde negro, algunos verdes, café, morado y rojo. Generalmente las púasson cilíndricas y se van haciendo delgadas, conforme llegan a las puntas, la forma más común es la aguja, como muchos especímenes del género *Diadema*, que logran moverlas rápidamente cuando detectan la señal de un depredador por medio de su sombra (Barnes, 1977).

Se alimentan de algas, por lo que son llamados animales bentónicos, esto debido a que su región oral se encuentra siempre en contacto con el sustrato del que raspan las algas que consumen.

Tienen una gran importancia trófica, debido a todos los nichos que ocupan. Hay que señalar que no están distribuidos al azar por el bentos, ellos tienen asociaciones definidas, claro caracterizadas por alimento o bien competitividad de especies dominantes. (James, 2000; Toro-Farmer et al., 2004) Aunque también son considerados como agentes perturbadores en determinados sistemas costeros, ya que pueden a llegar a tener florecimientos poblaciones lo que causa un desequilibrio, debido a su voracidad, (Dean et al., 1984; Dayton et al., 1992; Benedetti-Cecchi y Cinelli, 1995) afectando la estructura del hábitat y modificando los recursos para moluscos, peces y mamíferos (Duggins, 1989; Andrew y Constable, 1999).

II.3.1. Reproducción. Los erizos de mar se caracterizan por tener un ciclo de vida con reproducción sexual externa, son organismos dioicos pero no presentan dimorfismo sexual, aunque existen métodos para averiguar el sexo del animal, que consisten en la observación de muestras de gónadas bajo el microscopio. Poseen cinco gónadas suspendidas a lo largo de la cara interna de cada zona ambulacral del caparazón. Desde cada gónada sale un pequeño gonoducto hasta los gonoporos, por donde salen los gametos al exterior.

La mayoría de las larvas prefiere asentarse cerca de los adultos, se piensa que bajo la protección de las espinas calcáreas. Es bien sabido que los erizos pueden vivir mucho tiempo.

El mecanismo que utilizan para su reproducción, bien puede ser estimulado de varias maneras, desde aplicación de electricidad con electrodos hasta inyecciones de cloruro de potasio, que desencadenan la deposición de gametos en ambos sexos, debido a que provocan una contracción de los nervios alrededor de las gónadas y esto hace que se expulsen los gametos por los gonoporos (Cameron et. al, 1989).

II.3.2. El Óvulo del Erizo de Mar. El óvulo del erizo de mar es del tipo oligolecito, pequeño con poco vitelo nutritivo; si se compara con otros tipos de óvulos como aquellos en aves que deben tener una cantidad mucho mayor de vitelo ya que con esos nutrientes se suplirá durante todo el periodo de incubación largo (21 días) contrastando con el corto tiempo de incubación que requiere un cigoto de erizo de mar (53 horas). Mide aproximadamente 90 μm pero depende de la especie, ya que hay algunas que llegan a medir hasta 111 μm (Vacquier, 2011) además de ser relativamente transparente, haciendo muy sencilla la observación de la fecundación y el desarrollo (Ernst, 1994). El óvulo del erizo de mar está rodeado de una gruesa y fibrosa matriz extracelular, conocida como capa vitelina y se encuentra conectada a la membrana plasmática y sobre esa está una capa gelatinosa que puede llegar a medir hasta 40 μm de grosor (Kidd 1978; Chandler et al 1980,1981), dentro de las cuales el embrión se desarrolla hasta alcanzar el estadio de blástula, eclosiona de la membrana y al pasar por la gastrulación llega al estadio de larva acuática, donde llega a ser bilateralmente simétrica.

Justo debajo de la membrana plasmática se encuentra una capa compactada de gránulos con cerca de un 1 μm de diámetro, llamados: gránulos corticales. (Wolpert, et al 2011). Todo óvulo se encuentra en un estado de dormancia metabólica (ayudado por un nivel de pH en 6.8) hasta la fusión con el espermatozoide, cuando la cascada de reacciones comienza (Trimmer, et al 1986).

III. JUSTIFICACIÓN

El interés de implementar la técnica de aspiración por micropipetas es para la subsecuente investigación en el laboratorio de Biofísica de la Universidad de Sonora.

Los estudios realizados con membranas excluyen características importantes de las células (citoesqueleto, presión hidrostática, entre otras) y aquellos que se han realizado en células vivas muestran el comportamiento mecánico de una forma precisa, ya que se tienen en cuenta las variables internas de la célula.

El óvulo del erizo de mar es un modelo animal apropiado para estudiar las propiedades mecánicas de las células. Por una parte, es una especie abundante en aguas poco profundas. Por otra parte, la extracción de los gametos es relativamente sencilla. El óvulo del erizo es grande, su observación y manipulación es accesible, por lo cual permite estudiar propiedades mecánicas con relativa comodidad.

IV. HIPÓTESIS

Bajo las condiciones experimentales propuestas de micromanipulación y manejo de gametos de erizo de mar es posible medir sus propiedades elásticas.

V. OBJETIVOS

Establecer las condiciones experimentales de micromanipulación con pipetas y de utilización de células vivas.

V. 1. Objetivos Específicos

1. Fabricación de micropipetas con dimensiones óptimas para la manipulación de células vivas.
2. Establecer el montaje de presurización hidráulica para la micromanipulación con pipetas.
3. Describir la extracción de gametos para su manipulación con micropipetas.

VI. METODOLOGÍA

VI.1. Fabricación de Micropipeta

Las micropipetas fueron fabricadas a partir de capilares de borosilicato de 0.75mm de diámetro interno, de la compañía Narishige. El primer paso en el procedimiento consistió en calentar y estirar los capilares, mediante un estirador PC-10 de Narishige (Figura. 11). El resultado son capilares de vidrio más estrechos, tamaño ideal para la manipulación de los óvulos, este tamaño es del orden de 70 micras, considerando que los óvulos miden aproximadamente 115 micras de diámetro.



Figura 11. Estirador PC-10 de Narishige. Este aparato sirve para calentar y estirar los capilares de borosilicato, con lo cual se forman las micropipetas.

Una vez que se obtuvieron las micropipetas con el diámetro adecuado, se pasaron a la microforja MF-900 de Narishige (Figura 12) para conseguir que su punta fuera lo más regular posible y evitar maltratar o romper los óvulos al manipularlos. Esta parte del procedimiento es necesaria porque las micropipetas salidas del estirador están cortadas de manera irregular. En la figura 13 se muestra una de las pipetas obtenidas, en este caso de diámetro 63 micras.



Figura 12. Microforja MF-900 de Narishige. Este instrumento sirve para hacer regulares las puntas de las micropipetas.

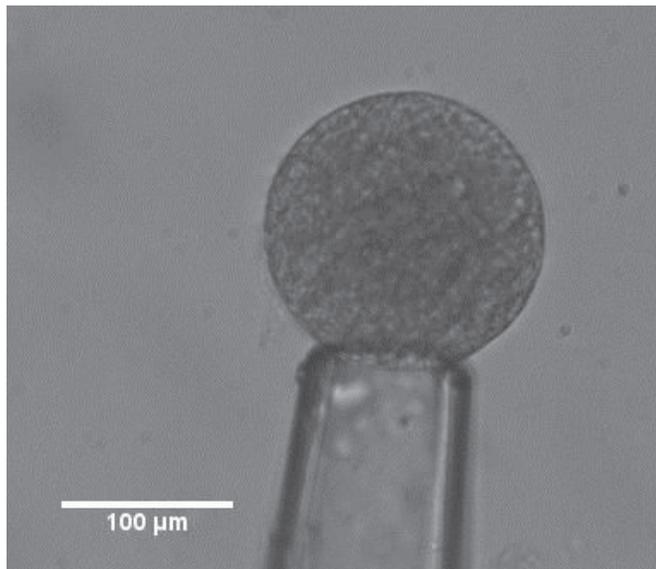


Figura 13. Micropipeta típica obtenida con el procedimiento descrito en el texto. El diámetro de esta pipeta es de 63 micras.

VI.2. Diseño del Experimento

En nuestro trabajo se utilizó como referencia el elastómetro celular, construido por Mitchinson y Swann en 1954. Ellos diseñaron un equipo que podía medir la elasticidad celular (Figura 14), basado en la presión hidrostática que se puede ejercer mediante un

reservorio de agua salada conectado mediante una manguera de caucho a una micropipeta de vidrio. Bajando el nivel del agua en el reservorio, respecto al nivel de la micropipeta, este montaje puede ejercer una presión de succión, apropiada para manipular los óvulos de erizo de mar (Figura.15).

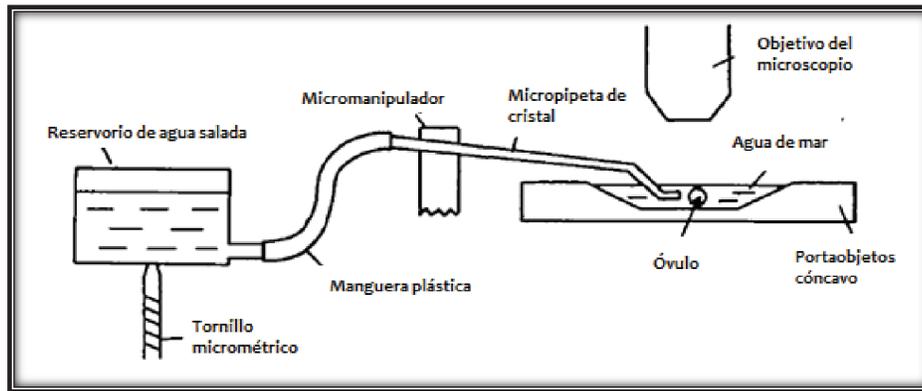


Figura. 14. Diseño del elastómetro celular. Figura tomada de Mitchinson y Swann, 1965.

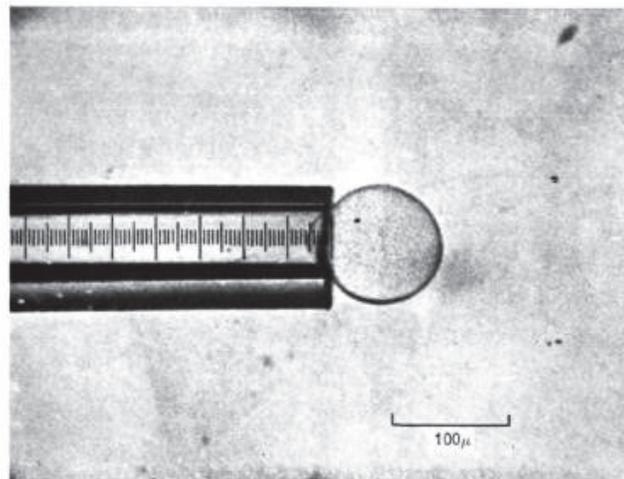


Figura. 15. El elastómetro celular atrapando un óvulo de erizo de mar. Figura tomada de Mitchinson y Swann, 1965.

En el primer diseño que se realizó en este trabajo se contempló que hubiera dos reservorios de agua (figura 16), de los cuales uno serviría como nivel para señalar una altura de referencia. Al inicio del experimento, los dos reservorios se conectarían a la micropipeta y se buscaría que la posición de esta última estuviera a la misma altura que el nivel del agua en los reservorios (figura 16). Esto aseguraría que la presión de succión en la micropipeta fuera nula, lo cual se sabría porque un óvulo capturado no sería succionado ni expulsado en esas condiciones. Una vez conseguida esta situación de presión nula, uno

de los reservorios se desconectaría del circuito mediante una llave de media vuelta, de tal forma que el nivel del agua en este reservorio se mantuviera constante durante el resto del experimento. Así, al jalar agua mediante una jeringa (figura 8), se conseguiría una presión de succión en la micropipeta, la cual se determinaría por el descenso en el nivel del agua en el otro reservorio.

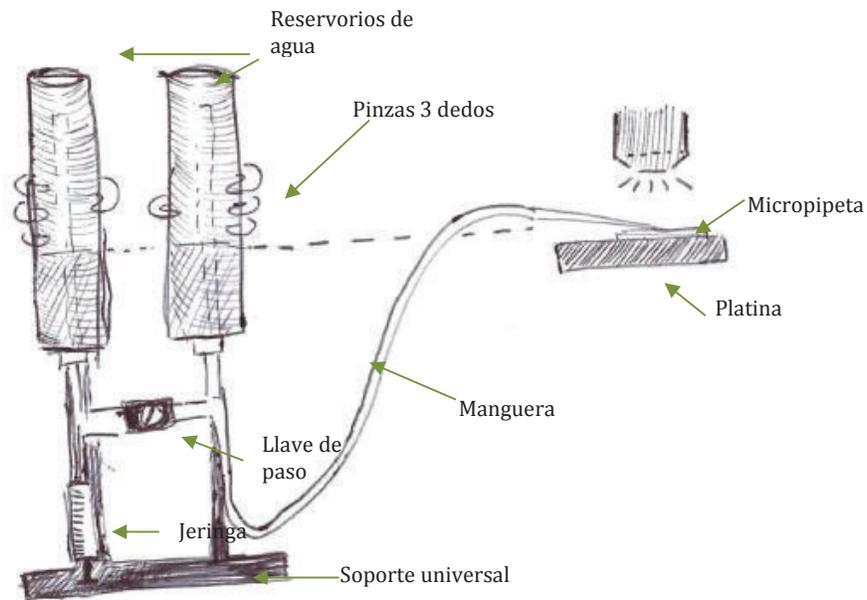
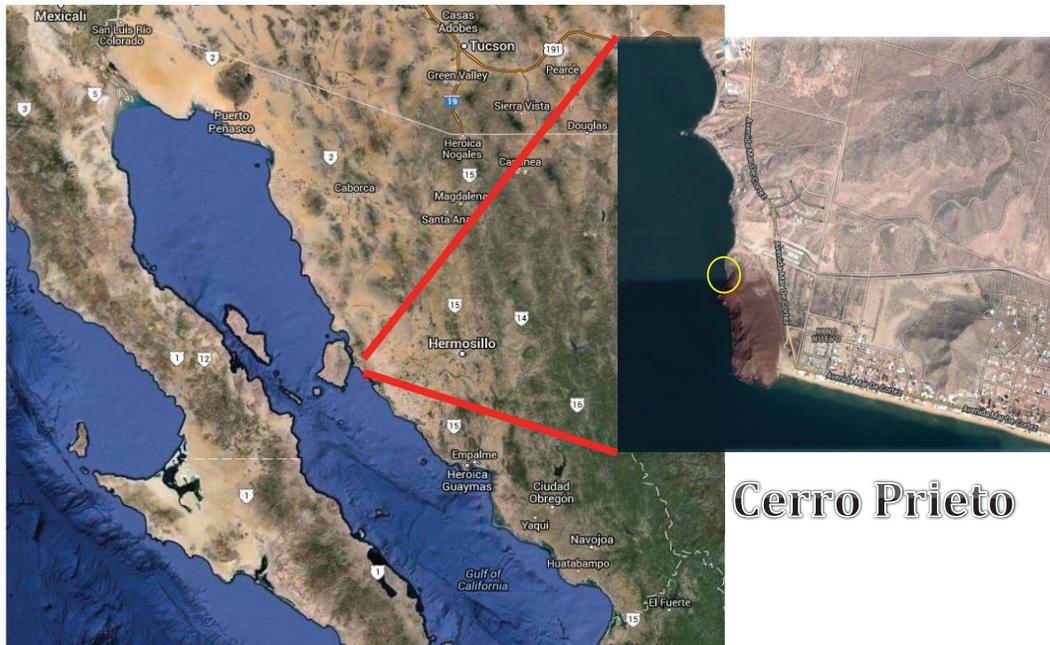


Figura 16. Primer diseño que incluía dos recipientes de agua, llave de paso, jeringa y manguera plástica. El reservorio de la izquierda serviría para marcar el nivel inicial del agua (línea punteada), respecto al cual se mediría el nivel de agua en el otro reservorio, para calcular la presión de succión.

VI.3. Extracción de Gametos para su Manipulación con Micropipetas.

VI.3.1 Recolección de especímenes. Se extrajeron de Bahía Estela, Hermosillo, Sonora, México con las coordenadas (28° 51' 58.74" N y 112° 2' 1.77" O) (Figura.17) hembras de *Echinometra vanbrunti*, que se encontraban en estadio reproductivo, durante el mes de octubre del 2013.



Cerro Prieto

Figura 17. Locación del lugar de muestreo encerrado en el círculo amarillo, en Cerro Prieto, Sonora, México.

VI.3.2. Obtención de gametos. Pasado el tiempo de aclimatación se les indujo el desove de la siguiente manera: Se tomó el erizo y en la zona oral (Figura. 18) se inyectaron con una jeringa 0.1 ml de KCl 0.5 M por cada 10 mL de volumen, esto se calculó observando el volumen de agua de mar desplazada por el erizo de mar en un contenedor especial con agua de mar. Se agitó suavemente al erizo para distribuir de mejor manera el KCl. La función del KCl es provocar una contracción en los nervios que se encuentran alrededor de las gónadas de los erizos, culminando en el desove.



Figura. 18. La inyección de KCl 0.5 M en la región oral del erizo de mar.

Las hembras se colocaron en vasos de precipitado con los gonoporos hacia abajo, para que los óvulos cayeran en el agua de mar preparada

Para la manipulación de los gametos se realizó un baño previo con agua de mar ácida para retirar la gruesa capa hialina y fuera más sencilla su manipulación con las micropipetas. El agua de mar ácida consiste en 100 ml de agua de mar preparada y 3 ml de HCl 10M, este tratamiento duró dos minutos, se agitó suavemente y pasado el tiempo, con una pipeta pasteur los óvulos se cambiaron a agua de mar normal, se esperó un minuto antes de pasar a la observación en microscopio en portaobjetos cóncavos, y de las pruebas de flexibilidad.

VI. 4. Medición de las Propiedades Elásticas

En nuestro experimento se determinó el módulo elástico de óvulos de erizo de mar. Para ello se realizaron 17 series de mediciones, cada una con un óvulo diferente, tomados de 6 hembras distintas. Los óvulos y las micropipetas se observaron en un microscopio óptico invertido (Leica DMIL). Para cada presión de succión se tomó una fotografía del óvulo succionado (figura 19), a partir de la cual se midieron las dimensiones utilizando el programa de análisis de imagen ImageJ.

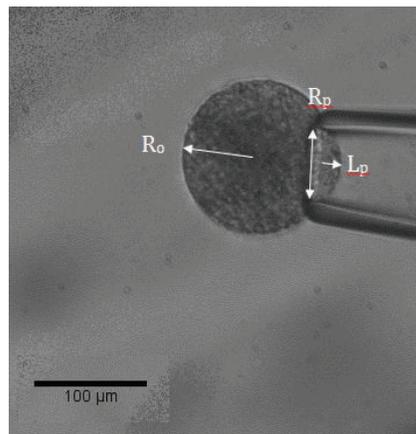


Figura 19. Realizaremos las mediciones de deformación L_p en función de la presión de succión aplicada ΔP para un número considerable de óvulos ($N = 17$). La idea es obtener el valor promedio del módulo elástico con su respectiva desviación estándar.

VII. RESULTADOS

VII.1. Fabricación de Micropipetas

Se utilizó el estirador PC-10 de Narishige (Figura. 20) para que las micropipetas tuvieran el tamaño ideal para la manipulación de los óvulos; el diámetro de las pipetas fue de 70 μm . Las pipetas se obtuvieron con el procedimiento de dos pasos, con el primer cabezal en 70 y el segundo en 62, y dos pesas que en total sumaban 106 gramos.

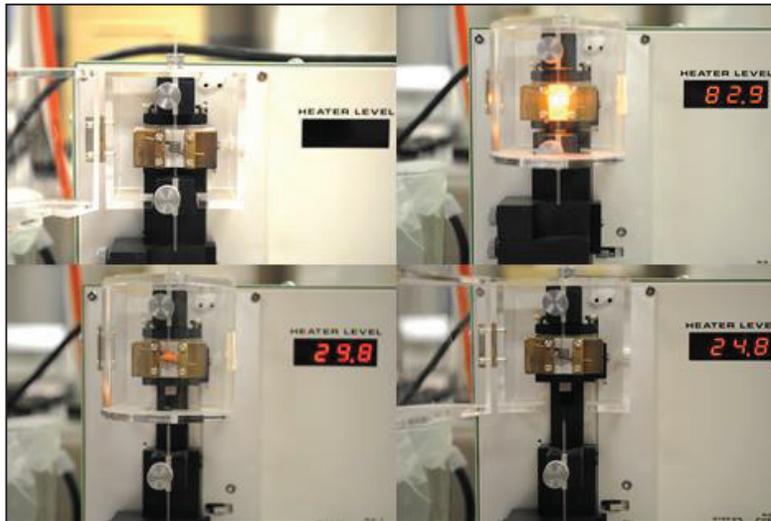


Figura. 20. El estirado PC-10 de Narishige, en el proceso de creación de dos micropipetas a partir de un capilar de borosilicato.

Después se utilizó la microforja MF-900 de Narishige (figura 21) para su pulido y el tamaño exacto, donde un filamento de platino se calienta para tener el acabado que permite la manipulación segura de los óvulos.

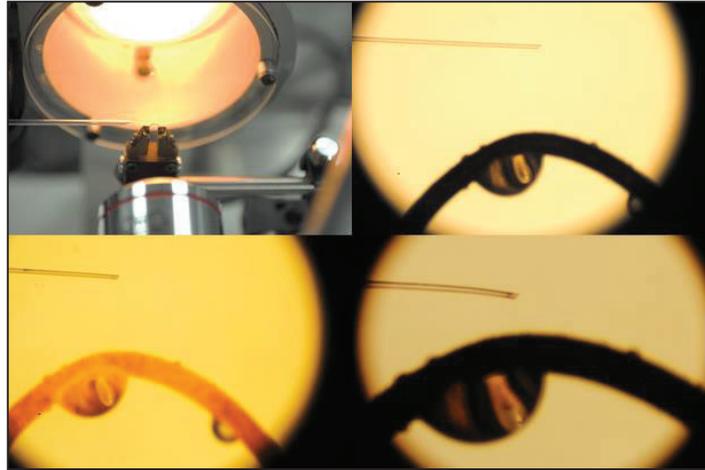


Figura. 21. Proceso de pulido en la microforja MF-900 de Narishige de una micropipeta.

VII.2. Montaje de Sistema de Aspiración por Micropipetas

Uno de los objetivos principales de este trabajo era construir un montaje experimental que permita la micromanipulación de óvulos de erizo de mar para estudiar por succión sus propiedades elásticas. Dicho montaje se consiguió basándonos en un primer tiempo en el instrumento de Mitchinson y Swann. Sin embargo, como veremos, fue necesario modificar el montaje y adecuarlo a las condiciones del laboratorio.

Como hemos dicho, el primer diseño de nuestro instrumento contemplaba dos reservorios de acrílico, que estaban sujetos por pinzas de tres dedos a un soporte universal. Los reservorios estaban conectados a mangueras de plástico, uno conectado a una jeringa de 5 ml y el otro al soporte de la micropipeta. El sistema estaba interconectado por una llave de paso (figura 22).

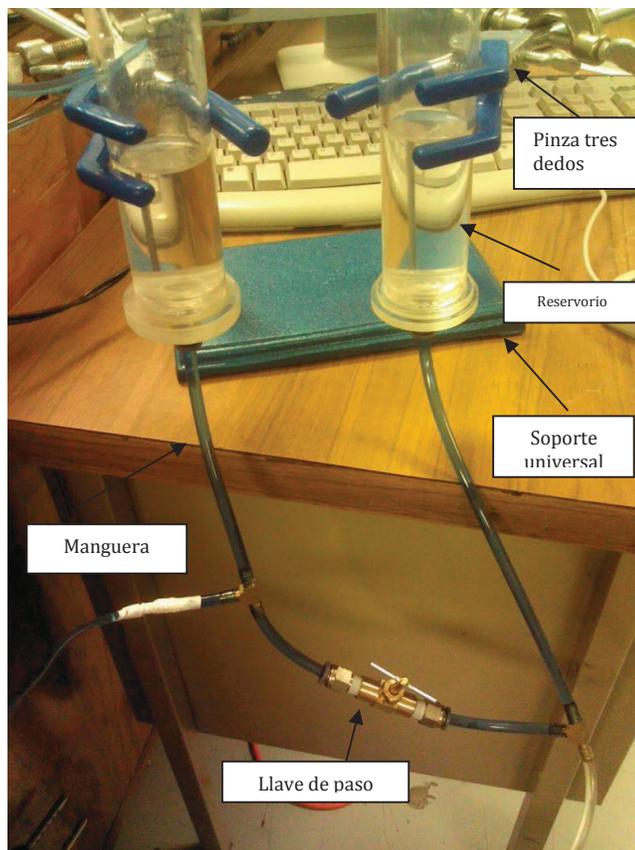


Figura 22. Primer diseño del montaje experimental ya montado con todos sus componentes.

El sistema hidráulico se montó sobre un soporte universal con dos varillas, a cada una de ellas estaba sujeto un reservorio con una pinza de tres dedos. Se utilizaron mangueras de poliuretano para conectar todo el sistema. Sin embargo, cuando se realizaron las primeras mediciones con este primer diseño ya montado, nos dimos cuenta de que era muy inestable. Al intentar mover el reservorio para provocar una diferencia de presiones todo el sistema se movía, provocando en ocasiones que la pipeta se saliera de su sujetador, y se tenía que comenzar todo de nuevo. Debido a la altura en la que estaban puestos los reservorios en el soporte universal, oscilaba con mucha facilidad al rozar la mesa donde se encontraba. Por estas razones, se optó por retirar uno de los reservorios y colocar el restante lo más cerca posible a la base del soporte (figura 24). Aun así, la altura de referencia seguía siendo difícil de establecer al no disponer de un instrumento que la midiera con precisión.

Para solventar este problema, se modificó el montaje para incluir un micro-manipulador modelo NMN-21 de Narishige (figura 23). Con este aditamento, pudimos mover de manera controlada uno de los reservorios. Este micro-manipulador tiene dos

perillas: una para movimiento grueso, donde cada rotación sube o baja 4 mm el sistema; la otra perilla controla el movimiento fino, pues sube o baja el sistema en 250 μ m por vuelta. En este nuevo diseño, se conservó la llave de paso para controlar el flujo y la jeringa para, sólo que ahora era utilizada para limpiar la pipeta por dentro cuando quedaban partículas atrapadas (figura 25).



Figura 23. Micromanipulador NMN-21 de Narishige.

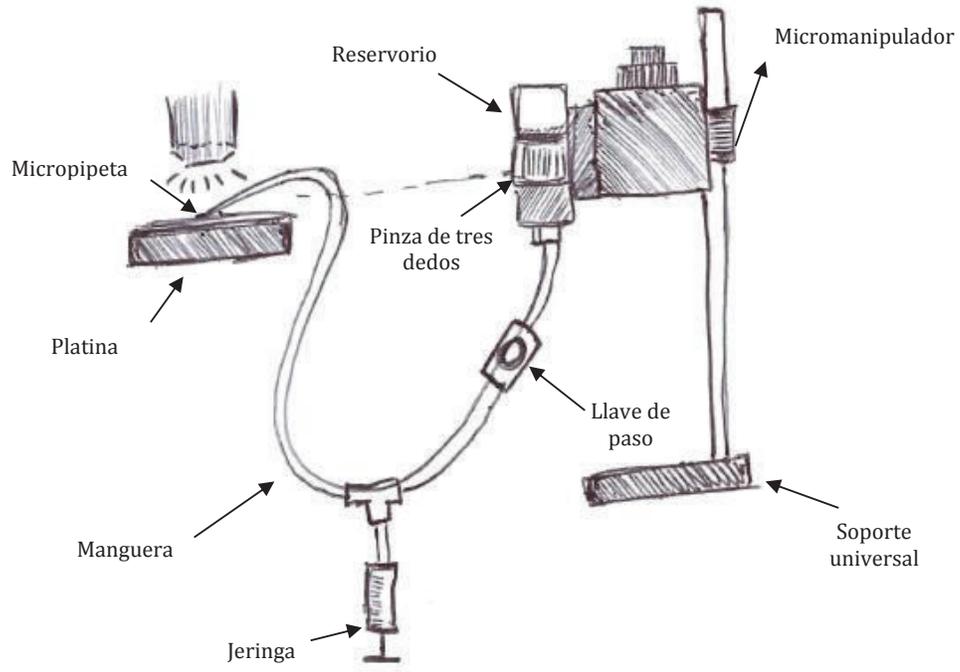


Figura 24. Segundo diseño experimental, el cual contempla un solo reservorio, un micromanipulador, una llave de paso, una jeringa, y una manguera de plástico conectada la jeringa.

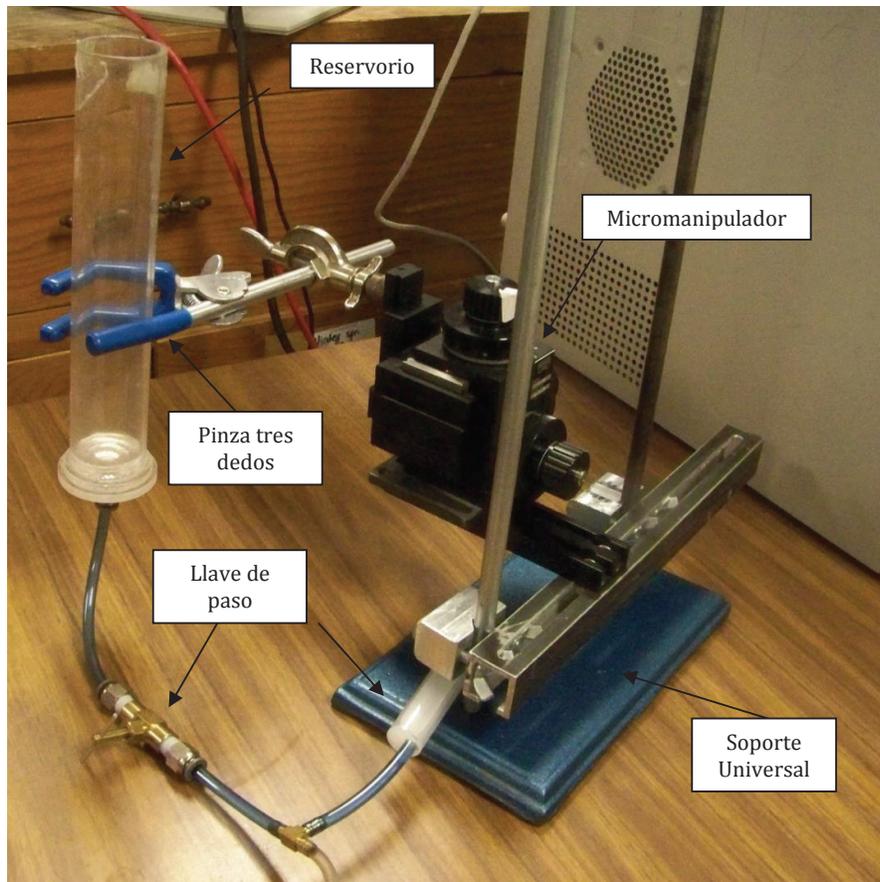


Figura 25. Segundo diseño montado con todas las componentes ya mencionadas.

Al tratar de realizar el experimento con este nuevo montaje, nos dimos cuenta que las presiones ejercidas por la jeringa eran insuficientes para provocar una deformación en el óvulo. Después de varias pruebas, se encontró que las deformaciones se producían con diferencias de altura de centímetros, no de micras como se pensaba. Por esta razón, se colocó el dispositivo sobre una plataforma de elevación manual, la cual permite un desplazamiento de hasta 30 cm.

De esta forma, el sistema hidráulico quedó colocado sobre la plataforma de elevación, y conectado por medio de las mangueras de poliuretano. El sujetador de la micropipeta descansaba sobre el micro-manipulador 202-ND de Narishige, que permite los movimientos finos para sujetar los óvulos y manipular sus movimientos dentro de la muestra.

El micromanipulador 202-ND está montado sobre un microscopio óptico de campo invertido Leica DMIL, para la observación de los experimentos a 20X. Y toda la evidencia es tomada por una cámara Pulnix TM6740GE conectada vía Ethernet a una computadora de escritorio; las fotografías fueron capturadas con el programa Coyote launch (figura 26).

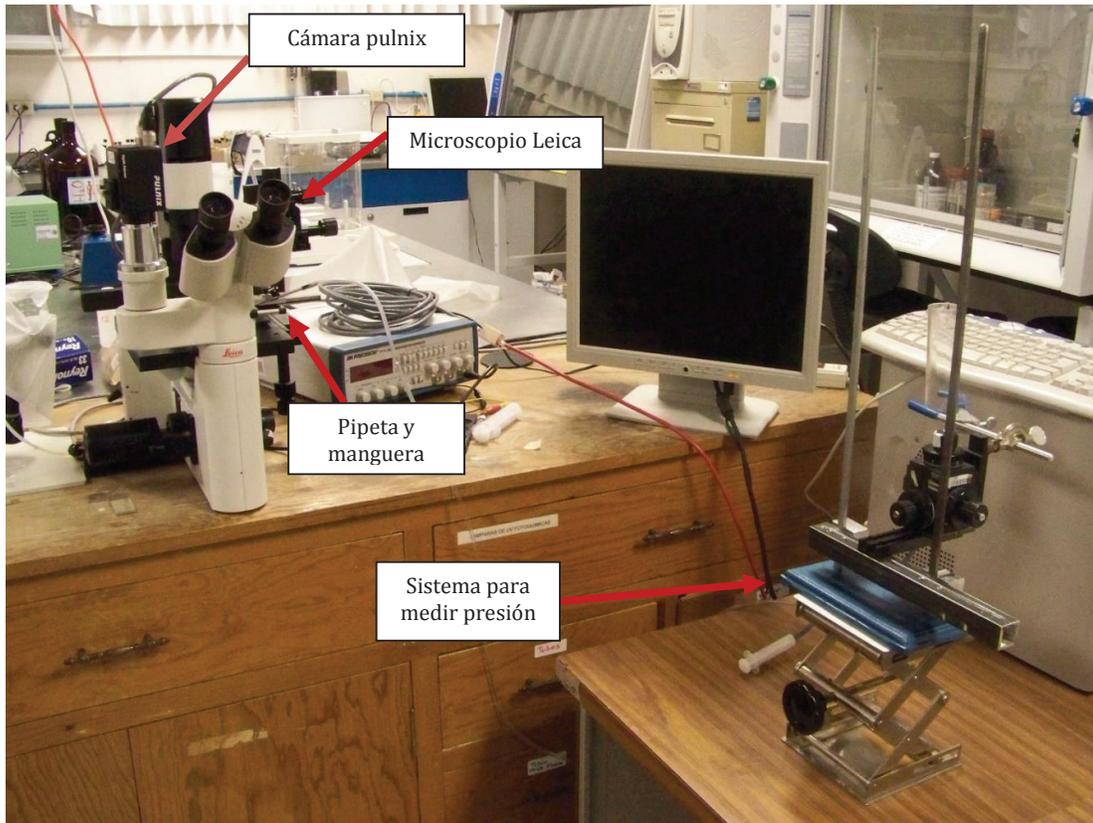


Figura 26. Sistema de micropipetas montado en el microscopio.

VII.3. Obtención de Muestras

La muestra seleccionada fue Erizo de mar procedente de Bahía Estela, Sonora, se recolectaron 26 erizos de mar; de las cuales 6 resultaron hembras (figura 27) cuando se les aplicó la inyección de la solución de KCl de concentración 0.5 M.

Los especímenes fueron transportados al Laboratorio de Biofísica de la unidad centro de la Universidad de Sonora y se les dio un tiempo de aclimatación de tres días. Se les colocó en dos tanques de 37 litros, cada uno con filtros de cascada HF-2001 con capacidad de 340 L/hora, con agua de mar preparada con sales TopFin™ y agua purificada.



Figura 27. Hembras de *E. vanbrunti* después de la inyección de KCl 0.5 M.

VII.3.1. Obtención de gametos. De las 6 hembras de erizo de mar, se obtuvieron los gametos al inyectarles la solución de KCl 0.5M; estos se almacenaron en recipientes de plástico para ser almacenados a 4°C para su posterior análisis (figura 28).



Figura 28. Óvulos de erizo de mar almacenados.

VII.4. Medición de las propiedades elásticas

Se realizaron 17 series de mediciones. Cada serie consiste de fotos del mismo óvulo sometido a diferentes presiones de succión, tal como se muestra en la figura 29. En término medio, cada serie experimental constó de 6 de fotos a presiones diferentes.

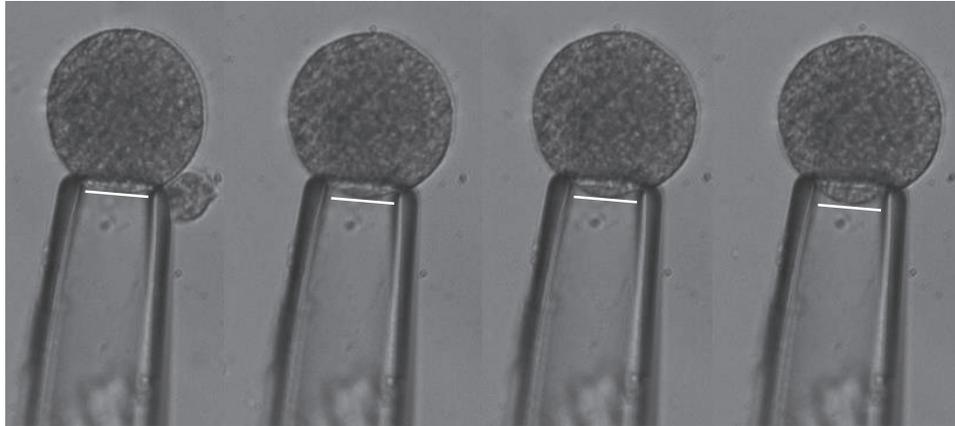


Figura 29. Una serie experimental. La figura muestra cuatro imágenes del mismo óvulo sometido a diferentes presiones de succión. Es evidente que mientras mayor es la presión de succión, mayor es la distancia de penetración del óvulo en la pipeta (señalada con la línea).

A partir de las fotografías como las de la figura 29, se midieron los parámetros L_p (longitud de succión en el interior de la micropipeta) y R_p (diámetro de la micropipeta). La deformación se determinó a partir de las imágenes proporcionadas por la cámara Pulnix (figura 28), utilizando el programa Image J, para tener los resultados en micras. Por otra parte, la presión de succión se midió a partir del desplazamiento vertical del dispositivo (variación en altura o Δh) sobre la plataforma de elevación (figura 30); el desplazamiento fue medido en centímetros, para calcular la presión con ayuda de la ecuación 1.

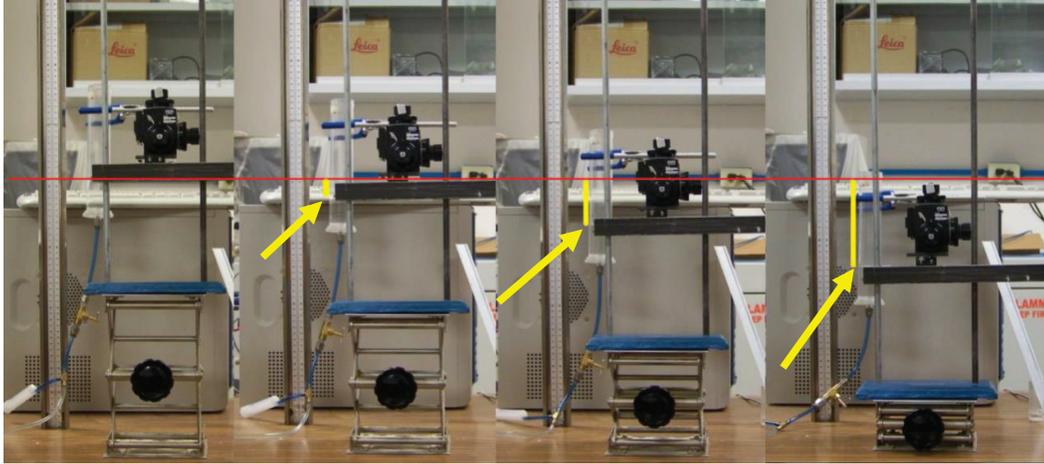


Figura 30. El desplazamiento del dispositivo, ayudado de la plataforma de elevación manual. Con la línea roja está marcado el nivel de referencia que se mantenía con la pipeta en el microscopio, mientras que la línea amarilla muestra el desplazamiento vertical.

VII.5. Resultados de las mediciones

En esta sección presentamos los experimentos de succión de óvulos de erizo de mar con los cuales se determinó su módulo elástico. En términos generales comprobamos que la deformación L_p es proporcional, dentro de los márgenes de error experimental, a la presión de succión ΔP , tal como se esperaba de la ecuación 2. De las gráficas de ΔP vs L_p/R_p se obtuvieron los módulos elásticos. Antes de presentar esos valores, mostraremos algunas gráficas para de las diferentes series de datos. Por ejemplo, en las figuras 31 y 32 se presentan dos series (cada gráfica es para un óvulo), obtenidas el primer día después de haber obtenido los gametos. Vemos de las gráficas que los datos experimentales siguen relativamente bien una relación lineal. De hecho, las rectas de ajuste se muestran en cada serie. De la pendiente de esas rectas se obtuvieron los módulos elásticos, cuyos valores se listan al final de esta sección.

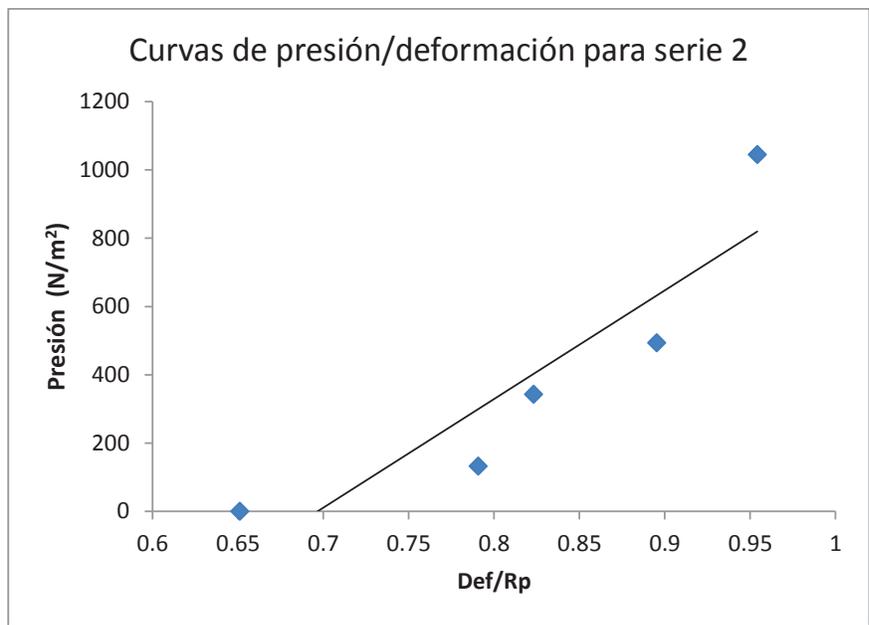


Figura 31. Gráfica de la serie 2, con las 5 mediciones para el óvulo respectivo. Se aprecia un comportamiento relativamente lineal de los puntos experimentales, tal como se esperaba. La recta se obtuvo ajustando los datos.

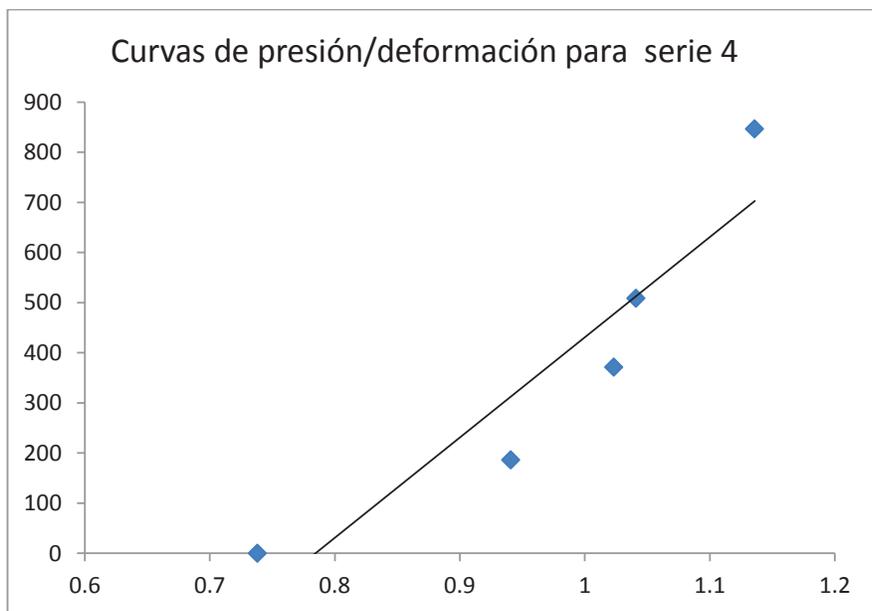


Figura 32. Gráfica de la serie 4, con las 5 mediciones para otro óvulo. De nueva cuenta, se aprecia un comportamiento relativamente lineal.

En la figura 33, se grafican todos los puntos experimentales obtenidos el primer día después de haber obtenido los gametos. Se aprecia un comportamiento relativamente lineal. Sin embargo, los datos presentan una dispersión que se refleja en diferencias en el

valor del módulo elástico. En la sección de discusiones damos algunas posibles explicaciones a esta dispersión de los datos.

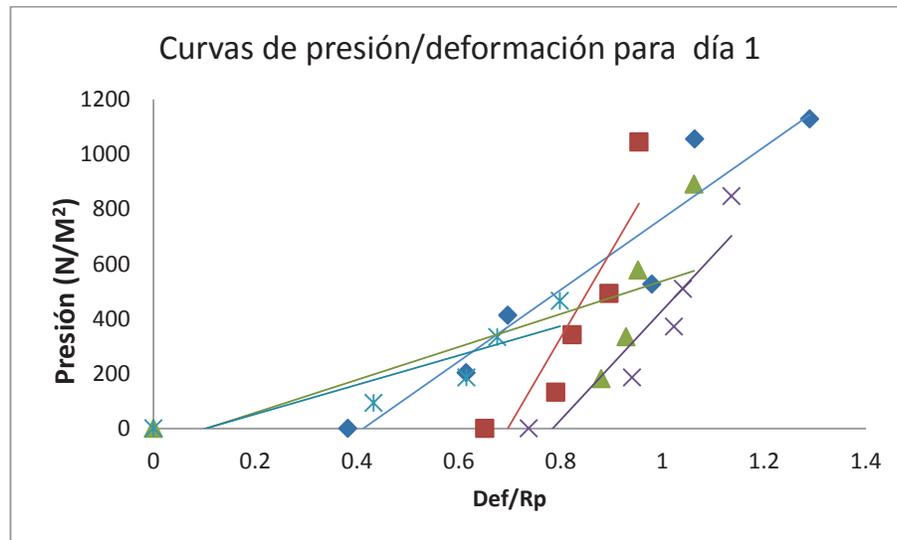


Figura 33. Gráfica con datos de 5 series que fueron tomadas el primer día después de obtener los gametos. Los puntos representan experimentos con 5 diferentes óvulos.

Un resultado importante de este trabajo consiste en la constatación de que los valores del módulo elástico de los óvulos cambian según el tiempo de medición. Es decir, nos dimos cuenta que los óvulos se tornan más rígidos conforme avanza el tiempo después de la obtención de los gametos. Esto se manifiesta como un aumento en las pendientes de las curvas ΔP vs L_p/R_p . Para ilustrar esto, mostraremos resultados de experimentos obtenidos con óvulos diferentes los días 2 y 30 después de la obtención de los gametos.

Por ejemplo, en las figuras 34 y 35 se muestran gráficas con los resultados obtenidos para dos óvulos, en experimentos realizados el segundo día después de la obtención de los gametos. De nueva cuenta vemos que los datos se ajustan relativamente bien a un comportamiento lineal, aunque en este caso las pendientes son más pronunciadas, y por lo tanto los óvulos más rígidos.

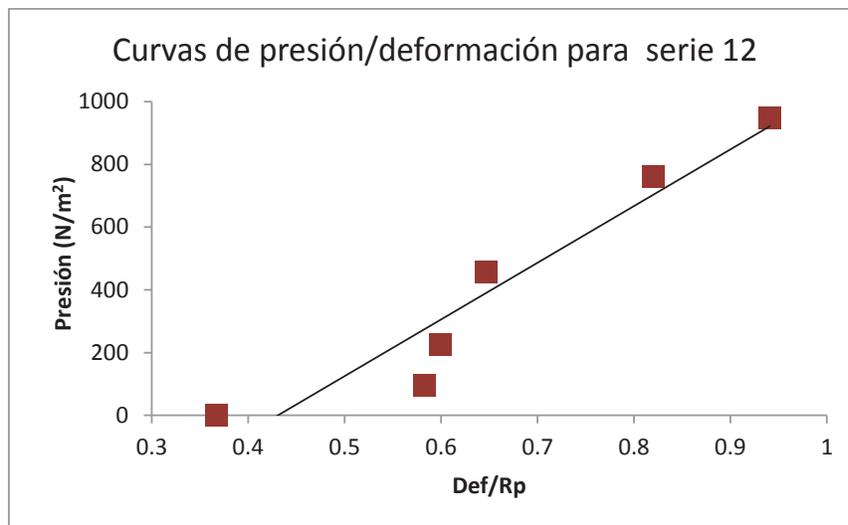


Figura 34. Gráfica de la serie 12, la cual contiene los datos de 6 mediciones hechas a un óvulo el segundo día después de la obtención de los gametos.

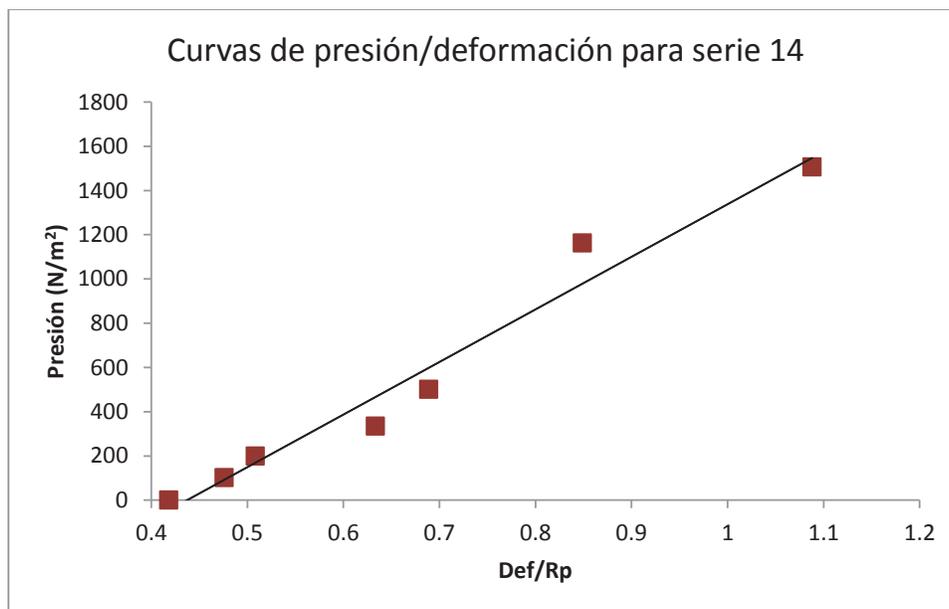


Figura 35. Gráfica con 7 datos de la serie 14 tomados en el día dos después de la obtención de los gametos.

En la figura 36 se muestran todos los datos obtenidos con los óvulos estudiados el día 2 después de la obtención de los gametos. De nueva cuenta, al igual que en el día 1, vemos una gran dispersión de los datos. Es de señalare que en términos generales siguen una tendencia lineal, con una pendiente más pronunciada que el día 1, es decir, los óvulos son más rígidos.

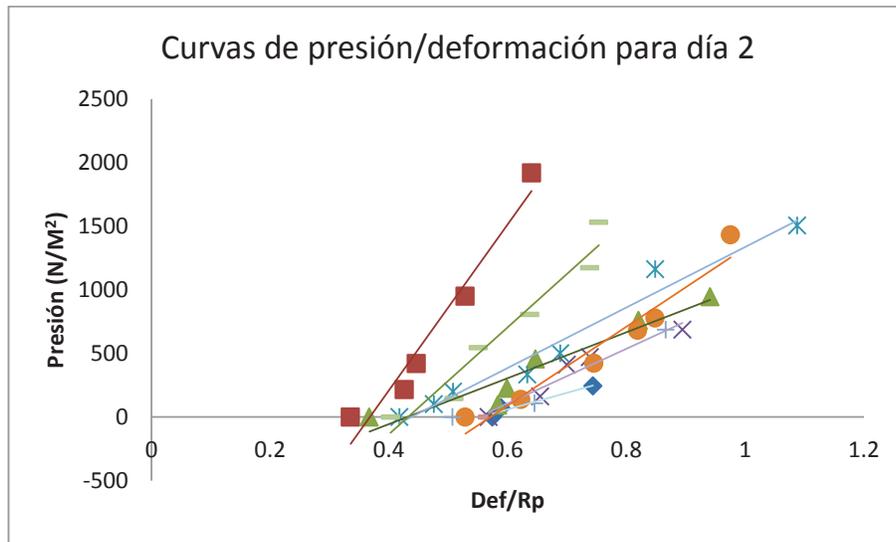


Figura 36. Gráfica que contiene todos los datos de siete series (siete óvulos distintos), tomadas al segundo día.

En las figuras 37, 38 y 39 mostramos resultados similares obtenidos con óvulos el día 30 después de la obtención de los gametos. Las tendencias son las mismas que en los días 1 y 2, es decir, las gráficas son relativamente lineales, y existe una dispersión de los datos cuando se consideran en su conjunto (figura 39). Sin embargo, las pendientes individuales (figuras 37 y 38) son notoriamente más pronunciadas que en los días previos, lo cual muestra que los óvulos se hace aún más rígidos.

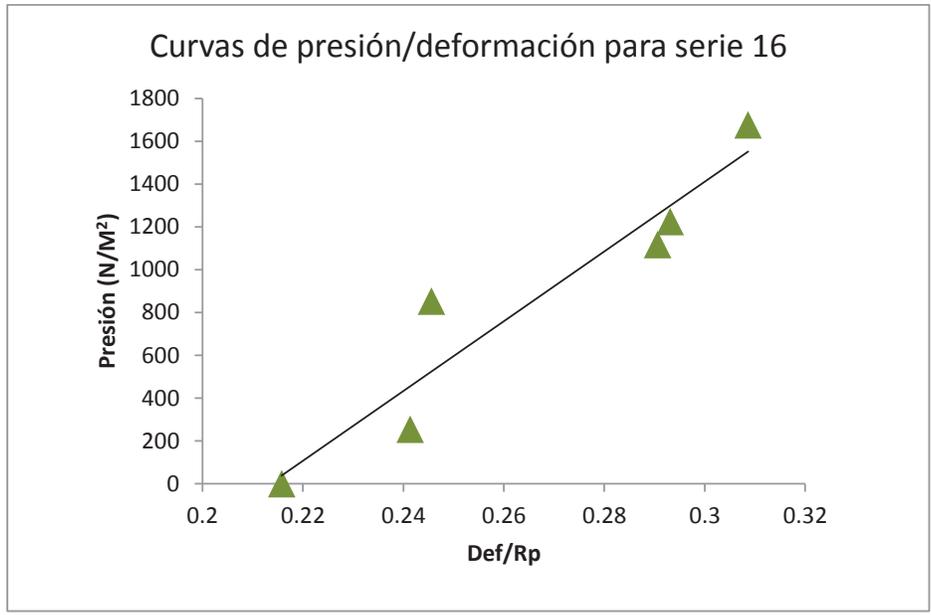


Figura 37. Gráfica de la serie 16, correspondiente al día 30 con sus siete mediciones.

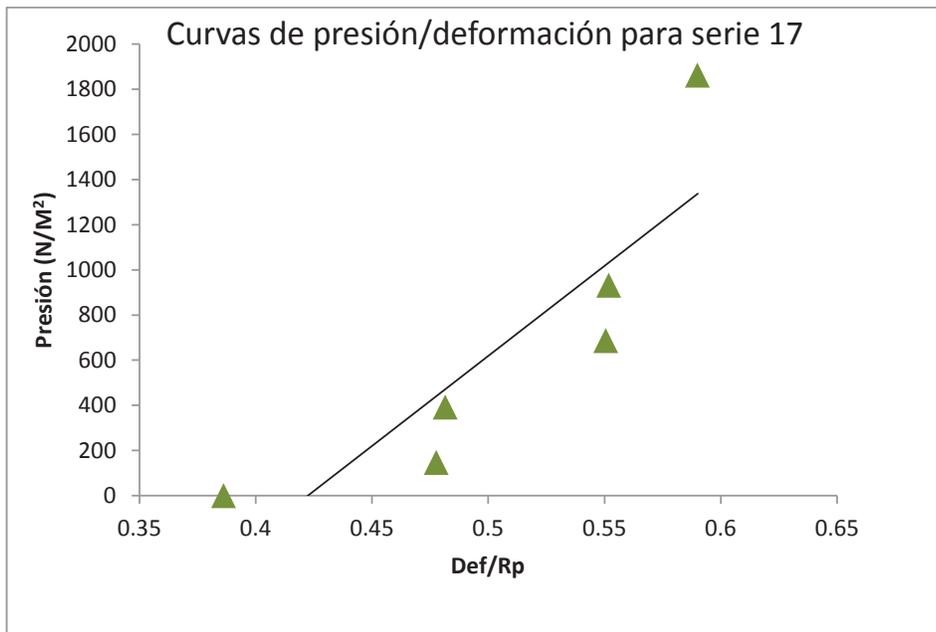


Figura 38. Gráfica de la serie 17 con sus 7 mediciones, correspondientes al día 30.

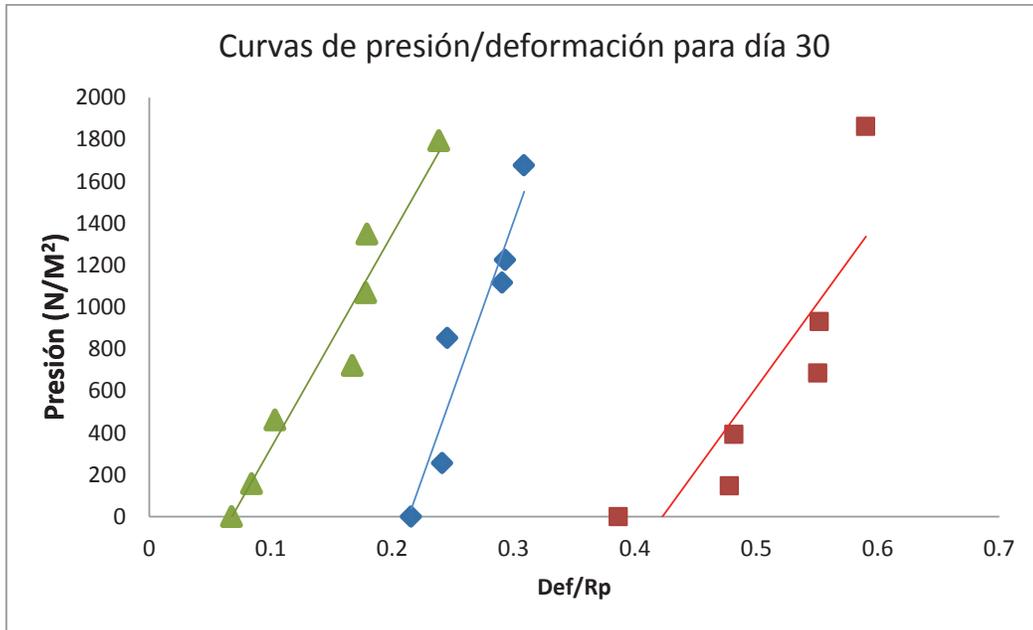


Figura 39. Gráfica con todos los datos obtenidos el día 30.

En las figuras 40 y 41 graficamos simultáneamente todos los datos obtenidos, en los días 1, 2 y 30. En la figura 41 mostramos ajustes lineales realizados por separado para cada día. En esa figura se aprecia claramente cómo la pendiente del ajuste se va haciendo más pronunciada conforme avanza el tiempo, lo cual significa que en promedio los óvulos se hacen más rígidos.

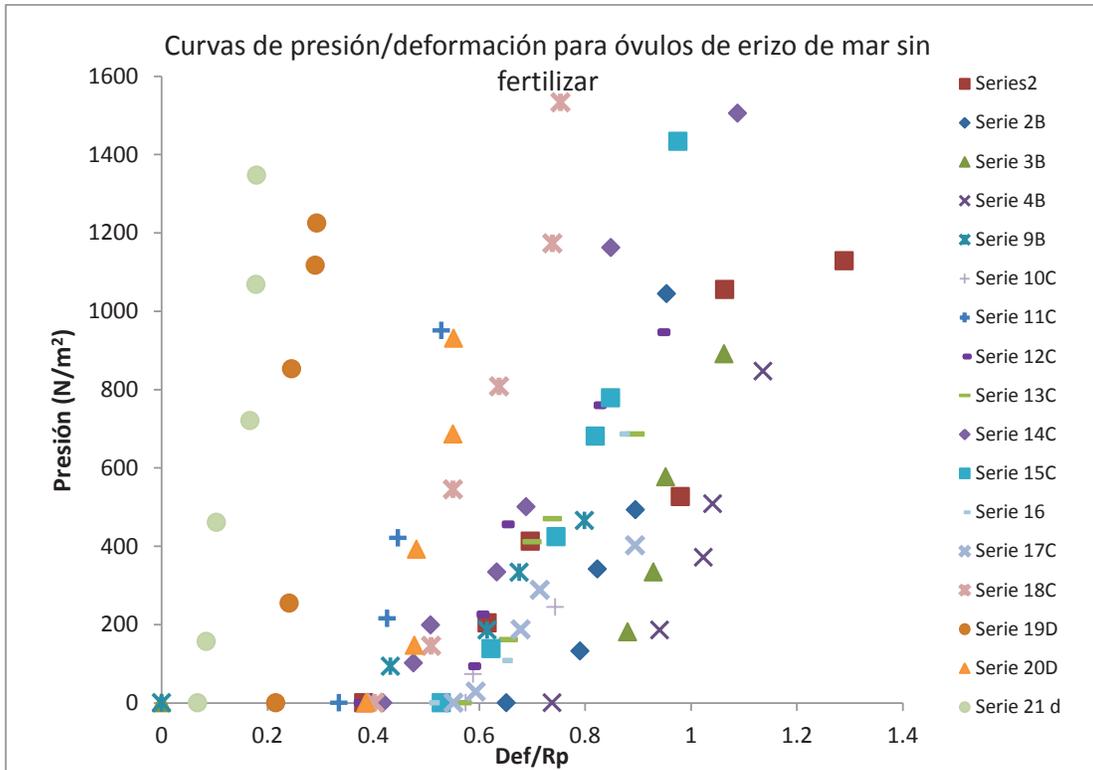


Figura 40. Gráfica con los datos obtenidos para todos los óvulos estudiados.

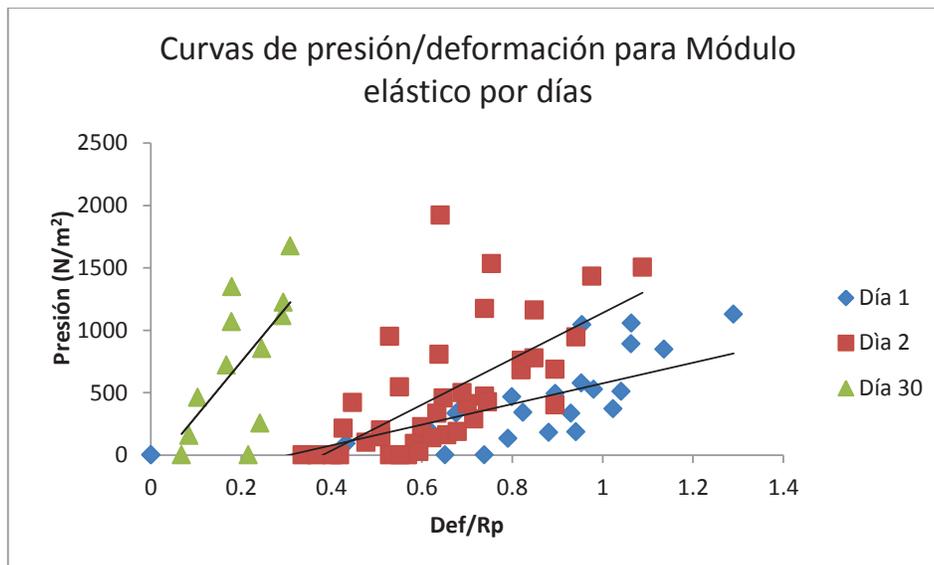


Figura 41. Gráfica con ajustes lineales a los tres grupos de datos experimentales. Cada grupo representa el día (después de la obtención de los gametos) en el que se realizó el experimento: 1, 2 o 30. Nótese que las pendientes se hacen más pronunciadas conforme avanza el tiempo.

Con los datos experimentales anteriormente mostrados, se hizo el cálculo para obtener el módulo elástico de cada óvulo analizado, utilizando la teoría sintetizada en la ecuación 2. En la tabla I se muestran los valores obtenidos para cada óvulo, con su respectivo error porcentual. En la tabla se aprecia que el error para el valor obtenido con cada óvulo es relativamente pequeño, del orden de 20 %.

Tabla I. Los valores para el módulo de elástico por serie, con sus porcentajes de error.

Valores de Módulo Elástico por serie		
	E (N/m²)	Porcentaje de error
Serie 1B	296.03 ± 47.23	15.96
Serie 2B	723.33 ± 199.66	27.60
Serie 3B	136.33 ± 70.32	51.58
Serie 4B	454.68 ± 104.16	22.91
Serie 9B	121.91 ± 34.66	28.44
Serie 10C	296.94 ± 66.37	22.35
Serie 11C	1480.36 ± 189.26	12.78
Serie 12C	410.39 ± 72.77	17.73
Serie 13C	488.15 ± 78.41	16.06
Serie 14C	540.44 ± 44.88	8.30
Serie 15C	705.28 ± 87.70	12.44
Serie 16C	449.04 ± 112.27	25.00
Serie 17C	280.11 ± 45.25	16.15
Serie 18C	954.25 ± 117.06	12.27
Serie 19D	3703.53 ± 605.22	16.34
Serie 20D	1813.68 ± 525.53	28.98
Serie 21D	2322.07 ± 256.51	11.05

VIII. DISCUSIONES

VIII.1. Montaje del Sistema de Micropipetas para la Medición del Módulo Elástico

Tomando de referencia el trabajo de Mitchinson y Swann de 1954, se diseñó y construyó un equipo que para medir las propiedades elásticas de las células aisladas de la forma más precisa posible, con las herramientas que se tenían al alcance. Nuestro instrumento permitió caracterizar la respuesta elástica de óvulos de erizo de mar sometidos a presiones de succión. A partir de los datos presión-deformación, se pudo obtener una estimación del módulo elástico de tales células. Aunque los valores obtenidos son relativamente cercanos a otros reportados en la literatura, nuestros resultados presentan una desviación estándar importante. En esta etapa del estudio no se puede predecir con exactitud cuál es el origen de esta dispersión en los datos: por lo cual una posible explicación de la alta dispersión obtenida es la probabilidad de que el circuito hidráulico de nuestro montaje, sufriera pequeñas fallas de hermeticidad en el sellado, difíciles de detectar a simple vista, con esto se ocasionaran entradas imperceptibles de aire al sistema, estas entradas de aire modificarían las presiones aplicadas. Sin embargo, los valores obtenidos para el módulo elástico son aceptables; de hecho, se obtuvieron valores que señalan que los óvulos de erizo de mar se comportan como un sólido elástico (Hochmuth, 2000).

Una de las posibles soluciones para mejorar el montaje experimental en un futuro, sería poder controlar de una manera más precisa el desplazamiento de los reservorios, para obtener un mayor control sobre el movimiento del mismo y disminuir el error experimental. Existen en el mercado plataformas de desplazamiento electrónicas controladas por computadora o sistemas de bombas de precisión que comunican presiones definidas; ambos aditamentos serían útiles para mejorar nuestro montaje.

VIII.2. El Uso de Óvulos de Erizo de Mar para Cálculo de Módulo Elástico

Para el estudio en óvulos sin fertilizar los resultados arrojan un promedio de E de 1204.86 N/m², aumentando en función del tiempo transcurrido. Estos resultados corroboran que los valores medidos del módulo elástico tienen el mismo orden de magnitud que el reportado por Mitchinson et al, 1954, donde ellos realizaron estudios en 5 especies distintas de erizos de mar y obtuvieron en promedio un valor de E =1070 ±174 N/m².

Un efecto interesante que observamos es que el módulo elástico de los óvulos aumenta con el tiempo (figura 41), en el análisis se puede observar claramente el aumento de la pendiente con respecto al tiempo, lo que nos habla de una rigidez creciente. Este resultado da lugar a posibles cuestiones por investigar en la continuación de este trabajo. Se cree que los factores que influyen este efecto pueden ser internos como serían: rigidez en la membrana, destrucción de estructuras internas, inicios de apoptosis, etc, o factores externos como el medio ambiente que lo rodea. Estas características observables pueden servir de herramienta fundamental y útil en estudios de embriología con óvulos de erizo de mar; se recomienda que los gametos sean usados antes de pasado un mes desde su obtención, debido a que después de ese tiempo, la fecundación es prácticamente imposible (Vaquier, 2011). Según nuestros resultados, esta pérdida de viabilidad puede deberse a que, pasado ese tiempo, la rigidez de la membrana es tal, que ningún espermatozoide puede atravesarla con el mecanismo habitual.

Por otra parte, una de las posibles explicaciones a la dispersión de los datos experimentales, es atribuida a la inhomogeneidad interna del óvulo. Esta célula tiene estructuras como granos corticales (de tamaño aproximado 1µm), partículas de proteínas ribonucleicas (de tamaño 16 µm) y otras macromoléculas que interactúan entre ellas, y son capaces de crear capas, vesículas y otros sistemas condensados, estas características pueden no representar cambios fuertes en las propiedades físicas (división celular, fecundación) de la célula, pero es posible que en las mediciones individuales, resultaran relevantes (Gross, et al, 1965); debido a que el módulo elástico de una célula internamente inhomogénea puede depender del punto donde se le succione, como está ilustrado en la figura 42. Debido a su estructura interna, puede haber puntos en su superficie que aparezcan más rígidos que otros. Así, diferentes óvulos succionados en partes diferentes

aparecerán con elasticidades diferentes. Esta es una hipótesis que puede ser estudiada en un futuro.

Por otra parte, existe la posibilidad de que el cambio de elasticidad de la membrana con el tiempo se deba a la desnaturalización de las proteínas de la misma, ya que aunque fueron guardados a una temperatura constante (3°C) no era lo suficientemente baja como para detener el proceso de descomposición.

Otro posible factor para los altos valores de la dispersión de los datos tiene que ver con la posibilidad de succionar a la célula más allá del límite elástico. De hecho, en algunas ocasiones observamos que la presión aplicada a la célula era tal que la estructura no volvía a su forma original (figura 43). Este tipo de cambio es una deformación permanente, y es el resultado de una fuerza aplicada que sobrepasa los límites de elasticidad del material, en este caso la célula. Cabe aclarar que aunque no en todos los óvulos se observó este comportamiento, es posible que algunos valores obtenidos no sean representativos debido a este efecto.

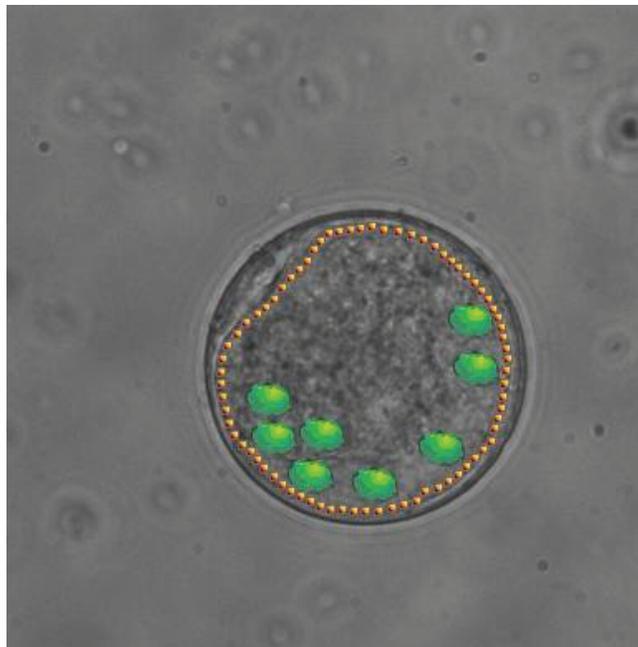


Figura 42. Representación de las estructuras internas del óvulo.

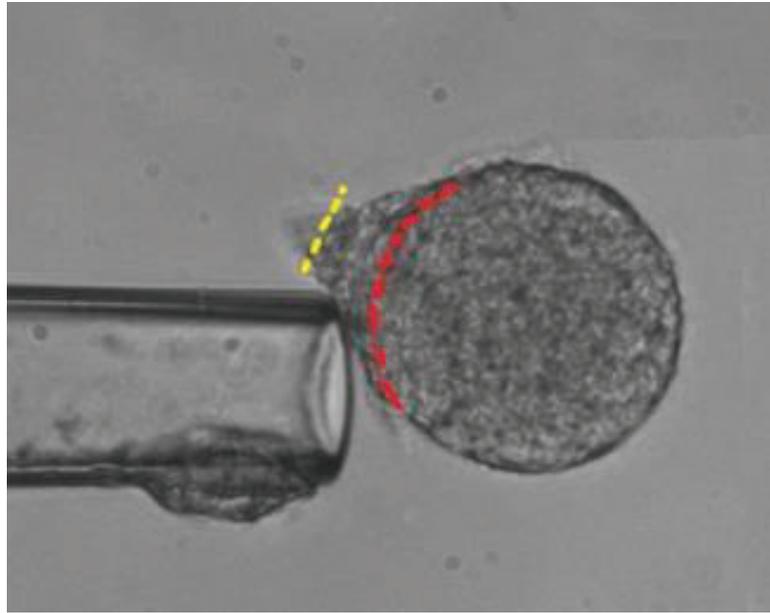


Figura 43. La fotografía de un óvulo después de tomar las medidas, se puede apreciar la protuberancia que indica una deformación permanente en la membrana.

IX. CONCLUSIONES

La elaboración de micropipetas con dimensiones óptimas para la manipulación de células vivas fue exitosa y funcional.

El sistema de micropipetas para medir la presión en células aisladas es efectivo aún con las variaciones obtenidas en los resultados, los valores para módulo elástico resultaron muy parecidos a los reportados en la literatura.

Considerando las fechas de ovulación del erizo de mar *E. vanbrunti*, la extracción de gametos para su manipulación con micropipetas resultó de forma sencilla y efectiva.

Por los resultados obtenidos, los estudios para medición de módulo elástico utilizando óvulos de erizo de mar, deben realizarse de forma inmediata, ya que el módulo elástico aumenta en función del tiempo transcurrido después de ser expulsado de las gónadas.

X. RECOMENDACIONES

Al utilizar los óvulos del erizo de mar para manipulación con micropipetas, se recomienda tomar en cuenta el ciclo reproductivo debido a que la respuesta a las simulaciones es muy variable y los erizos podrían no responder a ellas.

Para la realización de estos estudios es necesario mantener el óvulo viable, por lo cual mediante la administración de antibiótico, conservación en refrigeración (3°C) y retirar la capa de protección gelatinosa en el momento antes de la medición.

Con la finalidad de minimizar los posibles errores en el uso de sistema hidráulico para medir la presión con micropipetas, se recomienda sistematizar electrónicamente con plataformas de desplazamiento y sistemas de bombas de precisión, que ya existen en el mercado.

XI. LITERATURA CITADA

- Andrew, N. L. y Constable, A. 1999. Sea urchins. 126-136 p. En: N. L. Andrew (ed.) Under Southern Seas. The Ecology of Australia's Rocky Reefs. UNSW Press, Sydney.
- Barnes, R. D. 1977. Equinodermos. 958-974 p. En: Zoología de los Invertebrados. 3era Ed. Nueva Editorial: Interamericano, México, D.F.
- Cameron R. A., Tosteson, T. R. And Hensley, V. 1989. The control of sea urchin metamorphosis: ionic effects. *Development Growth & Differentiation*. 31:589-594.
- Chandler, D. E y Heuser J. 1980. The viteline layer of the sea urchin egg and its modification during fertilization. A freeze fracture study using quick-freezing and deep-etching. *Journal of Cell Biology*. DOI: 10.1083/jcb.84.3.618.
- Chandler, D. E. y Heuser J. 1981. Post-fertilization growth of microvilli in the sea urchin egg: New views from eggs that have been quick-frozen, freeze-fractured, and deeply etched. *Developmental Biology*. 82:393-400.
- Chernomordik L., Kozlov M.M. y Zimmerberg J. 1995. Lipids in biological membrane fusion. *Journal of Membrane Biology*. 146:1-14.
- Dayton, P. K., Tenger, M. J., Parnell, P. E. y Edwards, P. B. 1992. Temporal and spatial patterns of disturbance and recovery in a kelp forest community. *Ecological Monographs*. 69:219-250.
- Dean, T. A., Schroeter, S. C. y Dixon J. D. 1984 .Effect of grazing of two species of sea urchins (*Strongylocentrotus franciscanus* and *Lytechinus manesus*) on recruitment and survival of two species of kelp (*Macrocystis pyrifera* and *Pterigophora californica*). *Marine Biology*. 78:301-313.
- Duggins, D.O. 1989. Kelp beds and sea otters: An experimental approach. *Ecology*. 61:447-453.
- Ernst, Susan G, 1997, A century of Sea Urchin Development. *American Zoologist*. 37:250-259.
- Gavara, Nuria y Chadwick Richard S, 2012. Determination of the elastic moduli of thin samples and adherent cells using conical atomic force microscope tips. *Nature Nanotechnology*. DOI: 10.1038/NNANO.2012.163

- Gross, Paul R, Philpott, Delbert E. y NassSilvan. 1965. Electron Microscopy of the centrifuged sea urchin egg, with a note on the structure of the ground cytoplasm. *Journal of Biophysics and Biochemical Citology*. 1: 135-142.
- Hochmuth, Robert M. 2000. Micropipette aspiration of living cells. *Journal of Biomechanics*.33:15-22.
- James, D.W. 2000. Diet, movement, and covering behavior of the sea urchin *Toxopneustesroseus* in rhodolith beds in the Gulf of California, México. *Marine Biology*. 137:913-923.
- Karp, Gerald. 2006. Membrana celular. 273-298 p. En: *Biología celular y molecular, conceptos y experimentos*. Editorial: McGraw-Hill Interamericana.
- Kidd, P. 1978. The jelly and vitelline coats of the sea urchin egg: New ultrastructural features. *Journal of Ultrastructure Research*. 64:204-215.
- Mitchinson J. M, y Swann M, M. 1954. The mechanical properties of the cell surface, the unfertilized sea-urchin egg. *Journal of experimental biology*. 31:461-472.
- Mitchinson J. M. y Swann, M. M. 1954. The Cell Elastimeter. *Journal of experimental biology*. 31:443-460.
- Trimmer, James S. y Vacquier, Victor D. Activation of Sea Urchin Gametes. 1986. *Annual Reviews of Cellular Biology*. DOI: 10.1146/annurev.cb.02.110186.000245.
- Toro-Farmer, G., J. R. Cantera, E. Londoño-Cruz, C. Orozco y R. Neira. 2004. Patrones de distribución y tasas de bioerosión del erizo *Centrostephanus coronatus* (Diadematoidea:Diadematidae), en el arrecife de Playa Blanca, Pacífico colombiano. *Revista de Biología Tropical*. 52:67-76.
- Vacquier, Victor D. 2011.Laboratory on Sea Urchin Fertilization. Molecular reproduction and development. DOI: 10.1002/mrd.21360.
- Van Vliet, K J, Bao, G y Suresh S. 2003.The biomechanics toolbox: experimental approaches for living cells and biomolecules. *Acta Materialia*. 51:5881-5905.
- Wolpert, L.,Jessell, T., Lawrence, E., Meyerowitz, Robertson, E., y Smith, J. 2011. Echinoderms: 202-210 p. En: *Principles of development* (Third Edition).Oxford University Press.

APÉNDICE I

**Tabla II. Registro de valores obtenidos para calcular el módulo elástico (E).
Datos Experimentales Completos**

	m	E (N/m²)	Error m en E	Porcentaje de error	b	Error en b
Serie 1B	1302	269.03	47.23	15.96	563.3	185.12
Serie 2B	3181.4	723.33	199.66	27.60	2215	728.30
Serie 3B	599.62	136.33	70.32	51.58	61.97	265.16
Serie 4B	1999.8	454.68	104.16	22.91	1568	451.27
Serie 9B	563.17	121.91	34.66	28.44	54.92	87.87
Serie 10C	1306	296.94	66.37	22.35	724	186.90
Serie 11C	6511	1480.36	189.26	12.78	2393	404.77
Serie 12C	1805	410.39	72.77	17.73	778	198.61
Serie 13C	2147	488.15	78.41	16.06	1181	248.10
Serie 14C	2377	540.44	44.88	8.30	1040	138.37
Serie 15C	3102	705.28	87.70	12.44	1771	297.32
Serie 16C	1975	449.04	112.27	25.00	1065	340.35
Serie 17C	1232	280.11	45.25	16.15	665.2	138.69
Serie 18C	4197	954.25	117.06	12.27	1812	314.92
Serie 19D	16289	3703.53	605.22	16.34	3476	713.25
Serie 20D	7977	1813.68	525.53	28.98	3370	1180.70
Serie 21D	10213	2322.07	256.51	11.05	695.3	176.54

En la primera columna se encuentran los valores de “m”, correspondientes a la pendiente. En la siguiente, los valores de elasticidad, expresados en N/m². En la siguiente se consideró el error de la pendiente, calculada en las unidades de presión. En la columna siguiente es el porcentaje que representa ese error en las unidades de presión. “b” es el valor que acompañaba la ecuación de la recta en cada serie, representando donde debería pasar la recta en el plano. Y por último el error de “b”.