



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
MATERIALES AVANZADOS, S. C.**

POSGRADO

**USO DE NANOPARTÍCULAS LUMINISCENTES PARA
ESTUDIAR LOS EFECTOS QUÍMICO Y TÉRMICO POR
RADIACIÓN EN CÉLULAS**

Tesis

que como requisito para obtener el grado de

Doctorado en Ciencias de Materiales

Presenta:

Karla Josefina Santacruz Gómez

Chihuahua, Chihuahua a 14 de Junio del 2013.

COMITÉ DE TESIS

Dr. Erasmo Orrantia Borunda

Director Interno CIMAV

Dr. Martín R. Pedroza Montero

Director externo UNISON

Dr. Rodrigo Meléndrez Amavizca

Dr. Marcelino Barboza Montero

Dr. Mario E. Álvarez Ramos

ÍNDICE

	Contenido	Página
	AGRADECIMIENTOS	I
	DEDICATORIA	II
	LISTA DE FIGURAS	III
	LISTA DE TABLAS	IV
	ABREVIATURAS	V
1	RESUMEN	1
	ABSTRACT	2
2	INTRODUCCIÓN	3
	2.1 El tejido Sanguíneo	3
	2.1.1. Los Glóbulos Rojos	9
	2.1.2. Los linfocitos	11
	2.2 Las radiaciones	12
	2.2.1 Radiación gamma	12
	2.1.1.1. Efecto Químico	14
	2.2.2 Láseres	15
	2.2.2.1 Efecto Térmico	15
	2.3 Nanopartículas en aplicaciones biológicas	16
	2.3.1 Nanodiamantes	17
	2.3.2 Puntos cuánticos	17
3	HIPÓTESIS	20
	3.1 Objetivo General	20
	3.2 Objetivos Particulares	20
4	MATERIALES Y MÉTODOS	21
	4.1 Efecto Químico por Radiación	21
	4. 1.1 Carboxilación de NDs	21

4.1.2	Incubación de NPs	21
4.1.3	Separación de GR	21
4.1.4	Microscopía de fuerza atómica	24
4.1.5	Espectroscopia Raman	24
4.1.6	Interacción de GR-cNDs y viabilidad	24
4.2	Efecto Térmico por Radiación	24
4.2.1	Incubación de las CdSe-QDs en células	27
4.2.2	Atrapamiento óptico: calentamiento celular	27
4.2.3	Determinación de la temperatura intracelular	28
4.2.4	Evaluación del grado de deformación celular	28
5.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	31
5.1	Evaluación del efecto Químico por radiación	31
5.1.1	Estados de Oxigenación asistidos con cNs	31
5.1.2	Alteración de la membrana celular	35
5.1.3	Interacción/viabilidad GR con los NDs y cNs	38
5.2	Evaluación del efecto Térmico por radiación	38
5.2.1	Determinación de la temperatura intracelular	42
5.2.2	Alteraciones en la Morfología Celular	44
6	CONCLUSIONES	49
7	Futuras Investigaciones	50
	REFERENCIAS	51
	ANEXOS	55
	A1 Fundamentos de la Espectroscopía Raman	55
	A2 Fundamentos del AFM	57

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que me han acompañado durante estos tres años de formación doctoral, por lo tanto probablemente este espacio sea insuficiente para dedicarles algunas palabras.

Iniciando por la parte técnica, quiero agradecer al grupo administrativo de CIMAV por apoyarme de manera inmediata y siempre cordial en todos los trámites que han tenido lugar durante este proyecto, y vaya que han sido muchos y de todas índoles: especialmente agradezco a Nicté, Flor y Sandra por su excelente calidad humana y eficiencia.

Por supuesto agradezco al Dr. Erasmo Orrantia por su apoyo académico, administrativo y la magnífica disposición, así como a todos los miembros del comité.

Agradezco al CONACYT por los recursos invertidos en mi formación, y a la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Sonora por su extraordinario apoyo que hizo posibles mi asistencia a eventos académicos, en su mayoría, internacionales, especialmente al Dr. Saúl Herrera por su gestoría. A la coordinación interna del programa doctoral en la USON.

Una pieza clave de este logro han sido sin duda mis formadores entre ellos el Dr. Rodrigo Meléndrez por sus valiosos consejos y aportación intelectual, igualmente al Dr. Marcelino Barboza, ejemplo a seguir, y a la Dra. Verónica Mata (Vero), además por permitirme usar sus instalaciones y reactivos tantas veces. Indudablemente mis respetos para los Catedrático Dr. José García Solé (Pepe),

Dr. Daniel Jaque (Dani) y Dra. María del Carmen Iglesias (Mamen) por recibirme en la Universidad Autónoma de Madrid y brindarme, además de sus conocimientos y experiencia científica, su amistad. Al extraordinario Dr. Antonio Benayas, Tony Soprano para mí, primero gracias por estar conmigo –sin conocerme aún- durante las casi 24 horas de mi famosa retención Madrileña y por seguir conmigo los dos años sucesivos y contando. Agradezco todos tus consejos científicos y personales: en ambos rubros te considero el mejor.

He dejado a propósito, este espacio final de lo académico, para el personaje que considero el cimiento de mi carrera profesional, el Dr. Martín Pedroza Montero. Le agradezco su finita paciencia (si, puse finita, que se nos ha agotado muchas veces) como mentor académico y científico durante los últimos ocho años, y el invaluable apoyo moral, humano y profesional que me ha brindado desde hace casi diez años. Gracias por tener fe en mí como director y como amigo.

En otro aspecto, quiero agradecer a los amigos a quienes rechace muchas veces sus invitaciones a reuniones y siguieron invitándome: a quienes siguen allí pendientes. Por su puesto a mi familia por comprenderme, apoyarme, amarme y consentirme todo este tiempo con el pretexto de que estaba estudiando-trabajando siempre.

Gracias a dios por todo aquello que me maravilla. Y como dijo Albert Einstein *el hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir.*

DEDICATORIA

Quiero dedicar, no mi etapa doctoral, pero si lo que viene a continuación a mi familia, ya que son ellos lo más importante de lo importante.

A mis queridos padres, Heliodoro Santacruz y a Marilú Gómez, por su ejemplar entrega día a día.

A mis hermanos Alán, Marlen y Aldo que, en imaginables maneras, me han dado valiosas lecciones.

A mi preciosa Mamá Fina por sus bendiciones.

A mis adorados sobrinos, Katty y Diego por sus dotaciones de alegría.

A mi futura familia.

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura del eritrocito	4
2	Iones en la membrana del eritrocito	5
3	Morfología de los eritrocitos	7
4	Configuración de la Hb unida al Oxígeno	9
5	Morfología del linfocito	12
6	Estructura de un centro NV en nanodiamantes	19
7	Espectro Raman de los ND Pure Grado G	23
8	Configuración del microscopio de fuerza atómica	25
9	Configuración del microscopio Raman	26
10	Esquema de medidas termoluminiscentes	29
11	Esquema del microscopio de fluorescencia doble haz	30
12	Espectros Raman promediado de GR	32
13	Espectros Raman de GR control	34
14	Alteraciones en los GR inducidas por la radiación	36
15	Relación de aspecto de GR durante EQR	37
16	Viabilidad de GR tratados con PBS, cNDs y NDs	39
17	Imagen óptica y fluorescente de los GR en PBS	40
18	Comportamiento de los cNDs/NDs-GR con PBS	41
19	Espectro de emisión de los QDs-CdSe	43
20	Incremento de temperatura contra potencia del láser	45
21	Cambios morfológicos de linfocito durante ETR	48
22	Efecto Raman	56
23	Esquema de detección del AFM	58

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Características químicas del NDs Grado G	22
II	Modos vibracionales Raman activos en los Eritrocitos	33
III	Temperaturas generadas por efecto térmico	46

LISTA DE ABREVIACIONES

ADP	Adenosindifosfato
AR	Aspect ratio
ATP	Adenosintrifosfato
Ca ²⁺	Ión Calcio
Cl ⁻	Ión Cloro
CdSe	Selenuro de Cadmio
cNDs	Nanodiamantes carboxilados
EICH-AT	Enfermedad injerto contra huésped asociada a la transfusión
ER	Retículo endoplasmático
GR	Glóbulos rojos
H	Hidrógeno
OH	Hidroxilo
Hz	Hertzios
HPO ₄ ²⁻	Ión Fosfato
HCO ₃ ⁻	Ión Bicarbonato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
K ⁺	Ión de potasio
LASER	Light amplification by stimulated emission of radiation
LED	Light emitting diode
LET	Linear energy transfer
Mg ²	Ión Magnesio
mW	miliwatts
Na ⁺	Ión de sodio
Nd-YAG	dopaje con neodimio de cristales de óxido de itrio y aluminio
NPs	Nanopartículas
NDs	Nanodiamantes

nm	Nanómetros
n	neutrónicas
Ne	Neón
QDs	Puntos cuánticos
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
ROS	Reactive oxygen species (especies reactivas de Oxígeno)
TA-GVHD	Transfusional associated graft versus host disease
α	alfa
β	beta
γ	gamma
λ	Longitud de onda
μm	Micrómetros
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados
^{99}Tc	Tecnecio 99
^{60}Co	Cobalto 60
^{137}Cs	Cesio 137
2D	Dos dimensiones
3D	Tridimensional

1. RESUMEN

La interacción de la radiación con el tejido biológico produce, al menos, dos tipos de efectos: químico y térmico. El efecto químico es asociado a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por ionización, mientras que el térmico consiste en el incremento de la temperatura debido a la absorción de energía térmica inducida por un láser. En este trabajo se estudiaron los fenómenos químico y térmico inducido por radiación en células asistido con nanopartículas (NPs). El efecto químico se indujo irradiando la sangre con una fuente de Cobalto 60. La oxigenación celular se correlacionó a través de espectroscopia Raman con la ayuda de nanodiamantes carboxilados (cNDs), y las alteraciones morfológicas se evaluaron con microscopia de fuerza atómica (AFM). Por su parte, el efecto térmico se indujo atrapando ópticamente las células con láseres de 820 y 980 nm aplicando potencias de 20 a 250 mW, se utilizaron NPs de CdSe para determinar la temperatura generada, y de igual forma se analizaron los efectos. Nuestros resultados muestran que, independientemente de la naturaleza de la radiación, la membrana celular se compromete cambiando sus propiedades fisicoquímicas y estructurales. Se demostró la eficiencia de los cNDs como nanodetectores de los estados de oxigenación, y de los QDs como nanosensores de temperatura sin afectar las condiciones experimentales ni la viabilidad celular.

Palabras clave: Ionización, efecto fototérmico, nanodiamantes carboxilados, puntos cuánticos, nanotermómetros, espectroscopia Raman, microscopia de fuerza atómica.

ABSTRACT

The interaction of radiation with biological tissue produces at least two effects: chemical and thermal. Chemical effect is associated with the formation of reactive oxygen species (ROS) caused by ionization, while thermal consist in temperature increasing due to energy absorption generated by a laser. In this study, cells blood stressed by radiation -chemical and thermal effect- was evaluated using nanoparticles (NPs). Irradiating whole blood with a cobalt-60 source induced the chemical effect. This was correlated with erythrocyte oxygenation states through Raman spectroscopy assisted by carboxylated nanodiamond (cNDs) and cellular topographic were analyzed with atomic force microscopy (AFM). Thermal effect was induced with a laser using an optical trapping system, temperature were determined using quantum dots of CdSe (QDs-CdSe). Our results suggest that, regardless of the nature of radiation, cell membrane experience physicochemical and structural alterations such as deoxygenation. These results suggest that cNDs can be used as oxygenation states biosensors and QDs-CdSe as nanothermometers without affecting cellular conditions or viability.

Keywords: Ionisation, photothermal effect, carboxylated nanodiamond, quantum dots, nanothermometers, Raman spectroscopy, atomic force microscopy.

2. INTRODUCCIÓN

El siguiente capítulo contiene información específica sobre los temas que se abordarán en el presente trabajo de tesis. Debido a la naturaleza interdisciplinaria del mismo, los fundamentos teóricos se dividirán en tres secciones: biología celular, física de radiaciones y nanopartículas. En primer lugar se describirán las células sanguíneas, en partículas linfocitos y eritrocitos. Se referirán algunos aspectos que influyen en la función celular, específicamente estrés químico y térmico. El segundo apartado tratará los efectos de las radiaciones, ionizante y no ionizante, en el tejido biológico. Dentro de las ionizantes (en este caso, gamma) se hablará del efecto indirecto o efecto químico. De las radiaciones no ionizantes, se abundará en el efecto térmico (fototérmico) provocado por el uso de LEDs (por sus siglas en inglés light-emitting diode) altamente enfocados. Finalmente, se describirán dos grupos de nanomateriales de importancia para este trabajo, los nanodiamantes como plataformas biológicas y los puntos cuánticos como materiales sensibles a la temperatura.

2.1. El Tejido Sanguíneo.

El tejido sanguíneo se encuentra en el interior de los vasos sanguíneos y circula por todo el organismo debido al sistema cardiovascular. Entre sus principales funciones está el transportarte de nutrientes y oxígeno desde el aparato digestivo y los pulmones hasta el resto de las células, así como la recolección de productos de desecho. Una función remarcable de la sangre es el mantenimiento de la homeostasis, proceso que consiste en conservar homogéneamente las condiciones de temperatura, pH, viscosidad, la composición, entre otros. La sangre se compone de elementos formes y plasma. El plasma (55%) es un fluido amarillento traslúcido que representa la matriz extracelular líquida en la que están suspendidas las células. Los elementos formes constituyen alrededor del 45% y se agrupan en glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas.

2.1.1 Los glóbulos rojos (GR). Son discos bicóncavos aproximadamente $7.5 \mu\text{m}$ de diámetro con bordes que son más gruesos que el centro donde se observa una palidez debida a la presencia de la hemoglobina (fig. 1b). En su interior contienen una mezcla de agua, sales, proteínas, azúcar, etc. Las sales son responsables de otorgarle cierta tonicidad, que se refiere a la cantidad de iones disueltos en el agua citoplasmática. Si la concentración de iones es menor en el interior de la célula que el exterior se le conoce como hipotónica, en este caso las células tienden a hincharse y reventar, mientras que el caso contrario la hace hipertónica (fig. 2)(E. Gorter et al., 1925). Estas células carecen de núcleo y orgánulos y su citoplasma está ocupado casi en su totalidad por la hemoglobina (Hb). La Hb es una heteroproteína de masa molecular 64.000 g/mol , de color rojo característico debido al hierro, que transporta el oxígeno desde los órganos respiratorios hasta los tejidos, el dióxido de carbono desde los tejidos hasta los pulmones que lo eliminan y también participa en la regulación de pH de la sangre, en vertebrados y algunos invertebrados. Está formada por cuatro cadenas polipeptídicas (globinas) a cada una de las cuales se une un grupo hemo, cuyo átomo de hierro es capaz de unir de forma reversible una molécula de oxígeno

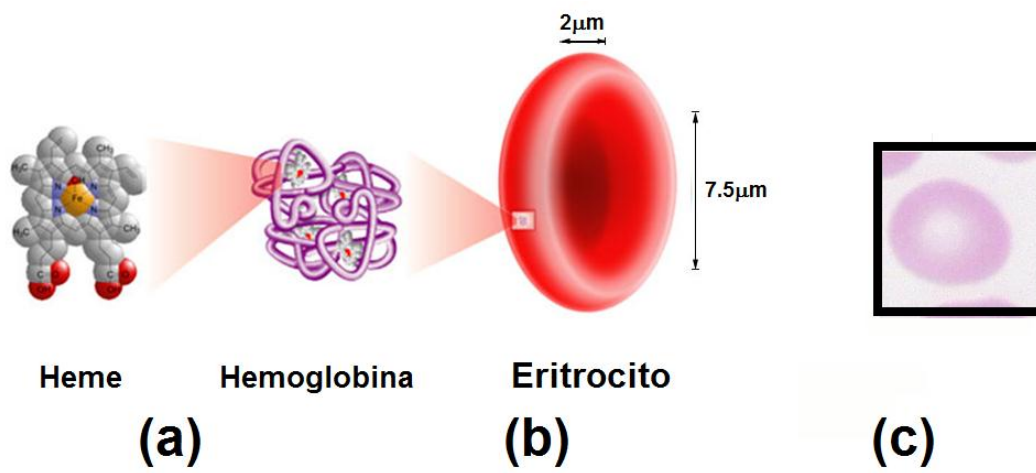


Figura 1. Estructura del eritrocito. (a) Estructura de la molécula de hemoglobina situada en la superficie eritrocitaria; (b) dimensión; (c) Eritrocito en microscopio óptico con tinción Wright.

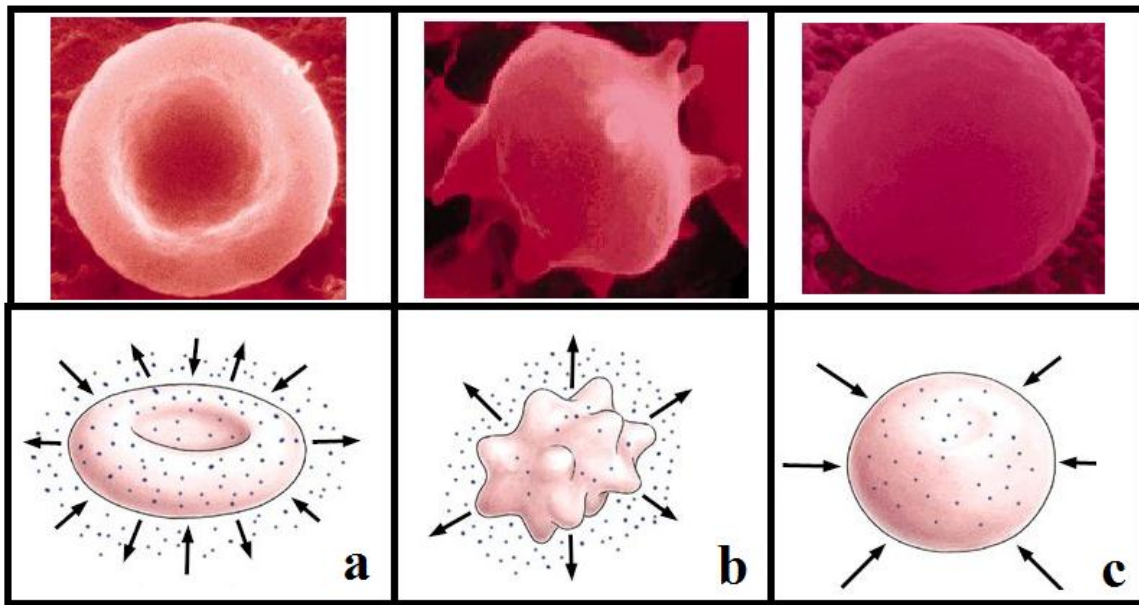


Figura 2. Concentración de iones en la membrana eritrocitaria. Concentración normal (a), solución hipertónica (b) e hipotónica (c).

El grupo hemo está formado por un grupo pirrol (unión del succinil-CoA al aminoácido glicina), la protoporfirina IX (unión de cuatro grupos pirrol), y el grupo hemo (protoporfirina IX unida al ion ferroso Fe^{2+}). El grupo hemo está localizado en un hueco entre dos hélices de la cadena de la globina y a su vez está protegido por un residuo de valina. Los grupos vinilo no polares del grupo hemo se encuentran en el interior hidrofóbico de dicho hueco, mientras que los grupos profirina polares cargados se encuentran orientados hacia la superficie hidrofílica de la subunidad. También se encuentran residuos de histidina de las cadenas polipeptídicas, que se enlazan al átomo de hierro y se designan como histidinas proximales, ya que están presentes cerca al grupo hemo, mientras que la histidina distal se encuentra lejos del grupo hemo. El átomo de hierro se encuentra en el centro del anillo de profirina y tiene seis valencias. El hierro está unido al nitrógeno de los cuatro anillos de pirol por cuatro de sus valencias, su quinta valencia se une al nitrógeno de la histidina proximal y la sexta está ocupada por la hisitidina distal o por oxígeno (fig. 1a). Además, esta adopta diferentes configuraciones dependiendo de la presencia o ausencia del oxígeno. Cuando tiene unido oxígeno se denomina oxihemoglobina (OxiHb) o hemoglobina oxigenada, dando el aspecto rojo o escarlata intenso característico de la sangre arterial. En cambio, si pierde el oxígeno, se denomina hemoglobina reducida o desoxigenada (DesoxiHb), y presenta el color rojo oscuro de la sangre venosa. La forma y el tamaño de los eritrocitos, de hecho, depende principalmente de la estructura oxigenada o desoxigenada de la Hb, por lo cual estas células tienen membranas con gran capacidad de deformación. De hecho, muchas de estas alteraciones irreversibles se utilizan en la práctica clínica para identificar algunas patologías hematológicas (Wintrobe, M. M, 2009). A continuación se describen las más frecuentes:

Los acantocitosis son eritrocitos con espículas de longitud y posición irregular, se produce en la abetalipoproteinemia, en la cirrosis hepática, mielofibrosis aguda y crónica, y en pacientes a los que se les administra altas dosis de heparina.

Los dianocitos (células dianas o target cells) son planos y con forma de sombrero mexicano. Esto hace que, vistos frontalmente, tengan un reborde colorado, que delimita una zona anular pálida, cuyo centro también está coloreado. Se presentan en anemias de tipo regenerativo junto con policromasia.

Los esferocitos son considerados microcitos que cuentan con una membrana celular reducida, lo que incrementa la permeabilidad hacia el sodio, son casi exclusivos de caninos y se presentan generalmente en anemias de tipo autoinmune y en anemias hemolíticas isoimunes así como después de una transfusión. Son removidas rápidamente de la circulación por los macrófagos esplénicos, debido a su falta de elasticidad y a que no están habilitadas para traspasar los poros capilares esplénicos.

Los estomatocitos son eritrocitos con una forma oval hacia el centro que se observa en la estomatocitosis hereditaria del Alaska malamut y en enfermedades hepáticas.

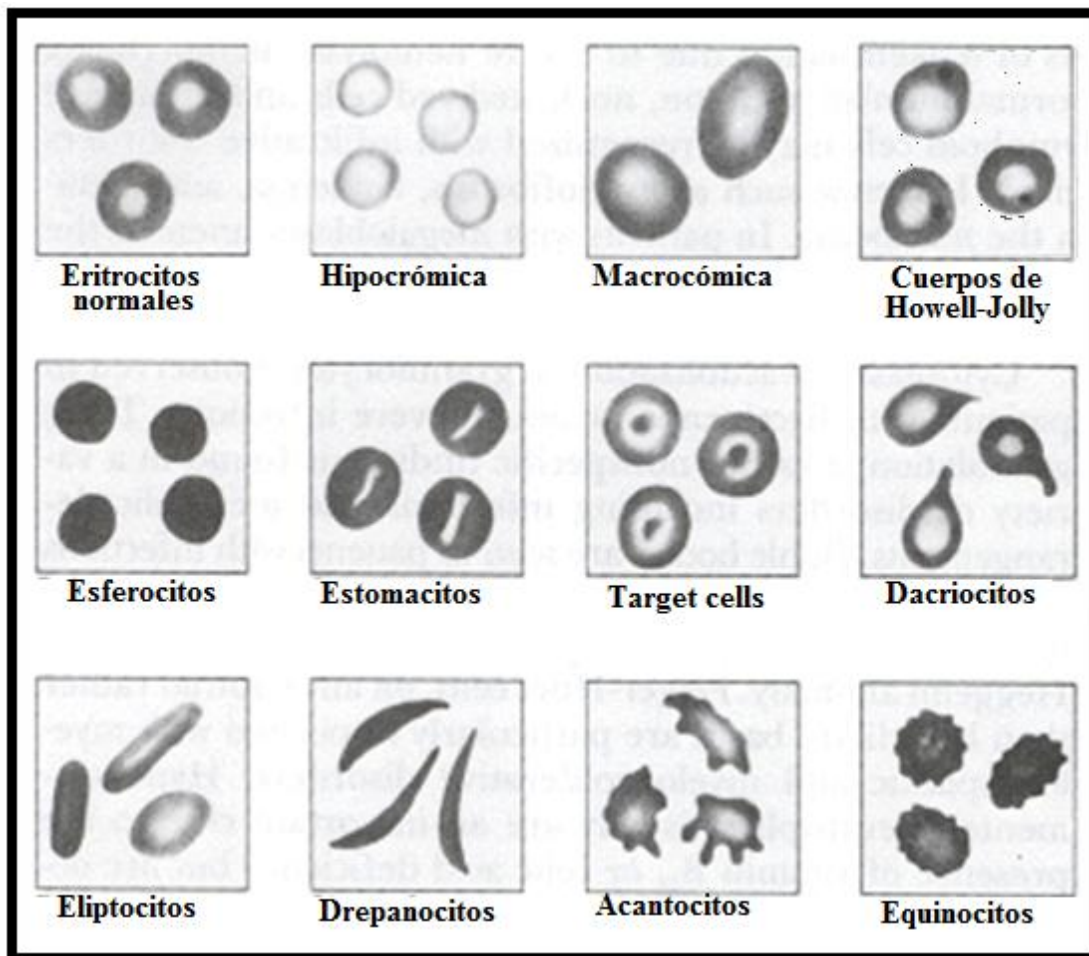


Figura 3. Morfología de los eritrocitos. Esta imagen muestra anomalías morfológicas más comunes en eritrocitos.

Los drepanocitos son eritrocitos con forma de hoz. Se produce en la anemia de células falciformes.

Los eliptocitos consisten en GR con forma elíptica. Se produce en la anemia ferropénica y megaloblástica, en la mielofibrosis y eliptocitosis hereditaria.

Los equinocitos, también llamados estereocitos o astrocitos, consiste en la existencia de eritrocitos con espículas cortas y distribuidas regularmente a lo largo de toda su superficie. Se produce, por ejemplo, en la uremia, cuando los hematíes son pobres en K^+ y en las hepatopatías neonatales.

Los cuerpos de Howell-Jolly son remanentes nucleares observados frecuentemente como consecuencia de un estado anémico en procesos regenerativos, no obstante si son numerosos pueden indicar hipoesplenismo.

Los cuerpos de Heinz son estructuras localizadas en la membrana eritrocítica producto de la desnaturalización de la hemoglobina causada por la acción oxidante de ciertas drogas o químicos, estos cuerpos desorganizan la membrana eritrocítica y se asocian con hemólisis intravascular.

La hipocromía se refiere a la presencia de palidez marcada en la región central del eritrocito dado por la disminución en la concentración de hemoglobina dentro de la célula, la causa más común en la que se presenta es la deficiencia de hierro.

La poiquilocitosis consiste en células anormales en su forma comúnmente encontradas en anemias debidas a la pérdida crónica de sangre o a enfermedades caracterizadas por fragmentación eritrocítica, células que son retiradas prematuramente de la circulación agudizando el estado anémico.

Tal como se mencionó anteriormente, la Hb es responsable de transportar el oxígeno y lo hace a través de un comportamiento cooperativo, en el cual esta se satura en un 98% de oxígeno en los pulmones. Esto quiere decir que un 98% de los sitios de enlace de cada molécula de hemoglobina están enlazados a una molécula de oxígeno. Al movilizarse la Hb por la sangre, libera el oxígeno a las células, y su nivel de saturación se reduce a un 32%.

Dicha cooperatividad se puede explicar a través del modelo Monod-Wyman-Changeux (MWC) (Changeux J. P. et al., 1964). En este modelo se describe la transición alosterica de proteínas compuestas de subunidades idénticas (protómeros), tales como el 2,3- Bisfosfoglicerato (2,3- BPG s) (Eaton, W. A., et al., 1999). La idea central propuesta por Changeux y colaboradores es la existencia de dos estados de simetría distinta, designados como T (tenso) de baja afinidad, y R (relajado) de alta afinidad (fig. 4). Por lo tanto, a bajas cantidades de ligando unido, la proteína prefiere el estado T de baja afinidad, sin embargo, como aumenta la cantidad de ligando unido, la proteína preferirá el estado de R. Así, la DeoxiHb es considerada en el estado T, mientras que al enlazarse un oxígeno, se favorece el estado R (Klimartin J.V. et al., 1978).

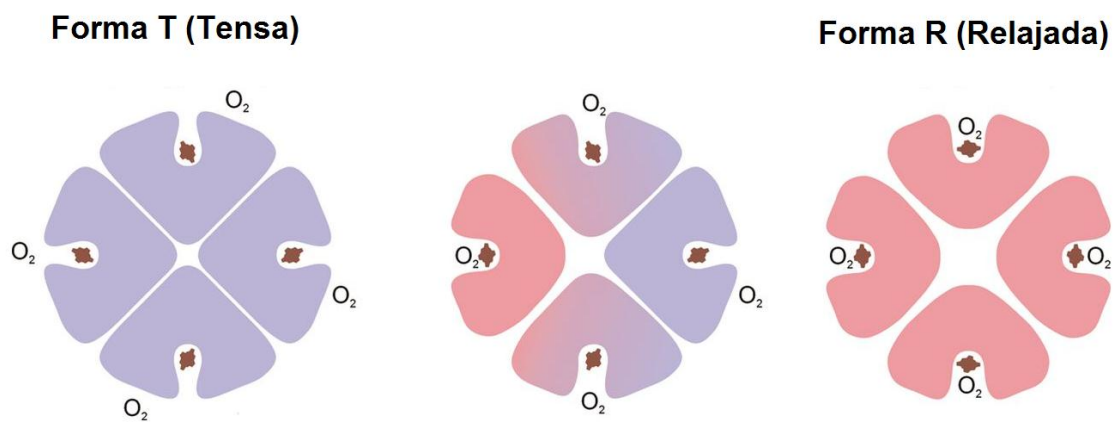


Figura 4. Configuración de la hemoglobina unida al oxígeno. Se muestran los estados relajado y tenso de la Hb dependiendo de la unión con oxígeno.

Diversos estudios han demostrado la eficacia del uso de la espectroscopía Raman para obtener información de los modos vibracionales activos de la Hb y sus subestructuras en los estados T y R. En este sentido, Wood y colaboradores fueron los primeros en reportar espectros Raman de Hb en estados T y R de eritrocitos individuales. En dicho trabajo se reportan señales Raman para eritrocitos oxigenados que corresponden a OxiHb (estado R) en los rangos de 1224-1226 cm^{-1} ($\nu_5 + \nu_8$), 1240-1250 cm^{-1} (ν_{13}), y 1562-1565 cm^{-1} (ν_2) y 1636-1640 cm^{-1} (ν_{10}), mientras que para células desoxigenadas de la desoxiHb (estado T) se observan bandas características del grupo heme de bajo espín en los rangos de 1210-1215 cm^{-1} ($\nu_5 + \nu_8$), 1544-1547 cm^{-1} (ν_{11}), 1562-1565 cm^{-1} (ν_2), 1580-1582 cm^{-1} (ν_{37}) y 1606-1610 cm^{-1} (ν_{10}). Describiendo, además, un pico en el espectro a 755 cm^{-1} , que se ha utilizado para estimar grado de oxigenación, independientemente de la forma oxigenada de la Hb (Wood et al., 2001; Torres Filho, et al., 2008).

Existen variaciones en las bandas reportadas por otros autores (Ramser et al., 2004; Bayden R. Wood et al., 2005; Rao et al., 2009; Yu-Chung Lin et al., 2012) para estados oxigenados y desoxigenados, pero en general coinciden con las denominadas banda de estados de oxigenación. En general se correlaciona con los aislamientos del grupo hemo en el estado férrico, argumento sugerido por Yamamoto y colaboradores (Yamamoto et al., 1973), apoyando el modelo de Weiss (Weiss et al., 1962) en cuanto a la importancia de la naturaleza del enlace de hierro-oxígeno tras la unión con la Hb. En este modelo, cuando la molécula de oxígeno se une a la DeoxiHb arranca un electrón del ion ferroso, dejando a este metal en un estado férrico de bajo espín con el oxígeno convertido al ión superóxido (O^{-2}) (C. Balagopalakrishna et al., 1996). El diamagnetismo posterior implica una interacción de intercambio anti-ferromagnético entre el hierro de bajo espín ($S=1/2$) y el O^{-2} ($S=1/2$) (L. Rimai et al., 1975). El estado del hierro de alto espín es de aproximadamente 0.4 Å fuera del plano de la porfirina (C. Franzen et al., 1994) y por lo tanto la porfirina es abovedada y exhibe simetría C_{4v} idealizada. Por su parte, durante el estado de bajo espín, la porfirina es más plana y el grupo heme exhibe una simetría D_{4h} con la inclusión del elemento de simetría de inversión, debido a la translocación de la hierro en el plano.

Estos y otros estudios consideran que la importancia de identificar los picos asociados a los estados oxigenados del eritrocito tiene un valor relevante en la comprensión del metabolismo eritrocitario, y puede ser utilizado potencialmente en el diseño de fármacos para un gran número de condiciones fisiológicas y clínicas asociadas con falta de oxígeno.

Por otra parte, aunque los eritrocitos son las células más abundantes del tejido sanguíneo, los glóbulos blancos (GB) juegan un papel imprescindible para mantener la homeostasis y la función del organismo. Los GB son también conocidos como leucocitos, y se dividen en dos grupos de acuerdo a su complejidad: mononucleares (linfocitos y monocitos), y polimorfonucleares (basófilos, eosinófilos y neutrófilos). Siendo, el linfocito la célula más estudiada, probablemente debido a su sencillez morfológica además de su relevancia en patologías asociadas a la respuesta inmune.

2.2.2 Linfocitos. Los linfocitos son las células menos complejas, y a su vez las más sensibles a los agentes externos/internos. En su mayoría son circulares con diámetros de 8 a 15 μm , y tienen un núcleo ovoide que ocupa el 90% del volumen citoplasmático (Fig. 5). Es precisamente la magnitud de la proporción del núcleo con respecto al citoplasma, lo que hace del linfocito una célula diana para innumerables situaciones de estrés. Existen tres subpoblaciones de linfocitos: B, T y NK (por sus siglas en inglés, natural killers), los cuales solamente se pueden identificar a través de marcadores citoquímicos de sus proteínas. Su principal tarea es desempeñar un rol fundamental en la respuesta inmune humoral y celular.

Al igual que los eritrocitos, los cambios morfológicos y/o aumento en la concentración de los leucocitos se relacionan en el diagnóstico clínico con la presencia de malignidad, en este caso procesos infecciosos, inflamatorios, virales así como otras patologías. Sin embargo, pocas de estas alteraciones se relacionan con las células rojas. Por lo cual, el mayor valor diagnóstico en los linfocitos se basa en la detección de anticuerpos mononucleares dirigidos a sus subpoblaciones. El rol principal de los linfocitos es responder biológicamente contra agentes extraños, aunque no en todos los casos esta respuesta es favorable. Un ejemplo claro de esto es el caso de una complicación asociada a las transfusiones sanguíneas, en la que los linfocitos transfundidos atacan a las células del receptor causando lo que se conoce como enfermedad de injerto contra huésped asociada a la transfusión (EICH-AT).

La EICH-AT ocurre debido a que los linfocitos T del donante desencadenan una respuesta inmune al identificar a los linfocitos del receptor como cuerpos extraños. Estos linfocitos T producen un exceso de citocinas entre las que se incluyen el TNF- α y el IFN- γ (Anderson, K. et al., 1990). Los desencadenantes de esta reacción pueden ser un gran número de antígenos presentes en las células del receptor, entre los que se incluyen por ejemplo los antígenos leucocitarios humanos (HLAs). Se caracteriza por el daño selectivo a los tejidos del hígado, piel y mucosas, y al tracto gastrointestinal. Investigaciones recientes indican que otros órganos diana de la enfermedad incluyen al tejido hematopoyético y sistema inmune (médula ósea y timo) así como también pulmones, causando una forma idiopática de neumonitis. La enfermedad crónica ataca también estos órganos, pero con el correr del tiempo aparecen daños también en el tejido conectivo y glándulas exocrinas. Si el sistema inmunológico es competente, responde adecuadamente y no se desencadena este cuadro. Sin embargo, cuando existe alguna inmunodeficiencia como en pacientes con neoplasia, multiquemaduras, VIH, neonatos de bajo peso, etc., el sistema inmunológico del receptor no es capaz de destruir a los linfocitos del donante (Billingham RE et al, 1959; Hutchinson K. et al, 2002).

Se han derivado numerosas investigaciones orientadas a tratar de separar los efectos indeseables de la fisiología de los linfocitos T, de aquellos que son considerados sumamente valiosos. En este sentido, se ha utilizado radiaciones para desactivar la capacidad mitótica del linfocito y, con ello, prevenir la EICH-AT.

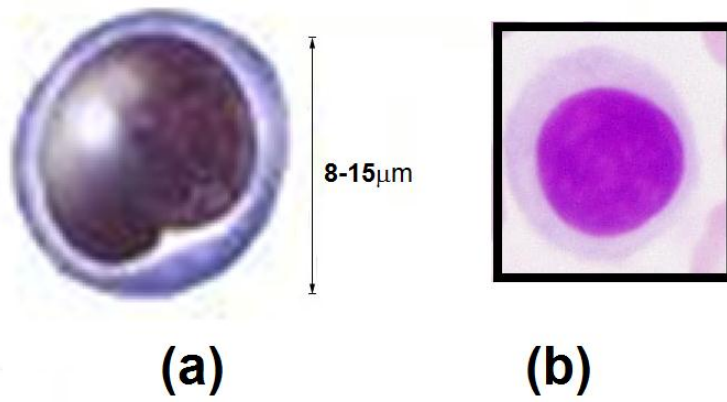


Figura 5. Morfología del linfocito. (a) Dimensiones y forma recreada; (b) linfocitos visto en microscopio óptico con tinción Wright.

2.2 Las Radiaciones.

La radiación es la emisión y propagación de energía a través del vacío o de un medio material en forma de onda o de partícula. De acuerdo a su interacción con la materia se denominan ionizantes y no ionizantes. Así, aquella radiación que al interactúa con la materia es capaz de eliminar los electrones fuertemente ligados a los átomos, creando iones, se considera ionizante. Contrariamente, aquella que posee energía para moverse alrededor de los átomos en una molécula o hacer que vibre, pero no lo suficiente para eliminar los electrones, se conoce como no ionizante. En este trabajo de tesis utilizaremos a los rayos gamma (γ) para ejemplificar a aquellas que ionizan, y a los láseres para las no ionizantes.

2.2.1 Radiación gamma. Un tipo de radiaciones ionizantes. La ionización es el proceso por el cual se arranca un electrón de un átomo. El conjunto formado por el electrón libre y el átomo con carga positiva resultante se denomina par iónico. Si un átomo recibe un aporte energético suficiente es posible separar de él uno o varios electrones, quedando entonces el átomo eléctricamente descompensado, su número de cargas positivas es superior al de las negativas, o viceversa, se dice que es un átomo ionizado o ión. Los iones suelen ser muy reactivos y tienden a recuperar su estabilidad mediante la captura de cargas libres o mediante su unión a otros átomos dando lugar a compuestos químicos.

Por su parte, la radiación gamma (γ) comprende de un flujo de ondas electromagnéticas de alta energía, que suelen tener su origen en el núcleo excitado. Dicha energía es producida por materiales radiactivos como el Tecnecio 99 (^{99}Tc), el Cesio 137 (^{137}Cs) o el Cobalto 60 (^{60}Co) utilizados en medicina nuclear tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de malignidades. Cuando un núcleo excitado emite esta radiación no varía ni su masa ni su número atómico, e interaccionan con la materia colisionando con las capas electrónicas de los átomos con los que se cruzan, perdiendo lentamente su energía, por lo que pueden atravesar grandes distancias. Debido a su pequeña longitud de onda, tiene un gran poder de penetración, siendo capaz de atravesar cientos de metros en el aire, el cuerpo humano y las materias de poca densidad, así como láminas de acero de hasta 10 cm de espesor y son detenidas solamente por capas grandes de hormigón, plomo (espesores de 12 mm) o agua. Sin embargo, frente a su alto poder de penetración, posee menor capacidad de ionización que las partículas alfa y beta. Una de las mejores aplicaciones de la radiación γ comprende la esterilización de tejidos, que se logra al reducir la capacidad mitótica de microorganismos y células. En el caso de la sangre, se emplea específicamente para inhibir las funciones de los linfocitos T y, por lo tanto, prevenir la EICH-AT en pacientes inmunocomprometidos, tal como se explica en el capítulo anterior.

Al hablar de aplicaciones de la radiación en biología, es importante hablar de radiosensibilidad. Esta se define como la capacidad inherente de una célula, tejido, sistema o individuo de ser afectado por la radiación. De acuerdo con los postulados de Bergonié y Tribondeau, la radiosensibilidad se determina por factores como la actividad mitótica, madurez o diferenciación celular y vida media

(Haber A. H. et al. 1969). Desde el punto de vista de la radiobiología, cuando la energía de radiación es absorbida por el material biológico, existe la posibilidad de que esta interactúe con el ácido desoxirribonucleico (ADN), el blanco más crítico por su importancia en el desarrollo y funcionamiento de la célula. Al tipo de interacción de la radiación que tiene lugar en el núcleo de la célula afectando principalmente el ADN y sus funciones, se le conoce como acción directa. Este proceso es dominante en las radiaciones de alta transferencia de energía lineal (LET), como las partículas α y neutrones. El ADN se encuentra en todas las células y se compone de moléculas que determinan la función que realiza cada una de ellas. Por lo tanto, la ionización y/o excitación del ADN, puede ocasionar cambios funcionales o estados irreversibles de inactividad (senescencia), inducir incluso carcinogénesis, así como la muerte celular y/o la inhibición de la capacidad mitótica de la misma, justo lo que ocurre en los linfocitos al irradiar con 25 Gy.

2.2.1.1 Efecto Químico. Probabilísticamente, la radiación tiene mayores posibilidades de interactuar con la molécula del agua por su abundancia en el citoplasma. El rompimiento de los enlaces químicos de la molécula del agua debidos a acción de la radiación, se conoce como radiólisis del agua, y es mejor conocido como efecto químico, de ionización o de acción indirecta. El efecto químico consiste en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como electrones, iones de hidrógeno ($H\bullet$) (Barr et al, 1959; Collinson, E. et al, 1962), radicales hidroxilo ($\bullet OH$) (Ferradini, C. et al., 1999), ion hidronio (H_3O^+), dihidrógeno (H_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Bonet-Maury, P. et al., 1948), que son altamente reactivas y potencialmente perjudiciales para las células. Las ROS puede interactuar con cada molécula ya sea en el entorno intra o extracelular, modificando su estructura y por lo tanto su función. En este sentido, se han realizado estudios de dos aspectos diferentes de la interacción de la radiación con la materia: la evaluación y vigilancia de los precursores de las ROS y sus productos a nivel bioquímico (Lyng FM et al, 2001), así como la observación macroscópica y determinación cuantitativa del deterioro celular ocasionado (Cabiscol, E. et al., 2010). En los linfocitos estos aspectos se ha discutido ampliamente, e incluso se han relacionado con fenómenos morfológicos de destrucción, probablemente posteriores a la radiólisis, como el aumentado del volumen celular, así como la fragmentación nuclear y citoplásmica directamente relacionados con aumentos de potasio intracelular, pérdida de la permeabilidad de la membrana y sobreexpresión de p53 (Santacruz-Gómez K. et al., 2013).

Es importante mencionar que, pese a la clasificación excluyente, la ionización también puede ser generarse con fuentes de radiación no ionizante. Cuando esto ocurre debido a la incidencia de luz o radiación ultravioleta (UV) es conocido como efecto fotoquímico (Al Dunne et al., 2003), y depende de algunos factores como la potencia, la longitud de onda y la energía. De esta manera, el efecto químico si ocurre en radiaciones no ionizantes, aunque en mucho menor escala. En cambio, en las radiaciones no ionizantes domina otro tipo de efecto en la materia conocido como fototérmico.

2.2.2. Láseres. Un tipo de radiaciones no ionizantes. Las radiaciones no ionizantes son de tipo electromagnético y engloba las radiaciones ópticas (UV, visible e infrarrojo (IR)) y los campos electromagnéticos (microondas y radiofrecuencias). Estas son incapaces de romper enlaces en las moléculas, por lo que el efecto biológico es menor que en las radiaciones ionizantes.

Las fuentes de luz se perfilan como excelentes herramientas en las técnicas de mediciones y escaneo, además, recientemente se consideran piezas claves en las terapias fototérmicas, particularmente los láseres. El término láser corresponde a las siglas en inglés de “light amplification by stimulated emission of radiation” (amplificación de luz por emisión estimulada de radiación) y se refiere a cualquier dispositivo que utiliza un efecto de la mecánica cuántica, de emisión inducida o estimulada, para generar un haz de luz coherente de un medio adecuado y con el tamaño, la forma y la pureza controlados. Los láseres constan de un medio activo capaz de generar dicha luz. Hay cuatro procesos básicos que se producen en la generación del láser, denominados bombeo, emisión espontánea de radiación, emisión estimulada de radiación y absorción. En el láser el bombeo puede ser eléctrico u óptico, mediante tubos de flash o luz. Puede provocarse mediante una fuente de radiación como una lámpara, el paso de una corriente eléctrica, o el uso de cualquier otro tipo de fuente energética que provoque una emisión. Las energías no ionizantes, como el láser, provocan efectos mecánico, fotoquímico (como se explicó anteriormente), pero principalmente fototérmico en los tejidos.

Efecto Fototérmico. Cuando la energía de radiación de un haz láser incide en la materia, esta es absorbida y se transforma en calor causando el efecto térmico (Thomsen S., 1991). Para la mayoría de las aplicaciones biológicas, incluso los incrementos moderados de temperatura (menores de 5 °C) podrían modificar la bioquímica, dinámica molecular y la función esencial de la maquinaria de la célula viva (Wetzel et al., 2011). Por su parte, si los incrementos de temperatura inducidos por láser son graves, probablemente se alcanza el nivel citotóxico, 43 °C, y con ello la promoción de la apoptosis o necrosis (W. Fiers et al., 1999).

Con la creciente tendencia de utilizar técnicas espectroscópicas que involucran el uso de láseres para enfocar o excitar muestras biológicas, ha crecido el interés de los investigadores por estudiar a fondo la interacción de estas radiaciones en el tejido vivo. Tal es el caso de la espectroscopia Raman (Yu-Chung Li et al., 2012), microscopia de fuerza atómica (S. Dorobantu et al., 2012), espectroscopias de fluorescencia (L. Maestro et al., 2010), entre otras. Un claro ejemplo de generación del efecto fototérmico en muestras biológicas es el uso de pinzas ópticas. Las pinzas ópticas o trampas ópticas (optical trapping, optical tweezer) consisten en una implementación experimental que combina la microscopía con láseres altamente enfocados para atrapar un objeto. Es conocido que los campos electromagnéticos poseen momento lineal y angular y que estos al interactuar con la materia generan fuerzas y gradientes sobre las mismas. Por lo tanto, cuando un haz de láser es enfocado mediante una lente de alto número de apertura, se genera un gradiente de campo electromagnético que al interactuar con una micro o nano partículas permite atraparlas en las regiones de máxima intensidad

(Neuman K.C. et al., 2004). Esta posibilidad de capturar partículas con láseres es lo que da nombre al dispositivo. Las trampas ópticas se utilizan durante mucho tiempo en la manipulación de muestras biológicas (Liu Y. et al., 1995; Chapman, B. J. 1995; Peterman E. J. et al., 2003; H. Mao et al., 2005), sin embargo, es hasta hace poco que ha considerado la absorción de carga térmica en las muestras como un posible efecto secundario indeseado. En este sentido, el incremento de la temperatura en el medio circundante de la trampa óptica puede afectar a las propiedades mecánicas del sistema bajo investigación, dando lugar a sesgos en la interpretación como errores en la determinación de las propiedades de análisis.

Los efectos ocasionados por aumentos en la temperatura de las células se asocian comúnmente con la desnaturalización irreversible de las enzimas. En la actualidad, estudios recientes han determinado que la hipertermia produce la ruptura de la membrana celular, dañando severamente su estructura y originando la muerte de la célula, por ende, la termo-estabilidad de la membrana celular es un factor importante en la tolerancia a la temperatura alta (Rahman et al., 2004). Desde el punto de vista bioquímica, si la temperatura celular aumenta disminuye la viscosidad del citoplasma y con ello aumenta la fluidez con que se mueven los iones a través de los canales de la membrana. Este desorden crea un estado hipotónico si las concentraciones de iones son mayores en el exterior de la célula, dejando al citoplasma con una ganancia neta de agua, y por lo cual tiene a hincharse (Karp Gerald, 2010). Este fenómeno de aumento del volumen celular, aunque probablemente siguiendo distintas rutas bioquímicas, también ha sido observado como consecuencia del efecto químico, tal y como se describió anteriormente (K. Santacruz-Gomez et al., 2013).

De esta manera, se han reportado investigaciones del estudio de la influencia de factores mecánicos, eléctricos y químicos en la célula (Moroz V. et al., 2010), y aunque muchos de estos efectos coincidan en algún punto, no existen criterios unificados para evaluarlos más allá de los efectos cualitativos. Muchos de estas dudas han intentado resolverse con la ayuda de nanopartículas.

2.3 Nanomateriales en Aplicaciones Biológicas

Las nanopartículas (NPs) se han convertido en el objeto de estudio de mayor interés científico en los últimos años. Esto se debe a que las partículas con dimensiones de 1×10^{-9} m (1 nm) presentan propiedades ópticas, magnéticas y mecánicas únicas y totalmente diferentes a las del mismo material en bulto. De esta forma, manipulando el tamaño y la forma de la NP se ha logrado controlar y/o ampliar dichas propiedades a conveniencia. Recientes investigaciones se enfocaron en estudiar a las NPs en medios biológicos (intra-extracelular, molecular y de sistemas), debido a sus aplicaciones como trazadores y transportadores dentro de los sistemas. Por su parte, de acuerdo a las características del material que las componen, las NPs se pueden considerarse semiconductoras, dieléctricas o metálicas. En este capítulo, y para fines de este trabajo de tesis, se describirán los nanodiamantes y los puntos cuánticos.

2.3.1 Nanodiamantes. Los diamantes son estructuras de carbono altamente puras, con propiedades ópticas únicas. Nutualmente, se forman en lugares donde el carbono ha sido sometido a grandes temperaturas y altas presiones. Sin embargo, estos pueden ser sintetizados por medio de explosiones en las que se somete a los átomos de carbono, a nanoescala, a presiones y temperaturas muy altas creando los nanodiamantes (NDs). Los Nds Tiene una estructura cristalina extremadamente rígida, por lo que puede ser contaminada por pocos tipos de impurezas, como el boro y el nitrógeno. El defecto más común en este material es conocido como centro vacante de nitrógeno (NV). Un centro NV consiste en dos posiciones adyacentes de la red cristalina del diamante que en lugar de contener dos átomos de carbono contienen un único átomo de nitrógeno, quedando la otra posición vacante. Dicho de otra manera, un átomo de nitrógeno tiene cinco electrones de valencia. Tres de ellos unidos a los átomos del carbono con enlace covalente, mientras que los dos que permanecen no unido son llamados par solitario. La vacancia tiene tres electrones no apareados. Dos de ellos forman un enlace covalente y uno permanece casi sin pareja. La simetría general, sin embargo, es axial (trigonal C3V). Imaginariamente se pueden recrear los tres electrones desapareados vacantes continuamente intercambian sus roles (fig. 6). Los centros NV más estudiados son el neutro N-V⁰ y negativo NV⁻ (Davies et al., 1976; Iakubovski K. et al., 2000; Felton S. et al., 2008). El centro NV⁻ tiene una carga eléctrica de -1 y dos valores de espín: un espín nuclear que puede ser I=1 para el nitrógeno⁻¹⁴ o I=1/2 para el nitrógeno⁻¹⁵, y un espín electrónico S=1, por el mismo electrón extra que le da la carga y los radicales que quedan por los enlaces covalentes rotos. En cambio, los centros N-V⁰ tienen un electrón desapareado y es paramagnético. Estos defectos le confieren características luminiscentes únicas a los NDs.

A nivel biológico, Sin embargo, existen argumentos importantes para proponer el uso de NPs a base de carbono, especialmente los nanodiamantes, como excelentes matrices para aplicaciones biológicas. Innumerables estudios consideran a los NDs fuertemente biocompatibles y con nula citotóxicos (Schrand M. A et al, 2007; Schrand, AM, et al, 2010), considerando en ello que su interacción con la membrana no influye en sus funciones o estructura (K. Solarskaa *et al.*, 2012). Sin embargo, esto depende de las característica específica tales como la estructura, forma y tamaño de las NPs (K. Solarskaa et al., 2012).

2.3.2 Puntos cuánticos. Las NPs semiconductoras son conocidas como puntos cuánticos (QDs, por sus siglas en inglés quantum dots). Llevan este nombre debido a su propiedad de confinamiento en un espacio bien definido, que les otorga propiedades ópticas y eléctricas que se transforman con la presencia de un solo electrón. Estas NPs son cristales inorgánicos, generalmente con diámetros de 1 a 12 nm, entre los que podemos citar al CdSe, CdS, CdTe o las estructuras híbridas o core-shell como CdSe/ZnS, CdSe/CdS, InP/ZnSe, CdTe/CdSe, entre otras (Bandaranayake R. J. et al., 1995). Estos materiales se caracterizan por absorber energía a cualquier longitud de onda, al ser excitados, incluso mayor que la de su más baja energía de transición logrando un espectro de emisión muy estrecho. Además, la frecuencia de la luz emitida por un determinado QD es

directamente proporcional a su tamaño, de tal forma que es posible sintonizar el color de emisión o longitud de onda variando su tamaño. Dicha característica permite, entre muchas otras aplicaciones, utilizar a los QDs como marcadores luminiscentes y sensores biológicos (Larson L. et al., 2003).

Tal es el caso del CdSe utilizado, por primera vez, para medir los cambios en la temperatura interna de las células HeLa (células epiteliales humanas procedentes de un carcinoma cervical) como nanotermómetros usando microscopía confocal (L. Maestro et al., 2010). La aplicación de los QDs como nanotermómetros se basa en que la temperatura induce un desplazamiento espectral de la banda luminiscente característica de QDs (D. Jaque et al., 2012). Este cambio guarda una relación lineal temperatura dependiente, de modo que se puede utilizar como un indicador de temperatura proporcionando una sensibilidad térmica constante en un amplia área de distribución de temperatura (L. M. Maestro et al., 2012).

En este trabajo se estudiaron el estrés químico y térmico inducido por radiación en células asistido con nanopartículas (NPs).

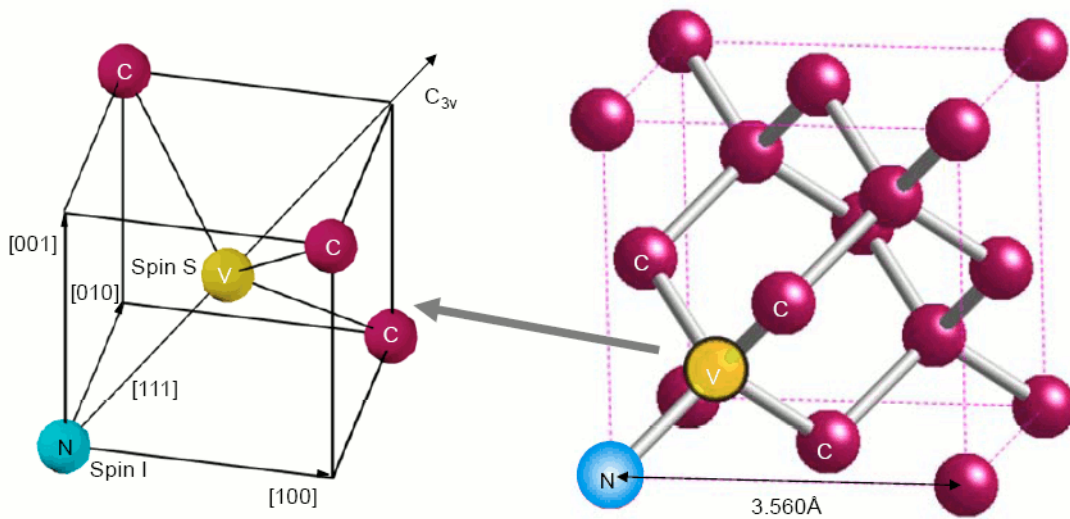


Figura 6. Estructura de un centros NV en nanodiamantes. A la izquierda se destacan las posiciones cristalográficas especiales y la simetría local C_{3v} , a la derecha se muestra la red cristalina del diamante. Se representan los átomos de carbono en rojo, el átomo de nitrógeno en azul y la vacancia en amarillo.

Fuente: Nusran, N. M., Momeen, M. U., & Dutt, M. G. (2011). High-dynamic-range magnetometry with a single electronic spin in diamond. *Nature Nanotechnology*, 7(2), 109-113.

3. HIPÓTESIS.

Es posible utilizar nanopartículas luminiscentes para evaluar los efectos químico (EQR) y térmico (ETR) en células inducidos por radiación.

3.1 Objetivo General.

Utilizar nanopartículas luminiscentes para evaluar los efectos químico y térmico en células inducidos por radiación.

3.2 Objetivos Particulares.

1. Evaluar el efecto químico por radiación ionizante (EQR) en células sanguíneas.
 - a. Evaluar a través de espectroscopia Raman, los estados de oxigenación del eritrocito bajo influencia química por radiación ionizante, utilizando nanodiamantes carboxilados (cNDs)
 - b. Observar a través de microscopía de fuerza atómica (AFM) los cambios morfológicos del eritrocito después de la irradiación ionizante.
 - c. Evaluar la interacción de los cNDs/NDs con los eritrocitos a través de microscopía de fluorescencia y análisis de viabilidad utilizando el colorante de Azul de tripano y el ensayo con sales de tetrazolio (MTT).
2. Evaluar el efecto térmico de la radiación láser (ETR) en células sanguíneas.
 - a. Establecer un suministro controlado de temperatura la temperatura intracelular utilizando CdSe-QDs.
 - b. Determinar la temperatura intracelular utilizando CdSe-QDs.
 - c. Evaluar los cambios morfológicos inducidos por el calentamiento celular.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

La descripción de materiales y métodos se dividirá en dos secciones: la evaluación del efecto químico, y efecto térmico inducidos por radiación.

4.1. Efecto Químico por Radiación.

Para lograr este objetivo, consideramos efecto químico por radiación ionizante como el efecto asociado a la generación de radicales libres, por acción indirecta de la radiación en los eritrocitos. El efecto por radiación ionizante fue asistido con nanodiamantes (NDs), debido su biocompatibilidad probada y sus eficientes señales luminiscentes. En este estudio se utilizaron dos tipos de NDs: unos sintéticos grado G, y otros carboxilados (cNDs) en nuestro laboratorio.

4.1.1. Carboxilación de NDs. Se utilizaron nanodiamantes (NDs) sintéticos por detonación (PL-Nanopure-G-50m) fabricados por Plasma Chem GmbH (Rudower Chaussee 29, D-12489, Berlín). Estos se encontraban en suspensión acuosa al 4% en peso y en un tamaño de 5 nm (tabla I, figura 7). Dichos NDs sintéticos fueron carboxilados de acuerdo al método por exposición en ácidos fuertes descrito por Yu-Chung y colaboradores (Yu-Chung et al., 2006). Una muestra deshidratada de 0.2 g de NDs se calentó a 75°C en una mezcla 9:1 de H₂SO₄-HNO₃ (v/v) durante tres días. Inmediatamente después se llevó a una solución acuosa de NaOH 0.1 M a 90°C durante dos horas, seguido de un tercer calentamiento en solución acuosa de HCL 0.1 M a 90°C por dos horas. Finalmente, se lavó extensivamente con agua deionizada. De los 0.2g de NDs se obtuvieron 1.4381 g de cNDs secos los cuales se resuspendieron en agua deionizada para alcanzar una dilución del 0.04% alcanzando una concentración final de aproximadamente 3.3x10¹⁶ NPs/mL. Igualmente, los NDs sintéticos se diluyeron al 0.04 % con una concentración final de aproximadamente 1.7x10¹⁶ NPs.

4.1.2. Incubación de NPs e Irradiación. Se obtuvo sangre periférica por flebotomía de voluntarios sanos, y fue colectada en tubos anticoagulados con ácido etilen-diamino-tetracético (EDTA). Tanto los cNDs como los NDs sintéticos al 0.04 % fueron incubados en la sangre entera a una concentración de 5 µg/□l, logrando así una concentración aproximada calculada de 6.7x10⁶ cNDs/célula y 3.4x10⁶ NDs/célula respectivamente. Estas muestras fueron irradiadas utilizó un Gammacell 220Excel (GC-220E) con una fuente de Cobalto 60 (⁶⁰Co) a dosis de 10, 20, 25, 30, 40 y 50 Gy.

4.1.3. Separación de GR. Los eritrocitos se separaron por centrifugación a una velocidad de 1500 rpm (250 g) durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado (plasma) y, finalmente se realizaron tres lavados con una solución de Buffer de fosfato (PBS) 0.1 M Sigma Aldrich en concentraciones 2:1 a 4°C a 3400 rpm (1281 g) durante 1 minuto. Finalmente, los eritrocitos (GR, glóbulos rojos) lavados se diluyeron en PBS a una concentración 5:1000 µL (GR:PBS) para obtener una dilución final de aproximadamente 2.5x10⁷ células/mL.

Tabla I. Características químicas del ND Grado G.

NANODIAMANTE GRADO G	
Numero de Stock	PL-Nanopure-G
Tamaño de partícula	4-6nm
Estabilizador	Ninguno
Pureza	>87%
Contenido de cenizas	<6%
Impurezas , peso %	Fe<1.2;Ca+Zn+Cr+Ni+Cu+MN <2
diamantes sin contenido de carbono,% en peso	<6
Superficie de área	290 m ² /g
Potencial Zeta	-50 ±5 eV

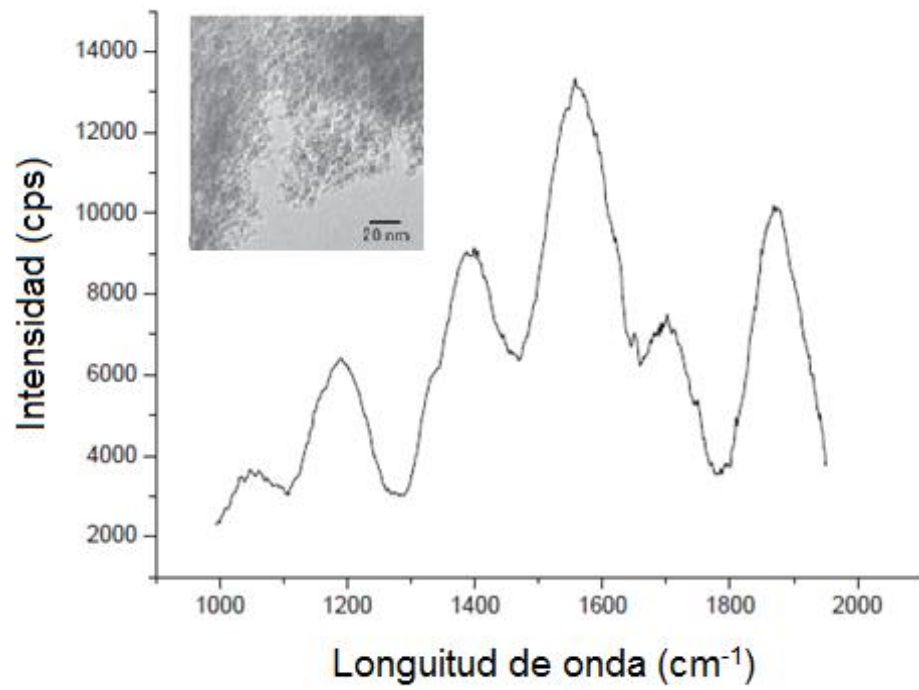


Figura 7. Espectro Raman de los ND Pure Grado G.

4.1.4 Microscopia de Fuerza Atómica. Los escaneos en AFM (anexo 1) se realizaron “en aire” sobre un frotis de la sangre post-irradiada usando el modo no contacto (fig. 8). Este frotis se montó sobre la platina XY que está integrada a una cámara de video utilizada para enfocar la superficie. Para detectar las fuerzas de interacción se utilizó un cantilever de Silicón con una constante de elasticidad de ~1 N/m. La fuerza aplicada a las muestras durante el escaneo fue de 1~10 N/m. Las áreas de barrido fueron de 100X100 μm para cuantificar las células, y de 25X25 μm para observarlas a mayor detalle.

4.1.5. Espectroscopia Raman. Los espectros de Raman (anexo 2) de los GR se registraron en un microscopio Raman confocal LabRam de Horiba Jobin-Yvon utilizando un láser de He-Ne (longitud de onda 632.8 nm y una potencia de 2 mW), y un objetivo de 10x, de acuerdo al diagrama mostrado en la figura 9. Para las mediciones Raman, los eritrocitos se obtuvieron como se explicó anteriormente (ver aislamiento de eritrocitos), y se diluyeron en un volumen de 5:1000 μL . Para la comparación de las muestras con los NDs, estos se suspendieron en PBS (10 mg/mL), se tomaron 5 μL de esta suspensión y se diluyó en 1500 μL de PBS, que a su vez se mezcló con una dilución de eritrocitos-PBS de 1005 μL . Esta última suspensión se colocó en cajas Petri de diámetros de 5 cm, cubriendo la superficie con aluminio para evadir las señales de interferencia del plástico. Los cambios en los estados de oxigenación/desoxigenación procesados con la interacción cNDs con los eritrocitos, se evaluaron en a través de los espectros recogidos en los rangos de 750 a 1800 cm^{-1} , cada 10 segundos, con 3 repeticiones. Los espectros se normalizaron usando el pico de fenilalanina en 1002 cm^{-1} para dar la intensidad integrada.

4.1.6 Interacción GR-cNDs y viabilidad. La interacción de los GR-NDs se observó usando un microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss). El análisis de la viabilidad celular se estimó utilizando azul de Tripano al 0.4 % (Sigma-Aldrich). El azul de tripano es un colorante azoico que se utiliza en tinciones histológicas permitiendo diferenciar células vivas de células muertas. Las células vivas o tejidos con la membrana celular intacta no se colorean debido a que la membrana celular es selectiva respecto a qué compuestos pueden atravesarla (este cromóforo está cargado negativamente). En las células viables, con membrana intacta, no se incorpora el azul de tripano; por el contrario, sí atraviesa la membrana de las células muertas. Por lo tanto, las células muertas se muestran de un distintivo color azul bajo el microscopio.

4.2 Efecto Térmico por Radiación.

Para evaluar el efecto del calentamiento de los linfocitos, inicialmente se estableció un set up que nos permitió incrementar la temperatura de manera controlada. Para tal efecto, se utilizaron nanopartículas de Selenuro de Cadmio (CdSe) como nanocalentadores *in situ* con una excitación externa de 488nm. Una vez establecidos gradientes de temperatura, se evaluó la deformación celular monitoreando dicho proceso en trampas ópticas.

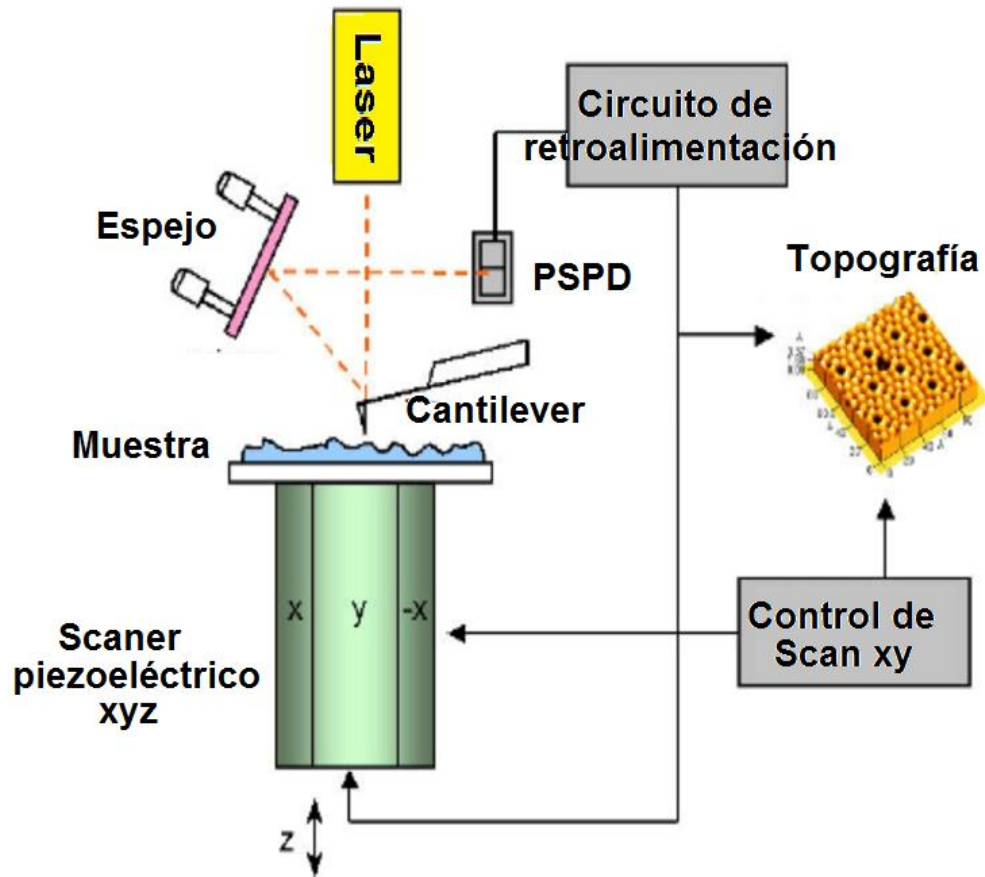


Figura 8. Configuración del Microscopio de Fuerza Atómica.

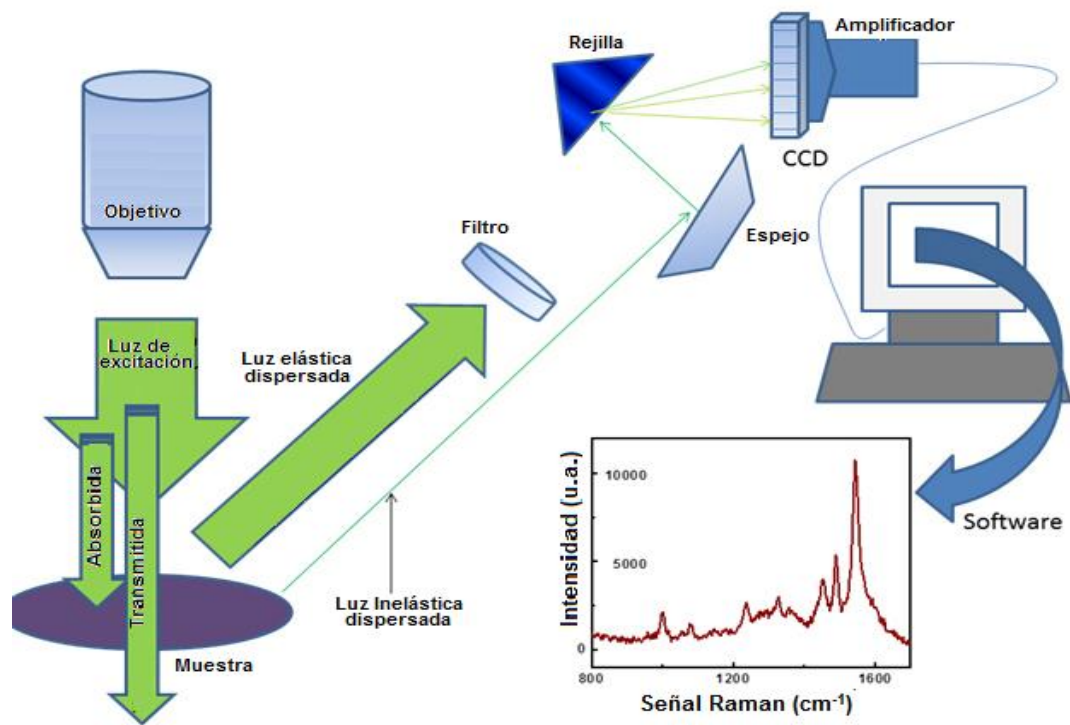


Figura 9. Configuración del espectrómetro Raman.

4.2.1 Incubación de los CdSe-QDs en Células. Los linfocitos se separaron de la sangre entera utilizando una técnica de centrifugación por gradiente llamada Ficoll/Hypaque. La sangre entera obtenida por venopunción se diluyó en 3 solución salina estéril en proporción 1:1. A su vez, se dispersaron 2 mL de la solución Ficoll-Hypaque en un tubo falcón de 15 mL. Se agregaron lentamente 8 mL de la sangre diluida en solución salina en el tubo falcón conteniendo la solución Ficoll. Inmediatamente se inclinó el tubo hasta deslizar la sangre suavemente sobre el ficoll, y una vez formada la interfase se centrifugó a 1500 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de media hora se verificó la formación de las fases de gradiente de densidad: arriba el plasma sanguíneo, abajo la banda de células mononucleares, después el ficoll, debajo de él las células polimorfonucleares y finalmente los eritrocitos aglutinados. Las células mononucleares (linfocitos y monocitos) se extrajeron cuidadosamente utilizando una pipeta Pasteur y se colocaron en un tubo nuevo. Estas células fueron lavadas en una solución total de 10mL de suero fisiológico y se centrifugaron durante 10 minutos 1500 rpm a 4°C utilizando freno al final, esto se realizó dos veces. Finalmente se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en un tubo eppendorf en 4 mL de medio completo de DMEM 1% y se dejaron incubando durante 2 horas a temperatura ambiente en presencia de CO₂.

Los CdSe cuánticos (QD-CdSe) utilizados en este trabajo se compraron a Invitrogen Inc., con dimensiones aproximadas de 4 nm de diámetro. Se realizó una dilución 1:1 (2.5 mL) de linfocitos en medio de cultivo DMEM (por sus siglas en inglés, Dulbeccos modification of Eagles medium) suplementado con piruvato de sodio (100mg/mL), glutamina (292mg/L), bicarbonato de sodio (2500mg/L) y suero fetal (10%). Se realizó una suspensión de QDs de 1:100 (7.5 µL de QDs en 750 µL de dilución celular) logrando una concentración final de aproximadamente 2.4×10^{14} NPs/mL. Estas NPs fueron incubadas en linfocitos durante 2 horas a temperatura ambiente en presencia de CO₂. Estos linfocitos se dispersaron en medio de cultivo DMEM a una concentración final de aproximadamente $1 \times 10^9 \text{cm}^{-3}$. Esos se distribuyeron aleatoriamente en la muestra, como se puede observar en la figura 10.

4.2.2. Atrapamiento Óptico: Calentamiento Celular. La solución acuosa con linfocitos y CdSe se inyectó dentro de una microcámara (Ibidi cells in focus, Germany) de 130µm de espesor constituida por dos portaobjetos de microscopio apilado con una etiqueta circular de 4 mm de diámetro. La microcámara se colocó en un microscopio de doble haz como se muestra esquemáticamente en la figura 11. Se utilizaron dos fuentes diferentes de láser para generar la trampa óptica, dos fibras monomodo junto al diodo láser con 820 y 980 nm. La radiación láser que sale de la correspondiente fibra monomodo (SMF) se colima mediante un puerto de fibra (Thorlabs PAF-X-7-B, CL). El haz colimado se amplió mediante el uso de un haz expander de 2X (Thorlabs BE02M, TL) que resulta en un diámetro de haz de 2 µm. Esto coincide con la abertura posterior del objetivo 100X utilizado a una distancia de 0.8 NA, utilizado para crear el campo de captura en la microcámara. El atrapamiento de la célula fue evidente cuando la potencia del láser superaba los 20 mW, para todas las longitudes de onda de capturas utilizadas en este trabajo.

La excitación de luminiscencia de los QDs fue proporcionada por láser de Argon (Ar) con una longitud de onda de 488 nm. Esta radiación se centró en la microcámara con un otro objetivo del microscopio (50X, 0,55 NA).

Este segundo objetivo estaba perfectamente alineado con respecto a la longitud de onda de captura de modo que tanto la colocación de trampas y los 488 nm se solapaban espacialmente. La energía del láser del Ar llegaba a la microcámara con una potencia por debajo de 4 mW de modo que los efectos térmicos asociados con esta radiación pueden ser despreciados. La fluorescencia generada por los QDs-CdSe se recogió por el mismo objetivo emplean para el láser de 488nm de enfoque. Después de pasar a través de diferentes filtros y aberturas, esta luminiscencia se analizó espectralmente por medio de un espectrómetro de alta resolución. Para la obtención de imágenes, la microcámara se iluminó con una fuente de luz blanca, LED que fue enfocada por el objetivo del microscopio 50X. La luz blanca transmitida se recogió del objetivo del microscopio 100X y la imagen en una cámara CCD.

4.2.3. Determinación de la temperatura intracelular. A partir del análisis de los espectros de emisión, se determinó la distribución de temperatura en 2D, punto por punto, alrededor de la trampa óptica. Es importante señalar que los experimentos ópticos de captura se llevaron a cabo a 22°C de temperatura ambiente. La temperatura se calculó con la siguiente ecuación $T = (Sf - Sf0) / 0.11$. Dónde Sf representa el shift de emisión de los QDs, Sf0 la emisión sin láser y 0.11 nm/°C equivale a la constante de temperatura de los QDs. Para convertir la intensidad del láser (mA) en poder (mW) se utilizó la siguiente ecuación $P = -20 + (0.43 * Sf)$.

4.2.4. Evaluación del grado de deformación de las células calentadas. Una vez generado el atrapamiento, los linfocitos fueron capturados individualmente y monitoreados a las temperaturas dadas durante 10, 20, 30, 40 y 50 minutos. En general, se consideró la magnitud de la deformación como una función del tiempo debido a la naturaleza viscoelástica de la célula. Por esta razón se utilizó el *Aspect ratio* (AR) (Chen *et al.*, 2011). Este se define como el diámetro mayor de la célula dividido en el menor. En este caso, como el linfocito en condiciones saludables tiene forma circular, su AR es de 1 ± 0.05 .

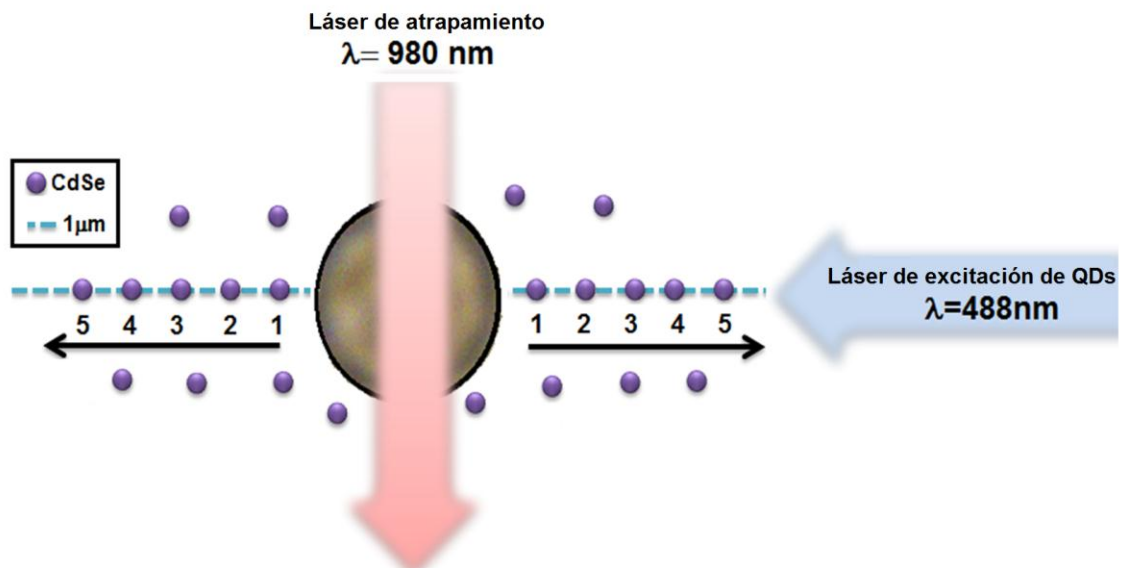


Figura 10. Esquema de medidas termoluminiscentes. Se recogieron 10 espectros de emisión de los QDs (CdSe) en torno a la célula atrapada, con una distancia del orden de $1 \mu\text{m}$: cinco a la izquierda y cinco a la derecha. Se utilizó un láser de Argón ($\lambda = 488 \text{ nm}$) como fuente de excitación.

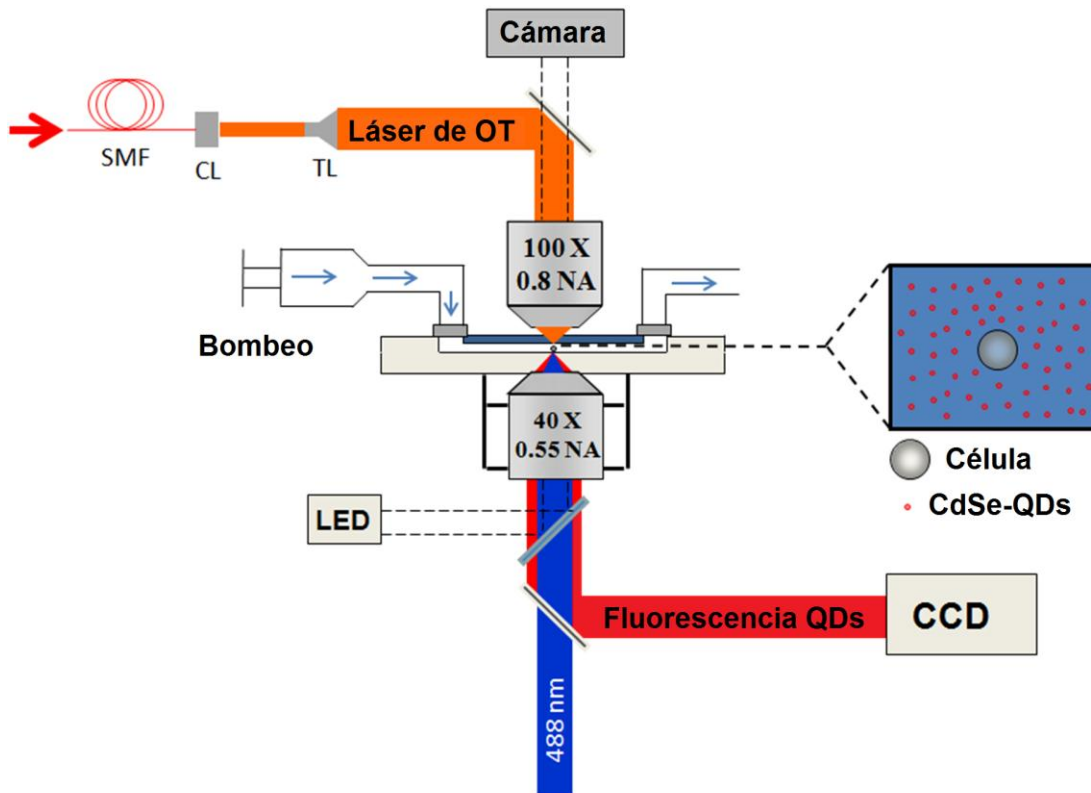


Figura 11. Esquema del microscopio de fluorescencia doble haz. La sección superior del microscopio permite múltiples longitudes de onda de captura. La sección inferior proporciona detección térmica en la trampa óptica por el análisis espectral de la fluorescencia generada por los QDs-CdSe que se han suspendido en la solución acuosa que contiene las células ópticamente atrapados. La solución mixta que contiene tanto los CdSe como las células.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. Evaluación del efecto Químico por Radiación (EQR). El EQR es tradicionalmente asociado a la generación intracelular de radicales libres, lo que puede conducir a estrés oxidativo. Diversos estudios han investigado el detrimento de las células inducidos por las radiaciones ionizantes (LN Button et al., 2003; Santacruz-Gomez et al., 2012; N. Li et al., 2012). Para lograr este objetivo se utilizaron NDs y cNDs para evaluar las alteraciones morfológicas y los estados de oxigenación de los GR en estrés ionizante.

5.1.1. Estados de oxigenación de los GR asistida con cNDs. Para evaluar los estados de oxigenación en estrés ionizante se utilizaron NDs y cNDs. Estas fueron incubadas en los eritrocitos como se explica en la sección anterior del apartado metodológico, y se evaluaron los modos vibracionales de la Hb relacionadas al Oxígeno. En la figura 12 se muestran los espectros Raman promediados obtenidos *in vitro* de GR después de irradiar a 25 y 50 Gy, asistidos con NDs y cNDs respectivamente. Se pueden observar tres regiones del espectro cuyos cambios notables de intensidad están perfectamente relacionados con los estados de oxigenación reportados previamente (25). El estado de la DesoxiHb con bandas a $1580-1610\text{ cm}^{-1}$, asociado a la forma taur (T) o estado tenso de la Hb, que tiene baja afinidad por el oxígeno y por el hierro de alto spin ($S=2$; Fe^{2+}). El estado Oxi-Hb relacionado a la configuración relajada de la Hb, estado R, presentan una banda sensible (anillo de pirrol estiramiento medio, vibración ν_4). Además, una tercera región con un pico a 755 cm^{-1} , considerada como un estado de oxigenación independiente de la Hb, el cual es usado como referencia para estimar el grado de oxigenación. Las bandas características de DesoxiHb reportadas, coincidieron con el pico encontrado a 1604 cm^{-1} cuya intensidad fue más significativa en los GR después de 50 Gy de radiación γ con respecto a las muestras sin irradiar. Contrariamente, la banda localizada a 1580 cm^{-1} no mostró ningún cambio importante entre las muestras irradiadas. Estas diferencias son probablemente atribuidas a las ROS generada por la radiación. Para los estados de oxigenación los picos más característicos reportados por Yu-Chung Li y colaboradores se encuentra en los rangos de $1638-1640\text{ cm}^{-1}$ y $1586-1588\text{ cm}^{-1}$ (tabla II). Sin embargo, bajo la influencia del estrés ionizante, solo observamos las señales a 1588 cm^{-1} con una relación de intensidad directamente proporcional a la dosis, y a 1224 cm^{-1} que no aparece en las muestras irradiadas a 50 Gy. Por otra parte, la señal Raman a 755 cm^{-1} se observa en todas las muestras con mayor intensidad en aquellas de mayor dosis de irradiación. Estos resultados son consistentes con M. Okada y colaboradores, quienes informan aumentos en la intensidad máxima del pico 755 cm^{-1} y lo atribuyen a la liberación de citocromo C asociado con la apoptosis. Esta respuesta corresponde a un modo de vibración de respiración pirrol independiente en estado de oxigenación Hb, por esta razón no nos indica cambios conformacionales de la Hb, pero en nuestro estudio se revela como un marcador ideal para las indicarnos grados de desoxigenación por ionización. En la figura 13 podemos observar el espectro raman de los eritrocitos sin irradiar y sin nanoparticulas.

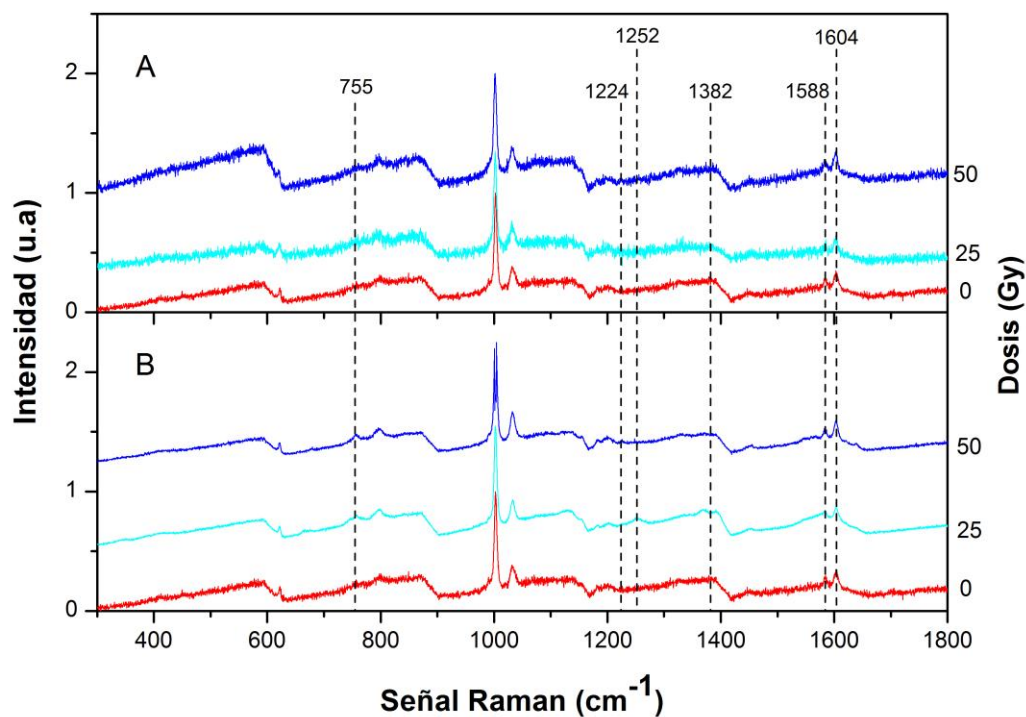


Figura 12. Espectros Raman promediado de GR después de la irradiación. Se observan los RBC sin NPs en rojo, y aquellos incubados con NDS y cNDs en azul. Los estados de oxigenación se encuentran remarcados. Las líneas punteadas representan las señales del espectro Raman asociados con los estados oxigenados del GR. A (NDS), B (cNDs).

Tabla II. Modos vibracionales Raman activos en los Eritrocitos (GR).

Descripción	Raman shift* (cm-1)	Modos de vibración	GR	25Gy	50 Gy
Deoxi-Hb (Fe ²⁺ , S=2)	1606-1610	V ₁₀	1604	1604	1604
	1580-1582	V ₃₇	1588	1588	1588
	1544-1547	V ₁₁	-	-	-
	1210-1215	V ₅ + V ₈	1203	1203	1205
Oxi-Hb Fe ³⁺ , S=1/2	1636-1640	V ₁₀	-	-	-
	1562-1565	V ₂	-	-	-
	1358-1372	V ₄	1382	1382	1382
	1245-1259	V ₁₃	-	1252	-
	1224-1226	V ₅ +V ₈	1224	1224	-
Hb-indep	755	V ₁₅	755	755	755

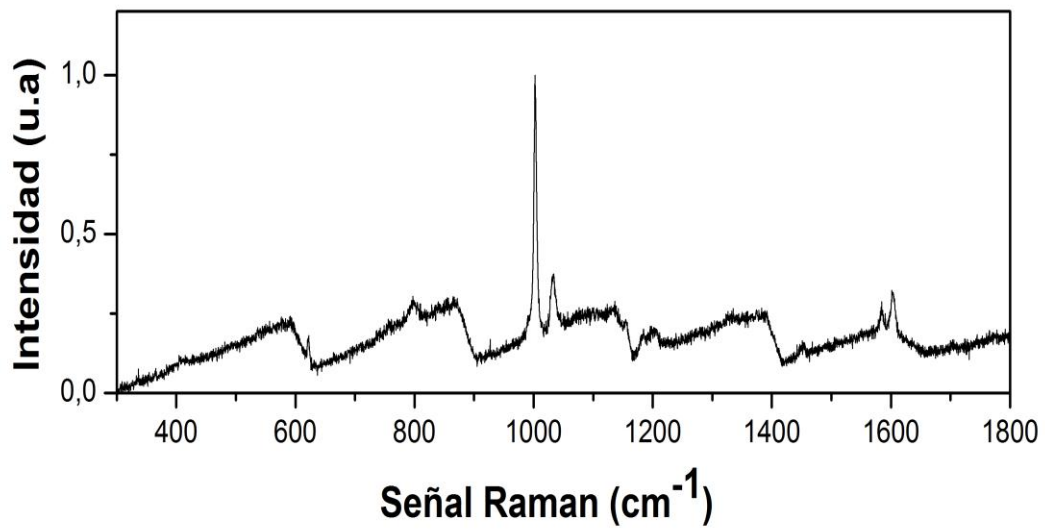


Figura 13. Espectro Raman de eritrocitos Control (sin irradiar y sin nanoparticulas).

5.1.3. Alteración de la membrana celular por efecto químico por radiación. El eritrocito tiene forma bicóncava que permite apreciar una palidez central, que en condiciones normales abarca una tercera parte de su diámetro. Las muestras irradiadas mostraron alteraciones significativas en la distribución del oxígeno. Considerando lo anterior, hemos detectado dos tipos de anomalías morfológicas en los eritrocitos que se reflejó en la aparición de células diana e hipócromicas. En la figura 14 se pueden observar eritrocitos con acumulación de Hb en el centro de la zona pálida, aspecto mejor conocido como células diana, las cuales fueron observadas principalmente a dosis de 25 Gy. Este tipo de células adoptan dicha configuración debida al exceso relativo de membrana secundaria o la disminución de la concentración de hemoglobina. En la práctica clínica, las células diana pueden observarse en patologías como talasemia, anemias por deficiencia de hierro, después de esplenectomía, en hemoglobinopatías y en las enfermedades de obstrucción hepática. El segundo tipo de deformación encontrado le da el nombre a los eritrocitos de hipocrómicos. Estos GR se caracterizan por presentar una palidez central mayor a la tercera parte del diámetro celular. La hipocromía indica que la concentración de hemoglobina corpuscular está disminuida como resultado de un defecto en la síntesis de Hb. En consecuencia, se aprecia hipocromía en anemia por deficiencia de hierro, talasemia, anemia sideroblástica y algunos síndromes mielodispásicos (Miale JB, 1982). En las muestras irradiadas, se observó la hipocromía en GR a 50 Gy, y esto se acompañó aumento del volumen celular. Ambas anomalías se caracterizan por niveles de Hb intracelular baja.

A su vez, el parámetro más significativo en el análisis del efecto ionizante por radiación es la evaluación de la microestructura celular. Los efectos morfológicos fueron correlacionados con un parámetro denominado relación de aspecto (RA), considerando la división del diámetro celular mayor entre el menor. En la figura 15 se muestran las variaciones del AR en función de la dosis de radiación aplicada en eritrocitos. Podemos observar una asociación lineal directamente proporcional a la dosis de irradiación, teniendo un máximo de 1.25 en las muestras irradiadas a 50 Gy. Sin embargo, las deformaciones observadas en los eritrocitos de manera general, fueron mucho menores que las reportadas en linfocitos de sangre irradiada (K. Santacruz-Gomez et al., 2012).

Por su parte, en los GR incubados con cNDs y NDs sólo se encontraron alteración significativa en su relación de aspecto después de 40 Gy de irradiación en comparación con los GR sin NPs irradiados lo que sugiere un factor de protección a las deformaciones membranales, especialmente al utilizar cNDs. Esto puede deberse a que los cNDs, al estar funcionalizados se pegan mejor a la membrana celular dada la afinidad electrostática de estas nanopartículas por las proteínas (XL Kong et al., 2005, PH Chung et al., 2006 Kong, X. L. et al., 2010). Con tal interacción, es probable que estas cNDs bloqueen la acción de ionización, y/o puedan neutralizar el ROS, sin embargo, para tal aseveración se requieren más pruebas.

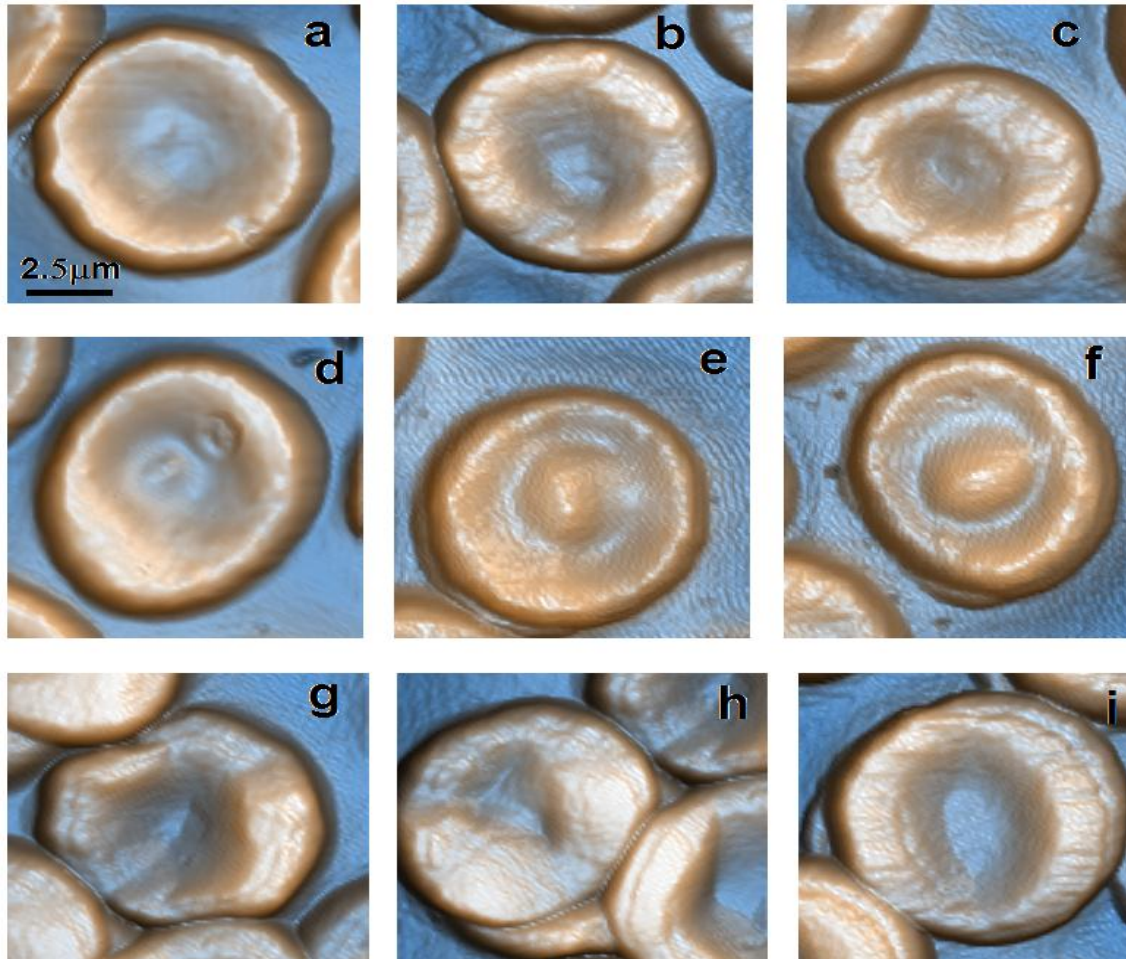


Figura 14. Alteraciones en los GR inducidas por la radiación. GR sin NPs con dosis de 0 Gy (a), 25 Gy (d) y 50 Gy (g); GR con cNDs sin irradiar (b), a 25 Gy (e) y 50 Gy (h); GR con NDs sin dosis (c), a 25 Gy (f) y 50 Gy (i).

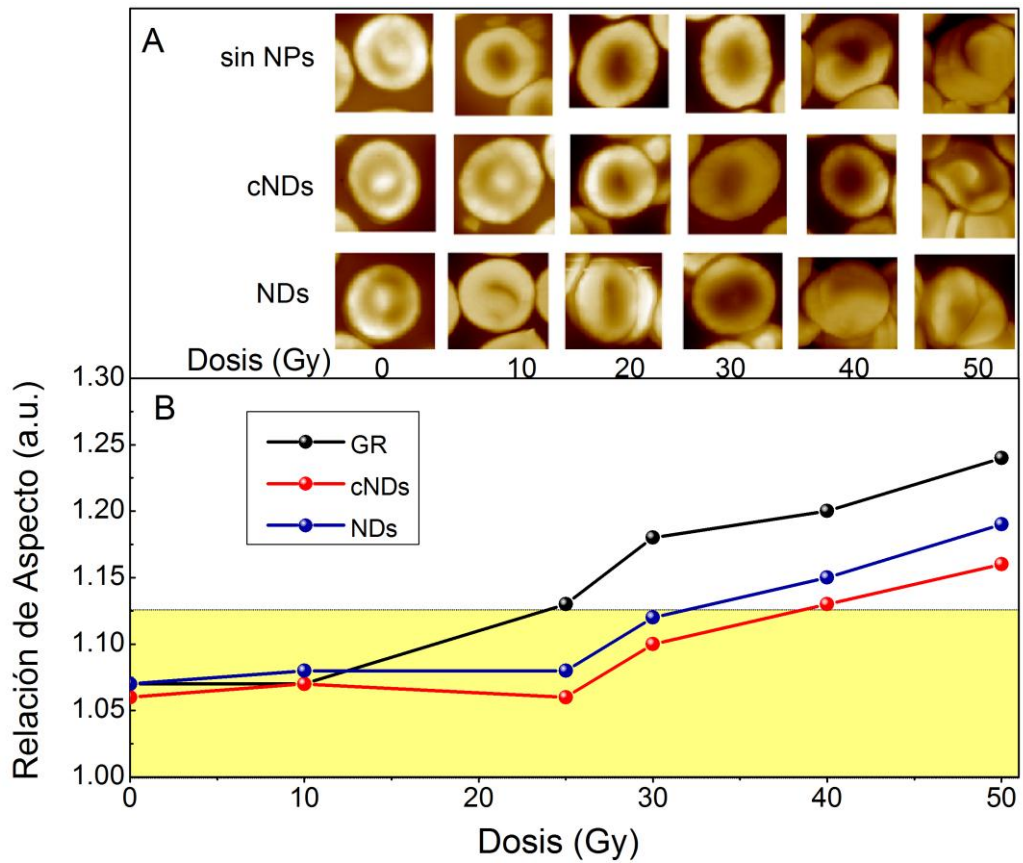


Figura 15. Relación de aspecto en GR durante EQR. Se observa una serie de imágenes ópticas de la morfología eritrocitaria a distintas dosis (A). Se puede notar el incremento directamente proporcional de la RA de los eritrocitos con respecto a la radiación γ (B).

Este menor grado de deformación de los eritrocitos con respecto a los linfocitos, se debe a la capacidad inherente de resistir la radiación de una célula con respecto a la otra, mientras que el linfocito es la célula más radiosensible de la sangre, el eritrocito es en lo opuesto la más radioresistente (Bergonié, 1906). Además, los NDs parecen proferirle mayor resistencia, sobre todo los carboxilados. Esto también se puede evidenciar en la figura 15, donde se observa mayor AR en los eritrocitos sin NDs, iniciando un pico de crecimiento a dosis mayores de 30Gy, proceso que se ve aletargado en los eritrocitos tratados, especialmente en aquellos con cNDs, en los cuales solo a partir de los 40Gy experimentan deformaciones que salen del rango normal (coloreado con amarillo en la misma figura).

5.1.3. Interacción de los GR con los NDs y cNDs: Viabilidad. La viabilidad que resulta de la interacción de GR con los NDs se estimó utilizando la tinción azul de tripan, cuyo principio de acción se describió en la sección de metodología. En la figura 16 se observa que los GR son viables tanto para las interacciones con NDs como con cNDs a las concentraciones manejadas (5 µg/mL) durante 24 horas. Aunque trabajos previos han demostrado que las nanopartículas inducen hemólisis en los eritrocitos (Dobrovolkaia M. A. et al., 2008), también se ha demostrado que esto depende del tipo del tamaño, propiedades de la superficie, así como las condiciones experimentales (Goodman C. M. et al., 2004). Por su parte, como se puede corroborar en la figura 17 en nuestro estudio y a nuestras condiciones no se desarrolló ningún efecto hemolítico, de agregaciones, ni de deformación de los eritrocitos durante el tratamiento.

A su vez, se recogieron imágenes fluorescentes de la interacción de los GR incubados con NDs/cNDs. La fluorescencia intrínseca de los NDs se utilizó para localizar a estas NPs. Se utilizó una excitación de 488 nm, y se recogió en el rango de 491-539 nm. En la figura 18 podemos observar que los cNDs interactúan predominantemente en la superficie de la membrana del GR (fig. 18 a), y tal como indican otros reportes, esta interacción no revela fagocitosis ni endocitosis (Rothe.Rutishauser B. M. et al., 2006). Sin embargo, los NDs revelan menor especificidad reflejada en menor intensidad de fluorescencia, es decir, mala coincidencia de la reconstrucción celular de la imagen fluorescente con respecto a la óptica con respecto a los cNDs, probablemente porque los NDs tienden a aglutinar (fig. 18 b).

5.2. Evaluación del Efecto Térmico por Radiación.

El daño fototérmico tiene lugar cuando, debido a la absorción de medio y componentes de la célula, la carga térmica inducida por láser conduce la temperatura intracelular hasta el nivel citotóxico (> 43°C). A tales temperaturas las proteínas se desnaturalizan irreversiblemente, y se inicia la muerte celular. Para lograr el efecto térmico, se generó una trampa óptica en el medio de cultivo celular utilizando un láser de 980 nm, con potencias de 20 a 250 mW. Como sabemos de experiencias previas, la carga térmica generada en una trampa óptica depende, entre otros factores, de la longitud de onda del láser utilizado, la potencia del mismo y el medio en el que se realice (Takahito N. et al, 2011).

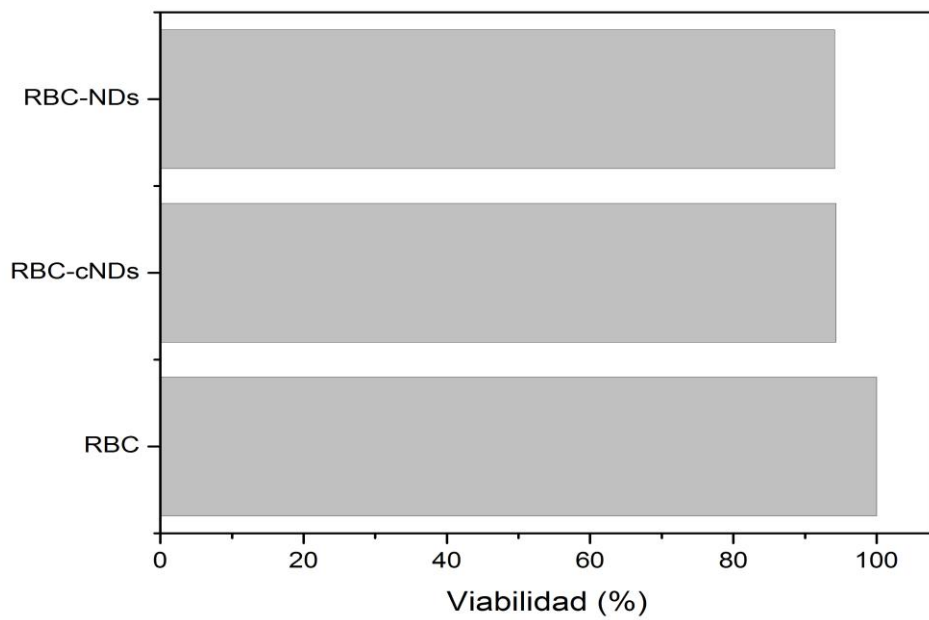


Figura 16. Viabilidad de GR tratados con PBS, cNDs y NDs. La tinción de Azul de triapán revela no citotoxicidad durante un período de 24 horas.

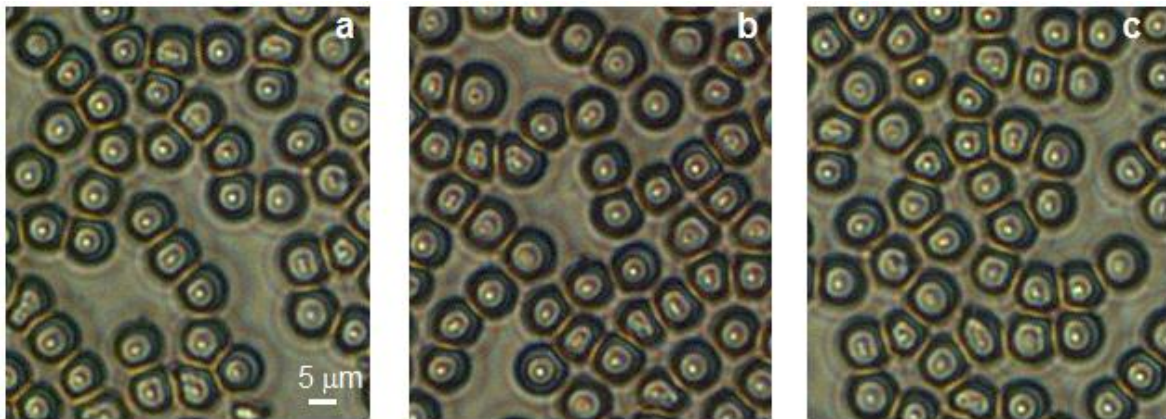


Figura 17. Comportamiento de los cNDs/NDs-GR con PBS. Imágenes ópticas de la interacción en cultivo de los GR sin NPs (a), con cNDs (b) y con NDs (c).

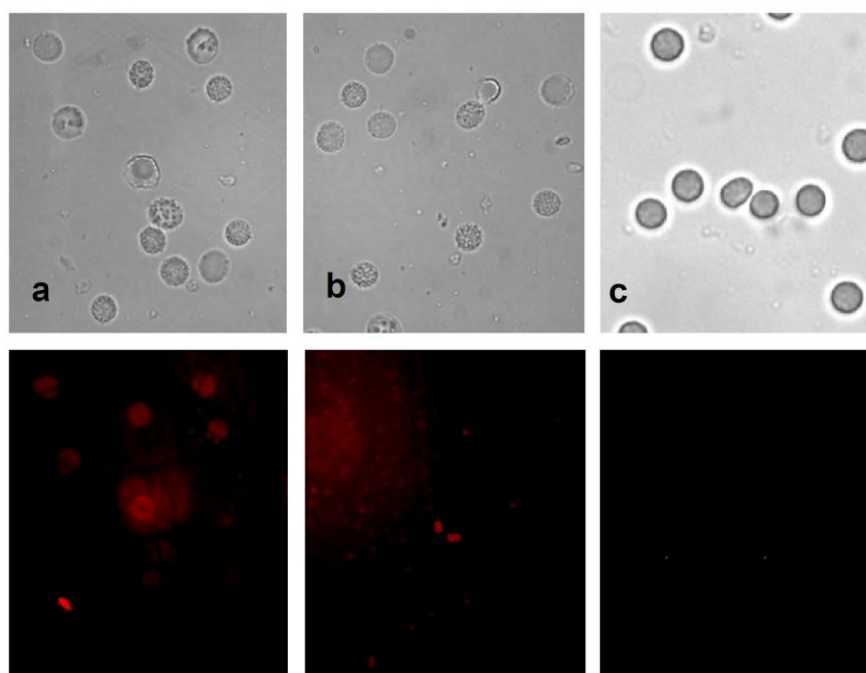


Figura 18. Imagen óptica y fluorescente de los GR en PBS. La fluorescencia de los cND/ND fluorescencia se obtuvo excitando con 488 nm y se recogió en el rango de 491-539 nm.

Para determinar la temperatura exacta a la que se estaban sometiendo dichas células, estas fueron incubadas previamente con CdSe-QDs en el medio de cultivo DMEM, y después fueron atrapadas individualmente de acuerdo a la configuración óptica descrita en las metodologías. Una vez iniciado el atrapamiento, los CdSe-QDs fueron excitados con un segundo láser de 488 nm (que no interfería en lo absoluto con el primer láser) y se recogieron los espectros de esta excitación a diferentes tiempos de atrapamiento (0, 10, 20, 30, 40 y 50 minutos), así como aplicando distintas potencias (20 – 250 mW) y utilizando diferentes láseres (820 y 980 nm).

5.2.1 Determinación de la Temperatura Intracelular: Inducción del efecto fototérmico. En este trabajo se utilizaron QD-CdSe tal como se han propuesto recientemente (L.M. Maestro et al., 2011) como nanotermómetros basados en el desplazamiento del espectro de emisión característico de estos QDs cuando incrementa la temperatura. Así, a partir de la determinación del pico de luminiscencia, es posible obtener una lectura térmica exacta. En efecto, la figura 19 ilustra el principio de funcionamiento de la termometría con CdSe-QD. En dicha figura, se muestran dos espectros de fluorescencia, el primero coincide con el espectro típica de los CdSe-QDs (espectro color negro) obtenido en nuestro ensayo experimental con el láser apagado, es decir, sin atrapamiento óptico. Por su parte, el segundo espectro, que se muestra en rojo, fue obtenido cuando el haz de excitación estaba en el foco de la trampa óptica con una potencia de 270 mW. De la comparación de ambos espectros, es evidente que el incremento en la potencia del láser atrapamiento causado un notable desplazamiento espectral, de 2.3 nm aproximadamente, en la luminiscencia CdSe-QD. Esto confirma un notable calentamiento localizada en el centro de la trampa óptica. Para calcular este incremento de temperatura, se realizó un ajuste lineal de los espectros obtenidos a diferentes potencias, y con ello se obtuvo una velocidad de desplazamiento de la longitud de emisión por cada grado de temperatura aumentada de 0.1 nm/°C.

Para asegurar variaciones en las temperaturas en nuestro efecto Fototérmico, las células se atraparon a diferentes potencias y se graficó la temperatura inducida por el láser en función de estas variaciones. En la figura 21, podemos observar una dependencia lineal de la temperatura sin importar la longitud de onda del láser (820 y 980 nm), sin embargo, mostrando incrementos de temperatura significativos solamente al utilizar el láser de 980 nm. Estos resultados coinciden con el modelo propuesto por H. Mao y colabores, $\Delta T_{trap} = \frac{\alpha_{abs}(\lambda_{trap}) \cdot P_l}{2 \cdot \pi \cdot K} \cdot \ln \left[\frac{D}{w_l} \right]$, y de manera inequívoca indica que el efecto de otros procesos (por ejemplo una formación de burbujas o la creación de curvas de convección) se puede despreciar, al menos para las potencias de captura utilizados en este trabajo. También es evidente que la velocidad de calentamiento de la trampa óptica, es fuertemente dependiente (además de la longitud de onda), de la potencia de atrapamiento

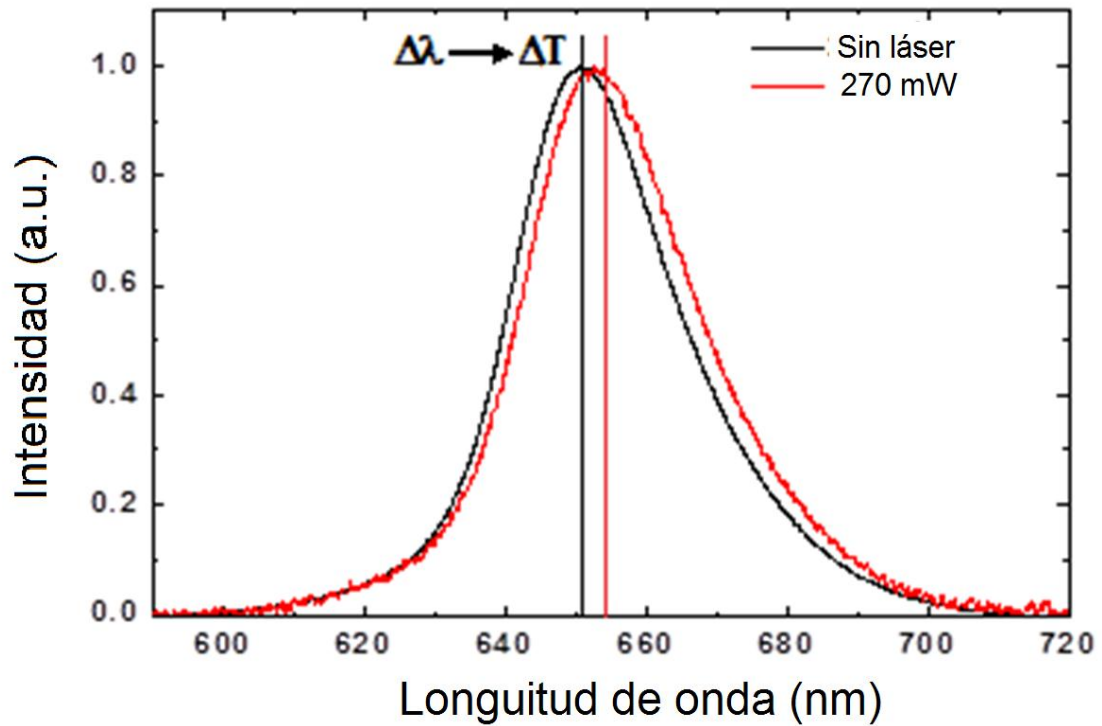


Figura 19. Espectro de emisión de los QDs-CdSe. Obtenidos a partir de dos potencias de atrapamiento diferentes (sin láser y 270mW) con un láser de 980 nm. Aquí se puede notar el desplazamiento del espectro debido al calor generado con la trampa. Con este desplazamiento del espectro se calculó la temperatura.

En este caso el máximo calentamiento registrado fue cercano a los 18°C, y considerando la temperatura ambiente base (23 °C), esto nos daba una temperatura celular local de aproximadamente 41°C, tal como se muestra en la tabla III. Es importante mencionar que este calentamiento se logró cuando atrapamos con una longitud de onda de 980 nm y una potencia mayor de 250 mW. Otra característica importante a resaltar del gradiente de temperatura graficado, es que la velocidad del calentamiento incrementa importantemente después de 200 mW de potencia. La captura óptica individual de los linfocitos se evidenció en la figura 20 A que muestra una serie de imágenes ópticas de una solución de linfocitos cuando se aplicaron velocidades de flujo diferentes, resultando en el movimiento controlado de linfocitos libres (no atrapada). La fuerza de captura aplicada se mostró independiente de la longitud de onda del láser utilizado en el atrapamiento y se estimó cercana a los 70 pN para las potencias máximas de láser utilizado (≈ 300 mW). Por su parte, las velocidades de calentamiento intracelulares encontradas fueron de 3 y 60 nm°C/W para 820 y 980 nm, respectivamente. Así, la termometría intracelular basada en QD reveló que sintonizar la longitud de onda de captura de 980 nm a 820 nm ha dado lugar a una reducción de 20 veces la carga térmica intracelular. En efecto, esta relación está de acuerdo con la consideración de la absorción de agua como la única fuente de calentamiento. Por lo tanto, apoya nuestra hipótesis de que la absorción óptica en el interior de las células y en sus alrededores se administra principalmente por la absorción de agua y valida el espectro de daños fototérmica propuesto.

De acuerdo a los resultados presentados, se observa una buena concordancia entre los datos experimentales y el modelo propuesto por H. Mao y colaboradores que se describió anteriormente. De hecho, los valores obtenidos experimentalmente β_{trap} siguen la longitud de onda y el coeficiente de absorción de agua, término dominante en el producto $\alpha_{abs}(\lambda_{trap}) \cdot \ln[\lambda_{trap}]$ alcanzando un pico de 980 nm donde el agua tiene la máxima absorción. Esto también está de acuerdo con E.J.G. Peterman y colaboradores quienes llegaron a la conclusión de que la carga térmica de trampas láser es causada principalmente por la absorción del disolvente, en este caso del agua o medio celular (E.J.G. Peterman et al., 2003).

5.2.2 Alteraciones en la Morfología Celular: Efecto Fototérmico. Las alteraciones morfológicas se evaluaron a partir de los cambios cualitativos observados en la membrana celular, y su relación de aspecto, tal como se hizo en el efecto químico. Al igual que el caso anterior, estas células al ser circulares y regulares, guardan un AR aproximadamente de 1. La Figura 21 (a) muestra una serie de imágenes ópticas de linfocitos mientras se calentaba con láseres de 820 y 980nm respectivamente, con diferentes potencias de atrapamiento (máximo 259.5mW) y a durante distintos periodos de calentamiento (0-50 minutos).

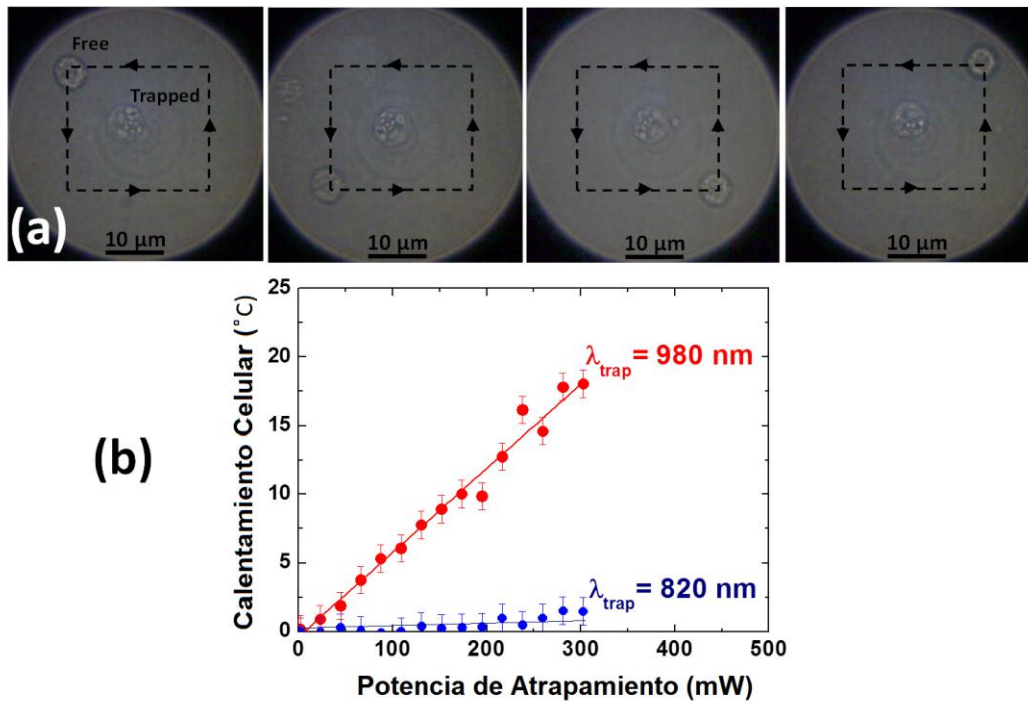


Figura 20. Incremento de temperatura contra potencia del láser. (a) Serie de imágenes ópticas de una solución en microcámara que contiene linfocitos humanos individualmente atrapados con un láser de 980 nm. Observe como los linfocitos, movilizadas por el flujo de corriente (indicado por las flechas) en la microcámara, continúan libres. (b) Incremento de la temperatura intracelular en el linfocito atrapado como una función de la potencia del láser de captura tal como se obtiene para dos longitudes de onda diferentes de captura (820 y 980 nm).

Tabla III. Temperaturas Generadas por Efecto Térmico.

Potencia (mW)	Temperatura (°C)
0	0
20	4.8
50	7.3
100	10.1
150	12.8
200	15.4
250	18.2

Nuestros resultados muestran que, mientras que para el láser de 820nm la relación de AR de los linfocitos atrapados permanece sin cambios, al usar el láser de 980 nm este incrementa casi un 20% después de 50 minutos. Esta deformación celular notable inequívocamente revela la presencia de daño celular fototérmico relevante tal como hinchazón, elongación, rompimiento membranal y posteriormente liberación de contenido intracelular como se observa después de 40 minutos de calentamiento a 4.8 °C. Sin embargo, de cierta manera estos efectos son similares a los inducidos por efecto químico por radiación ionizante, tal como se describe para linfocitos a diferentes dosis de radiación γ en el trabajo de K. Santacruz-Gomez y colaboradores. También esta experiencia se observaron deformaciones membranales muy similares en los eritrocitos, aunque por diferentes procesos bioquímicos, a los cambios observados en células bajo el efecto químico por radiación ionizante, llegando a un punto irreversible en el que los efectos morfológicos fueron exactamente el mismo tanto por efecto de la generación de radicales libres, como el incremento de la temperatura. En general, ambos presentan aumento del volumen celular y deformaciones en la membrana.

En cuanto a la aplicación de los CdSe-QDs como nanosensores, estos resultados demuestran la eficiencia de estas NPs como eficientes nanotermómetros. A su vez, fue demostrado que utilizando un atrapamiento óptico con un láser de 980 nm es posible incrementar la temperatura de una célula individualmente, y controlar el gradiente de temperatura variando la potencia del láser utilizada. En efecto, los QDs ha revelado que 980nm atrapamiento óptico produce incrementos intracelulares temperatura próxima a 20°C. Dado que los experimentos se realizaron a $22\pm 1^\circ\text{C}$ (temperatura ambiente), esto significa que durante 980 nm atrapamiento, la temperatura de la célula debe ser cercana a 42 °C. Contrariamente, utilizado un láser de 820 nm las células no sufren efecto fotoquímico, esto es debido a que el calentamiento generado por el láser es débil, menos de 4°C, según nuestros resultados proporcionados por termometría intracelular basada CdSe-QD. Esta temperatura mínima de calentamiento mantiene el linfocito muy por debajo del nivel citotóxico, asegurando daño celular mínimo. Estos datos no sólo son importantes para la elucidación del mecanismo de calentamiento en trampas ópticas y para la optimización de los experimentos de manipulación células individualmente, sino también para el calentamiento, controlado, de células para un fin específico, incluso para la aniquilación por terapia fototérmica de células malignas.

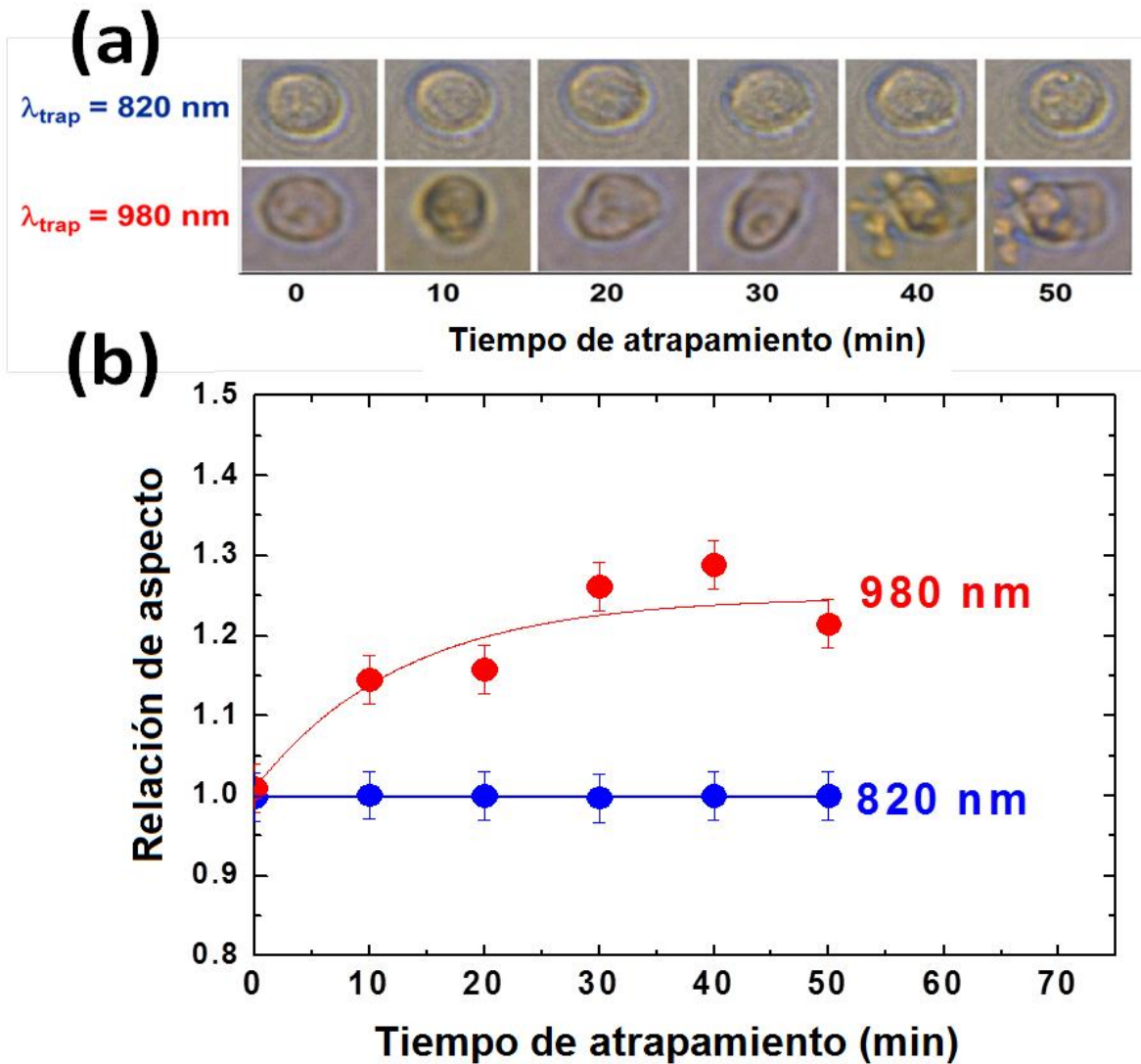


Figura 21. Cambios morfológicos de linfocito durante efecto térmico. (a) Imágenes óptica linfocito individual ópticamente atrapado a través del tiempo para los láseres de 820 y 980 nm. (b) Tiempo de evolución de la relación de aspecto de linfocitos con los mismos láseres.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones de este estudio son las siguientes:

Efecto Químico por Radiación (EQR).

EQR en los estados de oxigenación celular.

- Fue posible identificar estados de oxigenación de los eritrocitos durante EQR empleando espectroscopía Raman.
- La carboxilación de los NDs permitió obtener la información directa de la concentración de oxígeno celular.

EQR en la morfología celular.

- Los cNDs actuaron como un factor protector de las células a partir de dosis de 20 Gy.
- El EQR indujo dos tipos de deformaciones celulares: hipocromía y dianocitosis.

Efecto Térmico por Radiación (ETR).

ETR en la temperatura celular.

- Es posible determinar la temperatura intracelular con la ayuda de NPs semiconductoras (CdSe-QDs).
- El láser de $\lambda = 980$ nm fue el más apropiado para inducir ETR.

ETR en la morfología celular.

- El ETR genera deformaciones celulares en el tiempo, lo que impide desarrollar experimentos de evaluación temporal.
- Las deformaciones celulares durante el ETR son reversibles hasta 20 minutos de atrapamiento (10.1 °C temperatura)

Con estos resultados podemos concluir que Es posible utilizar cNDs como biodetectores de los estados de oxigenación, y los CdSe-QDs como nanosensores de temperatura sin afectar las condiciones experimentales ni la viabilidad celular para evaluar estrés por radiaciones, en el desarrollo de una nueva técnica diagnóstica.

7. FUTURAS INVESTIGACIONES

Presentar estos resultados en una patente de invención donde se desarrolle una nueva técnica diagnóstica para determinar la integridad de las células sanguíneas en patologías como el S. Cushing, *diabetes*, talasemia, etc., relacionadas con deformaciones morfológicas y estados de oxigenación.

Implementar un protocolo de irradiación de tejidos sanguíneos para uso terapéutico empleando la evaluación del EQR como control de calidad.

Iniciar protocolos para determinar la temperatura intracelular e integridad celular basados en ETR con CdSe-QDs durante procesos tisulares de incremento de temperatura (tasa metabólica) tales como proceso de angiogénesis *in vivo*, *in situ* e *in tiempo real*.

Aplicar el ETR (amplificado con NPs) como terapia fototérmica de aniquilación de células cancerosas.

REFERENCIAS

Anderson, R. E., and W. L. Williams. Radiosensitivity of T and B lymphocytes. V. Effects of whole-body irradiation on numbers of recirculating T cells and sensitization to primary skin grafts in mice. *The American journal of pathology* 89:2, 367 (1977).

Anand, A. J., Dzik, W. H., Imam, A., & Sadrzadeh, S. M. H. Radiation-induced red cell damage: role of reactive oxygen species. *Transfusion*, 37:2, 160-165(2003). Barr, N.F.; Allen, A.O.; Hydrogen atoms in the radiolysis of water. *J. Phys. Chem* 63, 928-931(1959).

Bonet-Maury, P.; Lefort, M. Formation of hydrogen peroxide in water irradiated with X- and alpha-rays. *Nature* 162, 381-382 (1948).

Brown, D. M., Donaldson, K., Borm, P. J., Schins, R. P., Dehnhardt, M., Gilmour, P., Jimenez, L. A. and Stone, V. Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286:2, 344-53 (2004).

Barr, N.F.; Allen, A.O.; Hydrogen atoms in the radiolysis of water. *J. Phys. Chem* 1959, 63, 928-931

Bonet-Maury, P.; Lefort, M. Formation of hydrogen peroxide in water irradiated with X- and alpha-rays. *Nature* 1948, 162, 381-382.

Bessis, M. (1973). *Red cell shapes. An illustrated classification and its rationale* (pp. 1-25). Springer Berlin Heidelberg.

Billingham RE, Brent L: Quantitative studies on tissue trans-plantation immunity. IV. Induction of tolerance in newborn mice and studies on the phenomenon of runt disease. *Phil Trans R SocB Biol Sci* 1959; 242:439–477 (1955).

Cabiscol, E., Tamarit, J., & Ros, J. (2010). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology*, 3(1), 3-8.

Chao, J. I., Perevedentseva, E., Chung, P. H., Liu, K. K., Cheng, C. Y., Chang, C. C., & Cheng, C. L. Nanometer-sized diamond particle as a probe for biolabeling. *Biophysical journal*, 93:6, 2199-2208 (2007).

Collinson, E., Dainton, F. S., Smith, D. R., & Tazuke, S. (1962, April). Evidence for the unit negative charge on the "Hydrogen Atom" formed by the action of ionising radiation on aqueous systems. In *Proc Chem Soc* (p. 140).

Chung, P. H., Perevedentseva, E., Tu, J. S., Chang, C. C., & Cheng, C. L. Spectroscopic study of bio-functionalized nanodiamonds. *Diamond and related materials*, 15:4, 622-625 (2006).

Chung, P. H., Perevedentseva, E., & Cheng, C. L. The particle size-dependent photoluminescence of nanodiamonds. *Surface Science*, 601:18, 3866-3870 (2007).

Delaunay, J. (2007). The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders. *Blood reviews*, 21(1), 1-20. CHAPTER 7 – Abnormalities of the red cell membrane. *Blood and Bone*

Eaton, W. A., Henry, E. R., Hofrichter, J., & Mozzarelli, A. (1999). Is cooperative oxygen binding by hemoglobin really understood?. *Nature Structural & Molecular Biology*, 6(4), 351-358.

F. M. Lyng, C. B. Seymour and C. Mothersill. Oxidative stress in cells exposed to low levels of ionizing radiation. *Biochemical Society Transactions* (2001) 29, (350–353) (Printed in Great Britain).

Ferradini, C.; Jay-Gerin, J.P.; La radiolyse de l'eau et des solutions aqueuses: historique et actualité. *Can. J. Chem.* 1999, 77, 1542-1575.

Hutchinson K, Kopko PM, Muto KN, Tuscano J, O'Donnell RT, Holland PV, Richman C, Paglieroni TG, Wun T: Early diagnosis and successful treatment of a patient with transfusion-associated GVHD with autologous peripheral blood progenitor cell transplant. *Transfusion* 2002;42:1567 –1572.

Oberdorster, G., Oberdorster, E. and Oberdorster, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles, *Environ Health Perspect* 113:7, 823-39 (2005).

Okada, M., Smith, N. I., Palonpon, A. F., Endo, H., Kawata, S., Sodeoka, M., & Fujita, K. Label-free Raman observation of cytochrome c dynamics during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:1, 28-32. (2012).

O'Reilly, M., L. McDonnell, and J. O'Mullane. Quantification of red blood cells using atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* 86:1, 107-112 (2001).

Priezzhev, A. V., N. N. Firsov, and J. Lademann. Light scattering diagnostics of red blood cell aggregation in whole blood samples. *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics*, VV Tuchin, ed., SPIE Press, Bellingham, USA (2002): 651-674.

K. Santacruz-Gomez, R Melendrez, C Castaneda, M Barboza-Flores, M Pedroza-Montero. Viability of Lymphocyte of Gamma Irradiated Blood. *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering* 31-33 (2012).

K. Solarskaa, A. Gajewskaa, W. Kaczorowskib, G. Bartosza, K. Miturab, c. Effect of nanodiamond powders on the viability and production of reactive oxygen and nitrogen species by human endothelial cells. *Diamond and Related Materials*. 21, 107–113. 2012.

Kilmartin, J. V., Imai, K., Jones, R. T., Faruqui, A. R., Fogg, J., & Baldwin, J. M. (1978). Role of Bohr group salt bridges in cooperativity in hemoglobin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 534(1), 15-25.

Kon, K., Maeda, N., & Shiga, T. (1983). The influence of deformation of transformed erythrocytes during flow on the rate of oxygen release. *The Journal of Physiology*, 339(1), 573-584.

Kuznetsova, T. G., Starodubtseva, M. N., Yegorenkov, N. I., Chizhik, S. A., & Zhdanov, R. I. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron* 38:8, 824-83 (2007).

Kong, X. L., Huang, L. C. L., Hsu, C. M., Chen, W. H., Han, C. C., & Chang, H. C. (2005). High-affinity capture of proteins by diamond nanoparticles for mass spectrometric analysis. *Analytical chemistry*, 77(1), 259-265

Lin, Y. C., Tsai, L. W., Perevedentseva, E., Chang, H. H., Lin, C. H., Sun, D. S., ... & Cheng, C. L. The influence of nanodiamond on the oxygenation states and micro rheological properties of human red blood cells in vitro. *Journal of biomedical optics*, 17:10, 1015121-1015129. (2012).

Miale, J. B. *Laboratory medicine: Hematology* (6th ed.). St. Louis: Mosby. 1982

Law, Y. L., Wong, T. P. W., & Yu, K. N. Influence of catechins on bystander responses in CHO cells induced by alpha-particle irradiation. *Applied Radiation and Isotopes*, 68:4, 726-729. (2010).

Meiselman, H. J. (1981). Morphological determinants of red cell deformability. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 41(S156), 27-34.

Moroz, V. V., Chernysh, A. M., Kozlova, E. K., Borshegovskaya, P. Y., Bliznjuk, U. A., Rysaeva, R. M., & Gudkova, O. Y. Comparison of red blood cell membrane microstructure after different physicochemical influences: Atomic force microscope research. *Journal of Critical Care*, 25:3, 539 (2010).

Moller, P., Risom, L., Lundby, C., Mikkelsen, L., Loft, S. Hypoxia and oxidation levels of DNA and lipids in humans and animal experimental models. *IUBMB life*, 60:11, 707-723 (2008).

Perutz, M. F., Kilmartin, J. V., Nagai, K., Szabo, A., & Simon, S. R. Influence of globin structures on the state of the heme. IV. Ferrous low spin derivatives. *Biochemistry*, 15:2, 378-387. (1976).

Raab, C., Simkó, M., Gázsó, A., Fiedeler, U., & Nentwich, M. Was sind synthetische Nanopartikel. *NanoTrust-Dossiers Nr. 2*. (2008).

Rao, S., Bálint, S., Cossins, B., Guallar, V., & Petrov, D. Raman study of mechanically induced oxygenation state transition of red blood cells using optical tweezers. *Biophysical journal*, 96:1, 209-216 (2009).

Schechner, V., Ben-Ami, R., Hershcovici, T., Yedgar, S., Beigel, Y., Shapira, I. Barsthein, G. Plasma Dependent Reduction in Red Blood Cell Aggregation After Dextran Sulfate Low-density Lipoprotein Apheresis—Implications for Rheological Studies. *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, 9:5, 379-384 (2005).

Schrand, A. M., Huang, H., Carlson, C., Schlager, J. J., Osawa, E., Hussain, S. M., & Dai, L. Are diamond nanoparticles cytotoxic? *The Journal of Physical Chemistry B*, 111:1, 2-7. (2007).

Sun, Y., Yin, X. F., Ling, Y. Y., & Fang, Z. L. Determination of reactive oxygen species in single human erythrocytes using microfluidic chip electrophoresis. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 382:7, 1472-1476. (2005).

Torres Filho, I. P., Terner, J., Pittman, R. N., Proffitt, E., & Ward, K. R. Measurement of hemoglobin oxygen saturation using Raman microspectroscopy and 532-nm excitation." *Journal of Applied Physiology* 104:6, 1809-1817. (2008).

Tu, J. S., Perevedentseva, E., Chung, P. H., Cheng, C. L. Size-dependent surface CO stretching frequency investigations on nanodiamond particles. *The Journal of chemical physics*, 125, 174713 (2006).

Wood, Bayden R., and Don McNaughton. Micro-Raman characterisation of the R to T state transition of haemoglobin within a single living erythrocyte. *Biochimica et Biophysica* 1539, 58-70 (2001).

Wintrobe, M. M., & Greer, J. P. (2009). *Wintrobe's clinical hematology* (Vol. 1). Lippincott Williams & Wilkins.

Xing, Y., Xiong, W., Zhu, L., Ōsawa, E., Hussin, S., & Dai, L. DNA damage in embryonic stem cells caused by nanodiamonds. *ACS nano*, 5:3, 2376-2384 (2011).

Yamamoto, Tomoko, et al. "The valence and spin state of iron in oxyhemoglobin as inferred from resonance Raman spectroscopy." *Journal of Biological Chemistry* 248:14, 5211-5213 (1973).

Zhu, Y., Li, J., Li, W., Zhang, Y., Yang, X., Chen, N. & Huang, Q. (2012). The biocompatibility of nanodiamonds and their application in drug delivery systems. *Theranostics*, 2(3), 302.

ANEXOS

A1. Fundamentos de la Espectroscopía Raman.

La espectrometría Raman es una técnica que proporciona información vibracional muy específica para los enlaces químicos de las moléculas, como una huella dactilar que puede ser identificada. La región de interés de las moléculas orgánicas está en el rango de $500\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$. La altura de los picos de los espectros Raman se da en unidades arbitrarias (u.a.) y la dispersión (Raman shift) en cm^{-1} . Los picos en posiciones específicas permiten identificar la composición química de las muestras. La altura de los picos en cada espectro es proporcional a la cantidad de las sustancias presentes en una misma muestra, pero no permite comparar espectros distintos.

En el efecto Raman (fig. 22) se produce cuando un fotón incide sobre una molécula e interacciona con la nube de electrones de los enlaces de esa molécula. El fotón incidente excita la molécula a un estado virtual. Para exhibir el efecto Raman la molécula requiere con respecto a la coordenada vibracional, un cambio en el potencial molecular de polarización o cantidad de deformación de la nube electrónica. En vista de que el desplazamiento Raman es igual al nivel vibratorio que está implicado, la cantidad del cambio de polarizabilidad determinará la intensidad de dispersión Raman. Por lo que el patrón de frecuencias de desplazamiento es determinado por estados vibracionales y rotacionales típicos de la muestra bajo estudio.

Para realizar un espectro Raman típicamente, una muestra es iluminada con un rayo láser. La luz del punto iluminado es recogida con un lente y es enviada a un monocromador. Debido a la dispersión elástica de Rayleigh, las longitudes de onda cercanas a la línea del láser son filtradas, mientras que el resto de la luz recogida es dispersada sobre un detector. La dispersión Raman espontánea es típicamente muy débil, y como resultado la principal dificultad de la espectroscopia Raman está en separar la débil inelásticamente dispersada luz, de la intensa luz láser dispersada de Rayleigh. Históricamente, los espectrómetros de Raman usaban rejillas difractoras holográficas y múltiples etapas de dispersión para alcanzar un alto grado de rechazo del láser. En el pasado, los fotomultiplicadores era los detectores elegidos para las configuraciones de dispersores Raman, lo que resultaba en largos tiempos de adquisición. Sin embargo, la instrumentación moderna casi universalmente emplea filtros notch o de detección de borde para el rechazo del láser y los espectrógrafos (como Czerny-Turner, echelle o basados en FT) y los detectores de CCD.

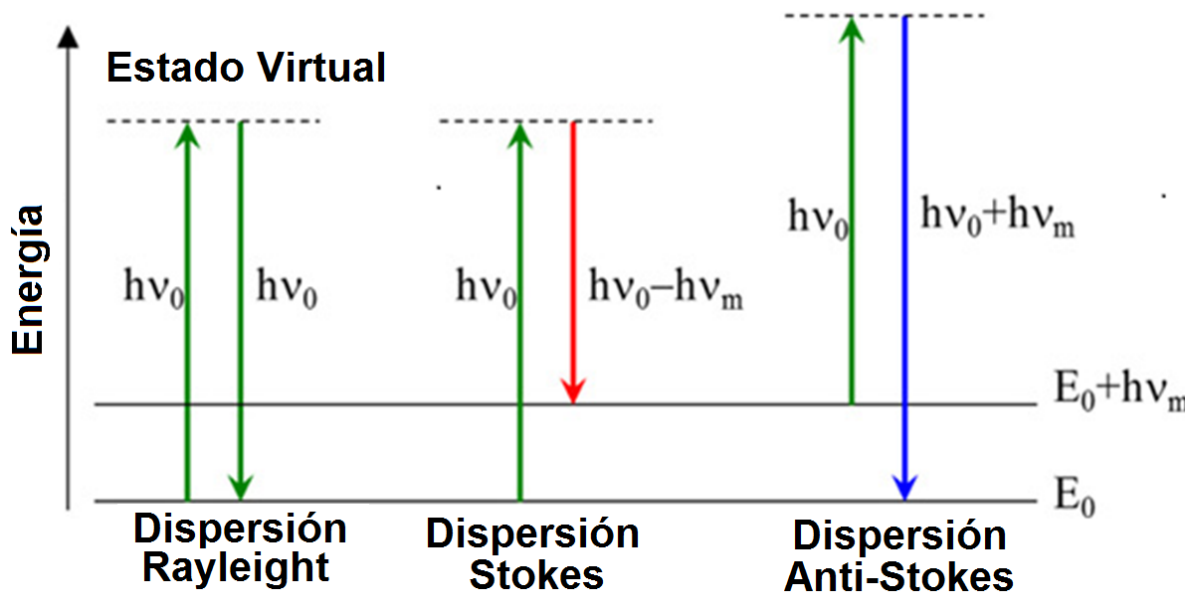


Figura 22. Efecto Raman. La molécula es excitada desde el estado fundamental a un estado de energía virtual y se relaja desde el estado vibracional excitado, lo que genera la llamada dispersión Raman Stokes. Si la molécula ya estaba en un estado vibracional excitado, la dispersión Raman se denomina dispersión Raman anti-Stokes.

A2. Fundamentos de la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).

El AFM es un instrumento mecano-óptico capaz de detectar fuerzas del orden de los piconewtons (pN) al rastrear una muestra, registrando continuamente su topografía mediante una sonda o punta afilada de forma piramidal o cónica (cantilever). Dependiendo de la distancia entre los átomos en la punta del cantilever y los que están en la superficie de la muestra existe una fuerza/interacción, ya sea de atracción o de repulsión, que puede usarse para medir la superficie de la muestra. La fuerza entre los átomos en la superficie de la muestra y los que están en la punta canvilever son detectados monitoreando cuanto se desvía el cantilever. Esta flexión del cantilever se puede cuantificar por la medición del haz de láser que se refleja fuera de la parte trasera de la cantilever y sobre el foco detector sensible a la posición (PSPD). El escáner localizado debajo la muestra se mueve en dirección horizontal (X-Y) y en vertical (Z). Este escanea repetidamente la muestra línea por línea, mientras que la señal PSPD se utiliza para establecer un bucle de realimentación que controla el movimiento vertical del escáner del cantilever a través de la superficie de la muestra.

Los componentes de un AFM son: punta, fotodetector y cantiléver (23).

La punta es una herramienta es la que permite el scanner de la superficie a estudiar. Funciona gracias a su deflexión, o sea, su doblamiento hacia la muestra estudiada, y según la fuerza existente entre la punta y la muestra, es el sistema de scanner de ella. Si un oscilador experimenta una fuerza atractiva que lo expulsa de la misma posición de reposo, la frecuencia de resonancia se reducirá (en el complemento, será cero). Una fuerza de repulsión apretándola aumentará la frecuencia de resonancia. En el modo de contacto, las fuerzas son considerablemente más altos que en el modo de no contacto y muestras frágiles, por lo tanto la punta se puede dañar fácilmente entre 0.1 a 1 N/m y una frecuencia de 1 a 50 kHz

El cantilever es una estructura flexible, compuesta en mayor proporción por Silicio (al igual que la punta), que se dobla según las fuerzas que existan entre la punta y la muestra, descritas anteriormente. La deflexión del cantilever se detecta apuntando un láser rojo hacia la punta, ya que esta deflexión es directamente proporcional a la variación del ángulo de reflexión del láser. Y para detectar estas variaciones, se utiliza un sistema de fotodiodos de cuatro cuadrantes. Por otra parte, esta medición no puede realizarse si la punta se ha dañado o si se desea cambiar el modo de contacto, y el principal modo de observar la rotura de la punta es con la ausencia de la reflexión del láser, que se puede observar en la cámara incorporada al microscopio. Para ello, cuando se requiere cambiar la punta del cantilever, se retira la punta con unas pinzas, y se coloca de la misma manera hasta hacer coincidir en un punto que la sujetará magnéticamente.

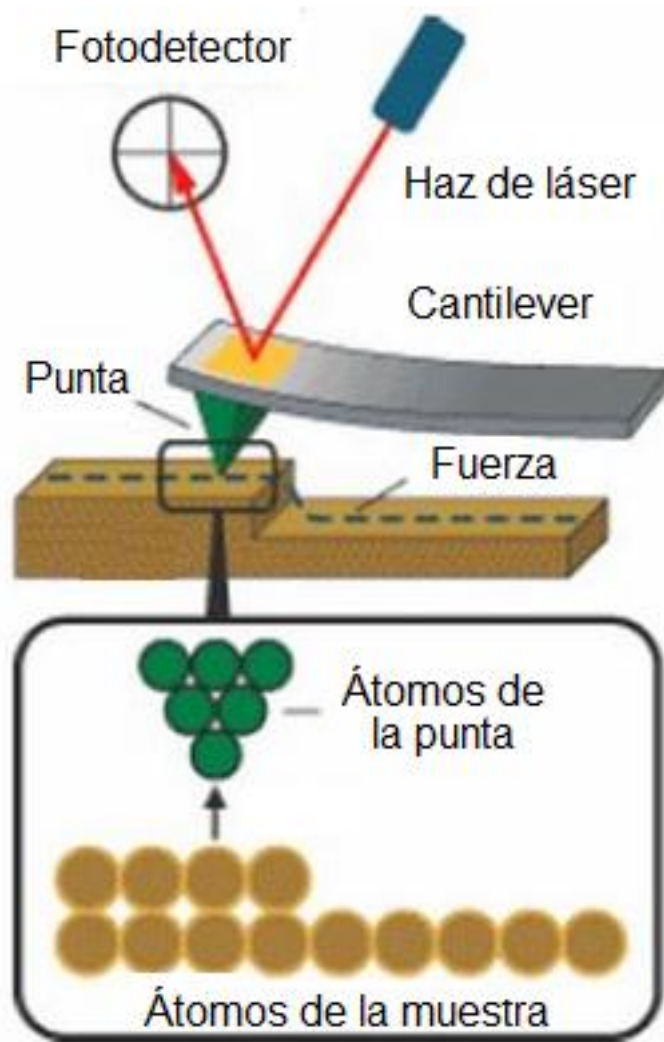


Figura 23. Esquema de detección del AFM.

