



“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Departamento de Investigación en Física

Caracterización Morfométrica de Eritrocitos Sanos y Patológicos Utilizando la Microscopía de Fuerza Atómica y Validación de los Métodos ASS, ASG y VGW

Para obtener el grado académico de:

Maestro en Ciencias (Física)

Presenta:

Q.B. LIRIO CRISTAL AMOR GAYTÁN ORDAZ

Director de Tesis:

Dra. Erika Silva Campa

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



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

DIRECTOR

Dra. Erika Silva Campa

ASESORES

Dra. Karla Josefina Santacruz Gómez

Dr. Martín R. Pedroza Montero

Dr. José L. Navarro Henze

COMITÉ DE TESIS

Dra. Erika Silva Campa

Dr. Martín Rafael Pedroza Montero

Dra. Verónica Mata Haro

Dr. Josué Elías Juárez Onofre

DEDICATORIA

A mi abuelita Aurora, mis padres, hermanos, sobrinos y amigos por estar conmigo y por el aguante.

AGRADECIMIENTOS

El inicio de esta tesis se logró con la idea y apoyo del Dr. José Luis Navarro Henze para el análisis de células eritrocitarias. La caracterización en AFM fue dirigido por la Dra. Karla Josefina Santacruz Gómez. El análisis morfológico eritrocitario en frotis sanguíneo mediante la técnica clásica por microscopía óptica fue asesorado por el Q.B. Leonardo Llanes Morales. La dirección sobre el análisis estadístico, morfológico y estructural de esta tesis estuvo dirigido por la Dra. Erika Silva Campa, y el asesoramiento efectivo del Dr. Martín R. Pedroza Montero. El Dr. Emmanuel Robles Ávila y Dr. Eleazar León Sarabia quienes me asesoraron en la caracterización y procesamiento de imágenes por AFM. Agradezco las revisiones del comité de tesis integrado por el Dr. Josué Elías Juárez Onofre, la Dra. Verónica Mata Haro, el Dr. Martín Rafael Pedroza Montero y la Dra. Erika Silva Campa. Asimismo a la coordinadora del programa de Maestría en Ciencias (Física), Dra. Susana Álvarez García por su oportuna intervención para la culminación de este trabajo. Extiendo un agradecimiento al Departamento de Investigación en Física por permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones. Además, a CONACYT por el apoyo otorgado y a la Universidad de Sonora por promover el desarrollo de sus estudiantes a nivel posgrado.

Agradezco la colaboración de los laboratorios donde se obtuvieron, procesaron, caracterizaron y analizaron las muestras manipuladas:

- Banco de Sangre del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) número dos de Hermosillo Sonora.
- Laboratorio de Hematología del Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora.
- Laboratorio de Microscopía de Fuerza Atómica en el Departamento de Investigación en Física, Universidad de Sonora.

La aventura prolongada de esta tesis dio inicio con la entrada a este posgrado, con la apertura de bienvenida del Dr. Martín Pedroza. La resistencia durante mi paso por la física siempre acompañada por “Los Cárdenas”, comenzando por Ángel Vitali a quien le tengo un profundo agradecimiento, respeto y cariño por su apoyo incondicional, sin importar circunstancia (tiempo y lugar), por sus extrañas palabras, ejemplo como persona que me inspiraron a seguir adelante. A José Ángel Cárdenas, Rosa Delia Muñoz e hijos (Iván Antonio, Nisvan Rafael, Eduardo y Mary) por brindarme un hogar y hacerme partícipe de sus vidas cotidianas y asesorías escolares, para que lograra terminar mis estudios, dándome una compañía familiar muy hermosa. También a la M.Cs. Lilian Arely Carrasco Cota, M.Cs. Mijaela Acosta y M.Cs. Mabel Anahí Soto Brizuela por ayudarme con la redacción de texto de este trabajo, las quiero mucho. Al Dr. Santos Jesús Castillo quien siempre me anima con su espíritu de lucha. Los consejos sabios que me dejan otra forma de resolver los problemas del Dr. Mario Flores. Dr Marcelino Barboza Flores por asesorarme. Al Dr. Emmanuel Robles Ávila por la entera disposición de ayuda en este trabajo desde el principio antes de que la tesis fuera tesis y hasta el final. Dr. Diego Soto Puebla, Dra. María Inés Gil Tolano, M.C. César Iván Huerta Pérez, M.C. Francisco Berrellez Reyes y Pedro Alberto Ramírez Gámez por el soporte técnico de softwares. M.C. Juan Castillo Ruiz por la enorme ayuda en cada momento de este escrito y su gran rescate al final, siempre con una sonrisa que me alentó a continuar con fuerza (Me salvaste). Un agradecimiento muy especial al equipo de trabajo de quienes obtuve grandes aportaciones, Dra. Aracely Angulo, Dr. Alexel J. Burgara, Seidy Pedroso, Noralvis Fleitas y Dr. Jose Andre-I Sarabia. A mis compañeros de clases y estancias del posgrado Selene Vazquez, Abraham V. Kraff, Antonio Heredia, Ramiro Aragón, Alejandro Véjar, Ramón Álvarez, Wilmer Melo, Roldan González, Ricardo Brito, Javier Montaña, Iván Fuentecilla con quienes disfrute días completos de estudio, excelentes momentos durante el trabajo y me hicieron ver que hay tiempo para todo. A Carlos Iván Ham Rodríguez por su sincera amistad, por darme ánimos aunque no me comprendiera y por estar al pendiente de mi bienestar. Diana Eloisa Arce Machado por compartir conmigo este proceso, palabras de aliento, ser una verdadera amiga en todas sus múltiples modalidades “eres extraordinaria”. A mis amigos que durante años han sido clave en mi desarrollo como persona y progreso académico, con quienes he tenido mis mejores momentos (Ramses Del Sol SAVEDRA, An Young Sarahí Taylor Castillo, Mónica Alesándara Acosta Elías, Carmen Itze Enriquez, Miguel Ángel Nuñez) por aguantar mis interminables ¡“hasta que termine la tesis”!. A mis padres Consuelo Aurora Ordaz

Vázquez y Miguel Gaytán Casas les quiero agradecer mi formación completa, por la dicha de ser su hija, y darme la oportunidad de crecer siendo una Lirio (Fusión de dos seres tan distintos y grandiosos). A mis hermanos Liliana Aurora, Mizael Raymundo y Miguel Ángel (El carnalito) y mis sobrinos gracias por ser tan pacientes y por todo su amor. A mi abuelita Aurora Ordaz Vázquez por ser un ejemplo de vida, siempre con una actitud positiva, sonrisas, activa y jovial hasta estos días. A mi criatura hermosa que me alegró mi vida Déscartes Lucky Gaytán Ordaz. Por último quiero darle un profundo agradecimiento a la Dra. Erika Silva Campa quien se convirtió en un pilar fuerte durante esta etapa tan importante de mi vida, prácticamente haberme llevado de la mano, con paciencia, cariño, respeto y ejemplo para culminar con este trabajo, por todo esto ha dejado una huella muy importante en mi vida.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	4
Microscopía de Fuerza Atómica.....	4
Metodologías en Microscopía de Fuerza Atómica	6
Glóbulos Rojos (GRs).....	11
Técnicas para el Estudio de Glóbulos Rojos	13
Simulación de Imágenes de Glóbulos Rojos Patológicos y Saludables	14
Microscopía de Fuerza Atómica en el Estudio de Glóbulos Rojos.....	16
JUSTIFICACIÓN.....	25
HIPÓTESIS.....	26
OBJETIVOS.....	27
General.....	27
Particulares.....	27
METODOLOGÍA	28
Selección de Donadores.....	28
Criterios de Inclusión.....	28
Recolección de Muestras.....	28
Preparación del Frotis Sanguíneo.....	28
Obtención de Imágenes por Microscopía de Fuerza Atómica	29
Análisis de Imágenes Caracterizadas con el Software XEI	29
Clasificación de Glóbulos Rojos.....	29
Clasificación por Volumen Corpuscular Medio	29
Clasificación por Área Superficial (AS).....	30
Caracterización Morfológica de Glóbulos Rojos Basada en la AFM.....	31
Perfil Lineal.....	31
Rugosidad	32
RESULTADOS Y DISCUSIONES	36
Biometría Hemática	36
Reclasificación de Muestras Mediante el Área Superficial y Volumen con AFM	38
Área Superficial por el Método de Superficie (ASS)	38

Área Superficial por el Método de Grano Mediante Detección de “Cuencas” (ASGc)	38
Volumen por el Método de Grano Mediante Watershed	41
Análisis Morfológico de Glóbulos Rojos en Microcitosis y Macrocitosis	45
Descripción de los Glóbulos Rojos por Forma y Perfil Lineal	48
Normocito	48
Codocito	53
Equinocito	58
Esferocito	60
Ovalocito	64
Rugosidad (Rrms)	67
Rugosidad de Células Completas	67
Rugosidad en el Área Bicóncava con el Uso de Líneas de Alturas Promedios	68
CONCLUSIONES	72
TRABAJOS A FUTURO	74
PRODUCTOS OBTENIDOS	75
BIBLIOGRAFÍA	76
APÉNDICE A MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA A PROFUNDIDAD	83
A1. Conceptos Básicos de Instrumentación	83
A1.1. Transductores Piezoeléctricos (Escáner piezoeléctrico)	83
A1.2. Transductores de Fuerza	89
A2. Componentes del Microscopio de Fuerza Atómica	91
A2.1. Cantilever y Punta	92
A2.2. Escáner Piezoeléctrico	96
A2. 3. Láser	99
A2.4. Fotodetector	101
A3. Modos de Operación	103
A3.1. Modo de Contacto	103
A3.2. Modo de No Contacto	104
A3.3. Modo Intermitente o Tapping	104
A4. Ventajas y Desventajas de la Microscopía de Fuerza Atómica	106
APÉNDICE B CONCEPTOS FÍSICOS Y QUÍMICOS	107
B1. Ley de Hook	107
B2. Fuerzas de Van der Waals (vdW)	108
APÉNDICE C GLÓBULOS ESTRUCTURA Y MÁS	109

C1. Función	109
C2. Morfología y Tamaño	109
C3. Membrana.....	110
C4. Patologías.....	110
C4.1. Tamaño Patológico.....	110
C4.2. Morfología Patológica.	111
APÉNDICE D FUNDAMENTOS METODOLÓGICOS UTILIZADOS.....	113
D1. Biometría Hemática (BH)	113
D1.1. Hemoglobina (Hb).....	113
D1.2. Hematocrito (Hto).	113
D1.3 Hemoglobina Corpuscular Media (HCM).....	113
D1.4 Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM).	113
D1.5 Volumen Corpuscular Medio (VCM).....	114
D1.6. Categorías para la Determinación y Clasificación de Anemias.	114
D2. Método de Grano Mediante Detección de “Cuencas” o “Watershed”.....	115
D2.1 La Implementación de Métodos para “Watershed”.....	115
D2.2 Ventajas.....	116
D2.3 Filtros.....	116

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Valores de AS por Métodos de Superficie y Grano.....	39
Tabla 2. Características Morfométricas de los Glóbulos Rojos.....	45
Tabla 3. Rugosidad de células completas	68
Tabla 4. Rugosidad de la zona bicóncava	68
Tabla 5. Clásificación de la intensidad de anemias por valores hematológicos y FSP..	115

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama convencional de un AFM.....	5
Figura 2. Cálculo del área superficial por el método de superficie.	7
Figura 3. Medición de áreas por el método grano por algoritmo “Cuenca”.	8
Figura 4. Cálculo del área superficial por el método de grano “cuenca de agua”.....	8
Figura 5. Cálculo del área superficial por el método de grano “cuenca de agua” utilizando filtro.	9
Figura 6. Esquematación de un glóbulo rojo.	12
Figura 7. Cambios de la forma eritrocitaria por la exposición a diferentes concentraciones de urea.	22
Figura 8. Simulación en malla triangulada durante la transformación morfológica de un glóbulo rojo sano a hoz.	23
Figura 9. Modelo de las interacciones entre las proteínas de la membrana.	24
Figura 10. Determinación del AS por el método de superficie.	33
Figura 11. Determinación del AS y Volumen (VGW) por método de grano.....	34
Figura 12. Análisis del perfil de línea (Slanted line) celular.....	35
Figura 13. Perfil lineal mediante el método de línea promedio.	35
Figura 14. Concentración de VCM Hb, CHCM y HCM.....	37
Figura 15. Comparativo del área superficial entre dos métodos (de superficie y grano).	40
Figura 16. Comparación entre el AS y el VCM.	41
Figura 17. Valores de VGW.....	43
Figura 18 Análisis Comparativo entre Métodos.	44
Figura 19. Morfología Celular en Microcitos.....	46
Figura 20. Morfología Celular en Normocíticas y Macrocícticas.	47
Figura 21. Perfil lineal de un Glóbulo Rojo normal.....	49
Figura 22. Perfil de Línea Característica de Normocitos.....	50
Figura 23. Relación Entre la Concentración de Hb y el Perfil Lineal.	50
Figura 24. Forma y Perfil Lineal de GR microcítico y macrocítico.....	52
Figura 25. Comparación del Perfil Lineal de eritrocitos de forma normal con micro, normo y macrocitos.	53
Figura 26. Codocitos en Micro, Normo y Macroctosis.....	55
Figura 27. Perfil Lineal de Codocitos.....	56

Figura 28. Perfil Lineal de Codocitos en Macroцитosis.	57
Figura 29. Imágenes en AFM de equinocitos.	59
Figura 30. Perfil de Lineal de Equinocitos.	60
Figura 31. Ovalocitos en distintas etapas de desarrollo.....	62
Figura 32. Perfil lineal de las células esferocíticas microcíticas.....	63
Figura 33. Perfil Lineal de Ovalocitos.	65
Figura 34. Rugosidad Promedio en la Célula Completa.	70
Figura 35. Rugosidad del área bicóncava.	71
Figura 36. Efecto piezoeléctrico directo.....	87
Figura 37 Piezoeléctrico inverso.....	87
Figura 38. Piezoeléctrico en disco.....	87
Figura 39. Direcciones piezoeléctrico.....	88
Figura 40 Piezoeléctrico Cantiléver.	88
Figura 41 Geometrías típicas para piezoeléctricos usados en AFM (disco, tubo y bimorfo), sus movimientos y ecuaciones correspondientes.....	89
Figura 42 Un diagrama esquemático de un AFM.	91
Figura 43. Partes de AFM XE-Bio.	92
Figura 44 Chip, cantilever y punta.....	95
Figura 45. Fotodetector PSPD.	96
Figura 46. . Configuración de un escáner común de AFM.....	98
Figura 47 . Esquemmatización de un sistema usado en un instrumento de AFM de alta velocidad.....	100
Figura 48 Esquemmatización de la señal al fotodetector en un AFM.	102
Figura 49. Detección de láser en los cuadrantes de un fotodetector de AFM.	102
Figura 50. Curvas de fuerzas de desplazamiento.....	105
Figura 51. Operación en modo de NC-AFM.	106
Figura 52 Ley de Hook.	108
Figura 53. El histograma ERI.	114

RESUMEN

El volumen corpuscular medio (VCM) es un índice del tamaño promedio del eritrocito que se utiliza para el diagnóstico de anemia. Sin embargo, el VCM obtenido con un analizador de hematología puede producir valores erróneos debido a la presencia de aglutinación de glóbulos rojos (GRs) y cantidad excesiva de plaquetas grandes, por lo que es necesario realizar un examen microscópico. La Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) posibilita el análisis simultáneo de la topografía morfométrica y mecánica de las células como indicativo de la integridad celular. En este trabajo se evaluaron las características morfométricas de los GRs de muestras sanguíneas de pacientes con microcitosis y macrocitosis. El área superficial (AS), volumen por método de Grano por Watershed (VGW), tamaño, forma, y rugosidad (R_{rms}) de los GRs se obtuvieron mediante el análisis topográfico por AFM. Los valores de VCM obtenidos de la biometría hemática fueron comparados con el AS y VGW de la AFM. En los resultados obtenidos pudimos identificar que el área superficial por el método de grano (ASG) es más adecuado en relación con el área superficial por el método de superficie ASS. Además, el valor de volumen celular (VGW) obtenido mediante AFM corresponde al VCM de la muestra, brindando información relacionada con el tamaño del eritrocito. Por otra parte, en el análisis de forma en la microcitosis se encontraron esferocitos, codocitos, ovalocitos; y en la macrocitosis codocitos y equinocitos. Nuestros resultados indican que la AFM es una técnica adecuada para la clasificación de anemia microcítica y macrocítica mediante la determinación del AS por el método de grano, además de proporcionar parámetros de la integridad celular nano y microscópico simultáneamente.

Palabras claves: *Microscopio de Fuerza Atómica (AFM), glóbulos rojos, rugosidad, área superficial, método de grano, volumen corpuscular medio.*

INTRODUCCIÓN

Binnig, Quate, & Gerber (1986) combinaron la microscopía de efecto túnel y el perfilómetro dando inicio a la revolucionaria forma del análisis a nanoescala con su publicación “Atomic Force Microscope” (AFM). Pero la física no podía resistirse a la exploración de sistemas vivos. Ésta versátil herramienta se aplica tanto en el campo físico como biológico, gracias a que no es necesario que la muestra sea conductora (Polyakov et al., 2011). Una gran cantidad de científicos de todas las ramas de estudio se han sumado al esfuerzo de mejorar esta fascinante técnica hasta lograr integrarla a los sistemas biológicos. Debido a la gran cantidad de información que ofrece la AFM se renueva la forma de exploración celular, obteniendo características morfológicas más detalladas a través de imágenes de alta resolución.

El uso de la AFM ha proporcionado conocimiento sobre las estructuras y procesos celulares. Sin embargo, las aplicaciones de la AFM y en particular su capacidad para medir fuerza, no son de uso común en la clínica médica (Vahabi, Nazemi Salman, & Javanmard, 2013). En nuestro trabajo se realizó un estudio de la morfométrica de los glóbulos rojos con la finalidad de obtener información más detallada sobre las formas encontradas en condiciones patológicas microcíticas, macrocíticas y normales. El Volumen Corpuscular Medio (VCM) es un parámetro clínico que se utiliza para la clasificación de patologías según el tamaño de los eritrocitos y con ello el diagnóstico presuntivo de posibles patologías como la anemia. El problema es que la metodología puede ser ineficaz para identificar anemias de tipo normocítica.

Otra limitante es que no se puede conocer la morfología celular de los glóbulos rojos (GRs) y muchas veces en la práctica clínica se guía solo con este tipo de indicativos. El complemento a este estudio es la exploración morfológica de un extendido con tinciones que permiten la visualización del eritrocito, pero esto genera dos problemas principales; el primero es que se puede llegar a confundir las morfologías celulares, y el segundo es que las tinciones pueden inducir una deformación en la célula.

El objetivo es minimizar todos estos errores a los que estamos expuestos. La forma para realizarlo es hacer uso de técnicas más precisas que confieran no solo las clasificaciones de las células que ya conocemos, sino que además nos proporcione mayor información acerca de estas patologías celulares. Con la finalidad de mejorar la

clasificación de los eritrocitos con anemia microcítica, normocítica y macrocítica, hemos enfocado este estudio en un análisis topográfico de anemias con la utilización de la AFM, brindándonos información en un sólo paso con resultados concordantes a las metodologías ya conocidas. La AFM es un medio para que se introduzcan nuevos y mejores parámetros con mayor precisión que nos indiquen el bienestar celular o la temprana detección de enfermedades mediante el análisis nanométrico celular.

ANTECEDENTES

Microscopía de Fuerza Atómica

La microscopia de fuerza atómica (AFM) es una herramienta de alta resolución que puede utilizarse para medir materiales orgánicos e inorgánicos, independientemente de sus propiedades eléctricas. Esta permite la observación y exploración de propiedades mecánicas de una superficie en tercera dimensión (3D) a escala nanométrica (Haugstad, 2012). Se basa en la interacción de los átomos de una punta con los átomos de la superficie de una muestra. La punta hace un barrido con desplazamientos tanto vertical como horizontal sobre la superficie de exploración. Dependiendo de la distancia entre los átomos de la punta del cantiléver y superficie de la muestra, pueden existir fuerzas de atracción o de repulsión (Fuerzas de Van der Waals y electrostáticas, respectivamente, para mayor información consultar el apéndice B). La variación entre las alturas de la punta y la superficie analizada se detecta con la ayuda de un haz de láser que choca con la parte superior del cantiléver, el cual sostiene a la punta. La luz es dispersada y colectada en un fotodetector, este a su vez recolecta la información dando como resultado la estructura topográfica de la muestra (figura 1).

La AFM maneja distintos modos de operación. Los más utilizados son el modo de contacto (C-AFM), de no contacto (NC-AFM) y el intermitente o “tapping” (IC-AFM) (apéndice A). En este trabajo el modo que hemos utilizado es el NC-AFM que consiste en hacer vibrar un cantiléver a una distancia muy cercana a la superficie de la muestra. Sobre el borde del cantiléver se centra un láser que es reflejado a un fotodetector. Las vibraciones y deformaciones del cantiliver que ocurren durante el barrido de la muestra son detectadas y traducidas a una imagen topográfica. El espacio entre la punta del cantiléver y la muestra es del orden de Ångstroms (decenas a centenas).

El modo NC-AFM no requiere un contacto físico con la muestra, esto se debe a que mide la topografía superficial mediante las fuerzas atómicas atractivas a una distancia relativamente grande entre la punta del cantiléver y la superficie analizada. Las fuerzas de atracción, que son débiles, y la distancia de separación entre la punta y la superficie no alteran la estructura analizada durante la medición. El modo NC-AFM detecta los cambios en la fase o amplitud de vibración del cantiléver que son inducidos por la fuerza

de atracción entre la punta del cantiléver y la muestra, mientras que el cantiléver se hace oscilar mecánicamente cerca de su frecuencia de resonancia.

Un cantiléver en NC-AFM tiene típicamente una frecuencia de resonancia entre 100 y 400 kHz con una amplitud de vibración de unos pocos nanómetros. Debido a la fuerza de atracción entre los átomos de la punta del cantiléver y la superficie de la muestra, experimenta un cambio en la constante de resorte desde su constante de resorte intrínseca (K_0). Esto se denomina la constante de resorte efectiva (K_{eff}), y se calcula mediante la siguiente ecuación (Corporation, 2011; Technology, 2008):

$$K_{eff} = K_0 - F' \tag{1}$$

Cuando se aplica la fuerza de atracción K_{eff} se hace menor que K_0 ya que F' es positiva en $F' = \left(\frac{\partial F}{\partial z}\right)$. En consecuencia, cuanto más cerca se lleva la punta a la superficie de la muestra, será menor a la constante del resorte efectiva (apéndice B1) (Corporation, 2011; Technology, 2008).

En los apéndices A1 y A2 se proporciona mayor información acerca de los conceptos básicos y componentes de la AFM.

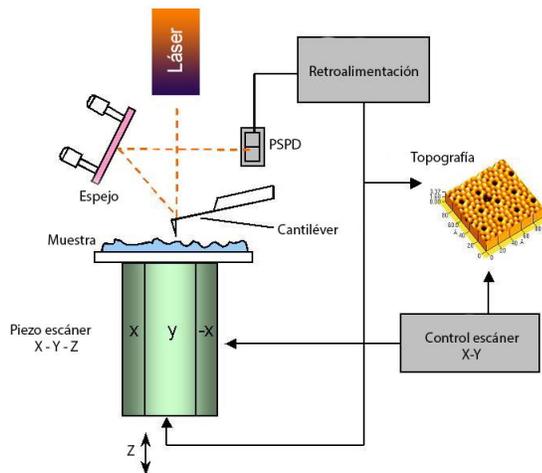


Figura 1. Diagrama convencional de un AFM. El escaneo utilizado en AFM está dado por tubos de cerámica piezoeléctricos. La muestra es escaneada por la punta montada en el borde del cantiléver que detecta el movimiento sobre la superficie de la muestra y refleja la luz de un láser hacia un espejo el cual desvía la luz a un fotodetector mostrando la imagen topográfica caracterizada de la muestra.

Metodologías en Microscopía de Fuerza Atómica

La AFM ofrece la aplicación de métodos para profundizar en el campo de investigación en sistemas biológicos. En éste trabajo se revisaron las siguientes metodologías:

Área Superficial (AS)

El AS es un método utilizado para conocer el valor de distribución superficial en micrómetros cuadrados, en la AFM se puede medir de dos formas:

Área superficial por método de superficie (ASS)

Los valores se relacionan a la superficie, por lo tanto, aquellos datos que utilizan la unión métrica de X, Y y Z; donde X y Y son las coordenadas de la topografía superficial y Z la altura. Suponiendo que el área superficial es de 1 por 1 píxel entonces será un área compuesta con cuatro puntos diferentes. Como se muestra en la figura 2, cada punto de valor de altura se nombra como Z1, Z2, Z3 y Z4. Z5 está calculada como el valor medio de altura de Z1 a Z4 y Z5 será localizada en medio de ellos. Ahora, hay cuatro superficies (A1, A2, A3 y A4), que se suman para obtener el área de 1 por 1 píxel (figura 2) (Corporation, 2011).

Área superficial por método de grano mediante detección de “Cuencas” (ASGc)

La segmentación de imagen es una de las categorías más importantes del procesamiento de imágenes. El ASGc es un poderoso método de análisis ya que tiene ventajas tales como su simplicidad, velocidad y una completa división de la imagen. El propósito de la segmentación de imagen es dividir una imagen original en regiones homogéneas (figura 3). Los algoritmos de segmentación de imágenes se basan generalmente en dos características básicas de la luminancia: discontinuidad y similitud.

El algoritmo de detección de bordes está basado en la discontinuidad. Esta es una técnica por morfología matemática que permite extraer las fronteras de las regiones que presenta una imagen. A su vez, se considera una técnica de segmentación por medio de

regiones, debido a que clasifica los píxeles según su proximidad espacial, el gradiente de niveles de grises y la homogeneidad de sus texturas. Por ello se toma como una técnica de contornos y de crecimiento de regiones al mismo tiempo (Palomino & Concepción, 2010).

El algoritmo de cuencas se divide en dos grupos: El primero, contiene algoritmos que simulan el proceso de inundación a partir de los mínimos, y el segundo grupo está compuesto de los procedimientos a la detección directa de los puntos de la cuenca (figura 4). La detección se va realizando por etapas de los niveles de altura superficial desde el punto más bajo en la superficie. Esta región más baja es reconocida como un solo grano. A medida que las alturas aumentan, comienza a detectar zonas de la superficie y por lo tanto reproduce los granos. Una vez que reconoce un punto máximo (valor de otro grano), comienza a realizar un “desbordamiento de cuenca” y genera más granos (figura 4). Este método puede ser interferido por la rugosidad de las imágenes, por lo que es necesario filtrarla con el objetivo de eliminarla, con esto obtendremos un valor de grano más homogéneo (figura 5). Para más información sobre el método revisar el apéndice D2 (Amandeep Kaur, 2014b; Beucher & Meyer, 1992; Chuklanov, Ziganshina, & Bukharaev, 2006; Lamia Jaafar Belaid, 2009; P.P.Acharjya, 2013; Vincent & Soille, 1991).

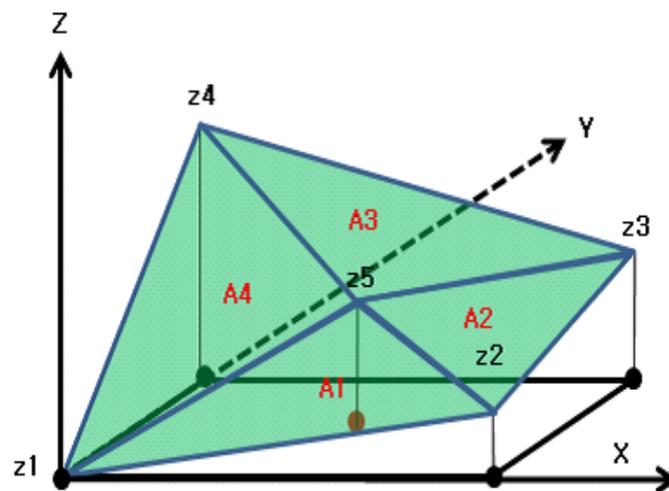


Figura 2. Cálculo del área superficial por el método de superficie. Las áreas X, Y, Z1, Z2, Z3 y Z4 son alturas topográficas y Z5 está determinado por el cálculo automático de software.

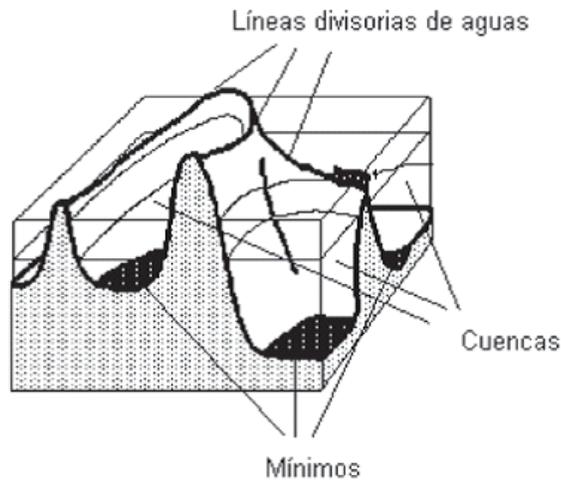


Figura 3. Medición de áreas por el método grano por algoritmo "Cuenca". Se observa las alturas mínimas y las cuencas clasificadas así como las líneas divisorias de aguas o (transformación watershed). Se asocia a un proceso de inundación de esta superficie topográfica, desde los niveles más bajos de altura (valores mínimos locales, que constituyen cuencas), hasta que las cuencas se unen. Las líneas divisorias que representan las fronteras de regiones homogéneas constituyen el resultado de la segmentación. Esta es una técnica de segmentación flexible y eficiente.

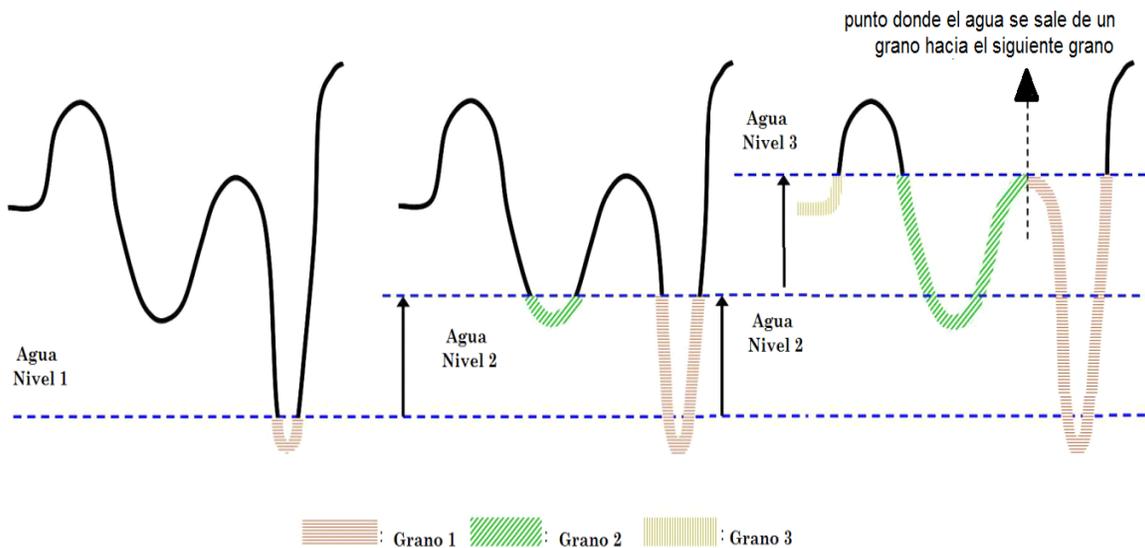


Figura 4. Cálculo del área superficial por el método de grano "cuenca de agua". El programa por medio de niveles de altura va clasificando los granos. En el primer nivel se detecta el grano 1 (todos los valores que caen dentro de este rango), en el segundo nivel se detecta el grano 2 y en el tercer nivel el grano 3.

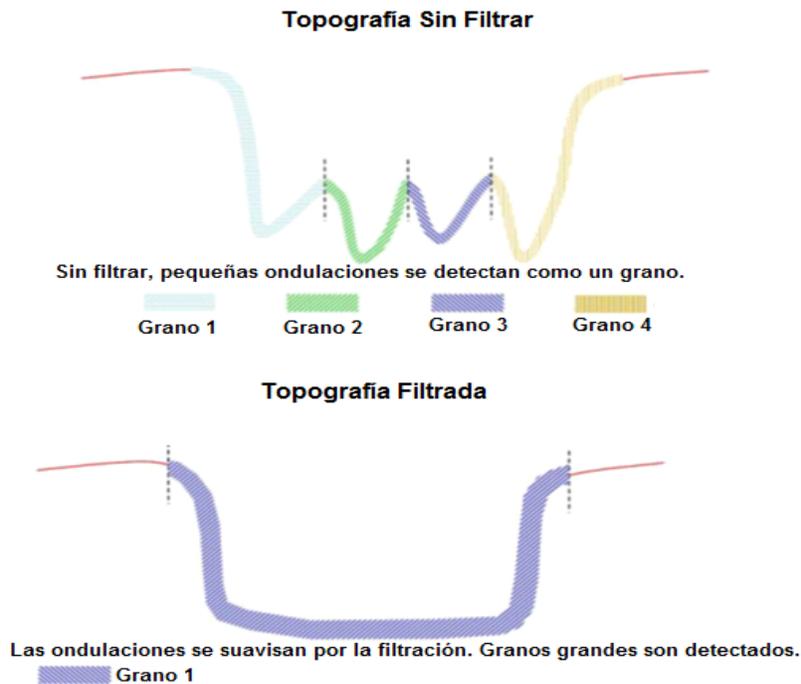


Figura 5. Cálculo del área superficial por el método de grano "cuenca de agua" utilizando filtro. Con el filtro se evita la intervención de la rugosidad en los valores arrojados por el método.

Análisis morfológico de imágenes topográficas

Este tipo de análisis permite clasificar la morfología y el tamaño celular de forma visual con la finalidad de conocer el porcentaje de células en el caso de las microcitosis, macrocitosis y normocitosis. Así como, la pérdida de la concavidad celular entre otras características importantes que proporcionen información sobre la salud de los eritrocitos.

Perfil lineal

Este método puede medir varias características de una imagen a lo largo de los perfiles de línea seleccionados. Se pueden obtener medidas cuantitativas de las características de la superficie y recoger datos estadísticos de superficie a lo largo de la sección transversal. La vista lineal proporciona un perfil de alturas en una dirección el cual se representa por un histograma del perfil de alturas (Corporation, 2011).

Rugosidad

La rugosidad está relacionada con el conjunto de irregularidades que posee una superficie, asociados con la variación en tamaño y forma de la célula; paralelismo entre la interacción membrana-esqueleto y función. La rugosidad superficial es un valor estrechamente relacionado con la integridad de la membrana celular. Diversos estudios reportan una disminución de hasta el 50% en la rugosidad de la membrana en aquellas células con defectos patológicos o inducidos artificialmente por un tratamiento químico. A pesar de que la rugosidad se considera un parámetro útil para evaluar las superficies, no se ha establecido un método certero, sobre todo en muestras biológicas.

Fundamento Matemático

Matemáticamente la rugosidad (R_{rms}) se puede expresar de la siguiente manera:

$$R_{rms} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (z_i - z_m)^2}{(N - 1)}} \quad (2)$$

Dónde N es el número total de puntos de datos; Z_i es la altura del punto i -ésimo y Z_m es la altura media. Es importante mencionar que la rugosidad de la superficie es un parámetro relacionado con la morfología. La medida experimental de R_{rms} por AFM es sencilla ya que las alturas de la superficie son los mismos puntos de una imagen topográfica (que consiste en una matriz de $n \times n = N$ puntos) y la interpretación de la rugosidad corresponde a la dispersión en la distribución de alturas Z_i . El valor de rugosidad medido por AFM depende de un número de parámetros de configuración y la metodología de adquisición, es decir, depende directamente del área de escaneado y del número de puntos (datos de las imágenes), pero también de la constante elástica de la punta, el tamaño, la forma y la fuerza del cantiléver (Marco Girasole, Dinarelli, & Boumis, 2012).

Glóbulos Rojos (GRs)

La principal función de los GRs o hematíes consiste en transportar el oxígeno unido a la hemoglobina (Hb) desde los pulmones a los tejidos (apéndice C1) (Teijón, 2009). Normalmente presentan forma oval o redondeada, con una depresión en el centro. Cuando se hace un corte transversal normalmente tiene un diámetro promedio de 7.5 μm con una variación usual de 6.8 a 8.7 μm y un grosor de 2.2 μm en su borde y un espesor de 0.8 μm en su centro (figura 6) (apéndice C2) (Diez-Silva, Dao, Han, Lim, & Suresh, 2010; Rosa, 2003; Ross & Pawlina, 2007). La membrana de los GRs tiene un espesor menor a 0.1% de la célula y es sumamente importante para el funcionamiento celular.

El tamaño y forma del GR están configurados para realizar correctamente sus funciones (apéndice C3) (Yawata, 2006). Las anomalías de los GRs se pueden clasificar en dos grupos: 1) Intrínsecos, derivadas de anomalías heredadas, asociadas a cambios en la composición de la membrana, la disfunción en su actividad metabólica, modificaciones en la eritropoyesis y cambios en la composición, estructura, función y producción de hemoglobina; 2) Extrínseca, adquiridas por cambios inducidos durante y posteriores a su formación. Está asociada con desorden de tipo orgánico que indirectamente provoca alteraciones en el número y morfología de los eritrocitos, como por ejemplo la producción irregular de anticuerpos antieritrocitarios, anomalías en la afinidad cromática (Rosa, 2003). Las anomalías del GR se clasifican como anisocitosis cuando se presentan diferencias marcadas de tamaño entre los GRs, y cuando las diferencias entre sí son de forma se clasifican como poiquilocitosis (apéndice C4) (Castrillo & Álvarez, 2005)

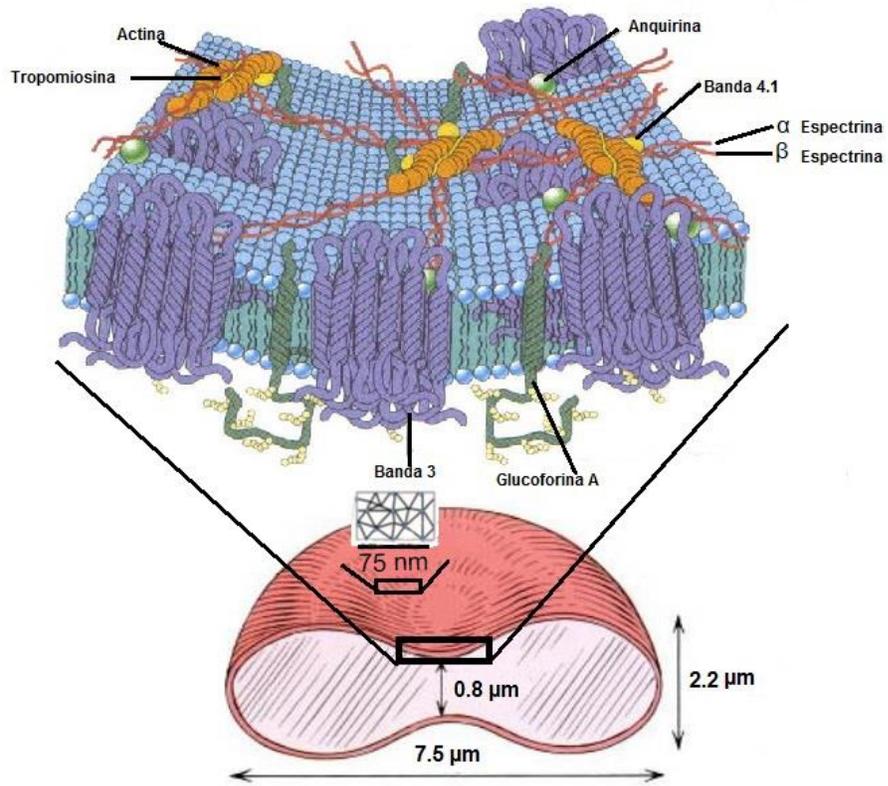


Figura 6. Esquematización de un glóbulo rojo.
 Geometría de un eritrocito sano (discocito), en la parte media la red de espectrina y su dimensión en 2D de la conectividad de la red de espectrina.

Técnicas para el Estudio de Glóbulos Rojos

Las técnicas convencionales de laboratorio han permitido identificar y clasificar patologías relacionadas con la estructura y forma de los GRs. El tamaño de los GRs se identifica mediante el VCM, obtenido por la biometría hemática y se dividen en micro, normo y macrocitosis. La microcitosis (VCM menor de $80 \mu\text{m}^3$) es un parámetro representativo para las anemias sideroblástica, ferropénica, por enfermedad crónica y deficiencia de globina (talasemia). La macrocitosis (VCM mayor a $100 \mu\text{m}^3$) está asociada a anemias no megaloblástica (hepatopatía crónica) y megaloblástica (deficiencia de vitamina B₁₂, deficiencia de ácido fólico y neoplasia). También existen anemias normocíticas (VCM de 80 a $100 \mu\text{m}^3$) como la hemolítica, aplásica, hipercelular, neoplasia, etc. (Rodak, 2005). Sin embargo, sigue siendo difícil clasificarlas. La forma se determina mediante la observación de frotis sanguíneo mediante la tinción azul de metileno u otro. Entre las formas reportadas se encuentran los codocitos, esferocitos, ovalocitos, equinocitos y dacrocitos (Murillo & Pérez, 2014).

La Hb es una proteína formada por un heterotetrámero de dos cadenas α_2 y dos cadenas β_2 . Las subunidades α y β se relacionan con la mioglobina (Mb) en estructura. La Mb es la proteína fijadora de oxígeno del músculo, mientras que la Hb funciona como un sistema sofisticado para la entrega de oxígeno desde los pulmones a los tejidos donde se requiere. El grupo Hemo es el componente de cada subunidad donde se asocia de forma reversible la molécula de oxígeno (O_2). La concentración de Hb en los eritrocitos se determina por análisis hematológico. Para obtener una mejor clasificación de las patologías eritrocitarias se requiere conocer no solo la concentración de Hb, el VCM y la observación de la morfología, además se complementa con la concentración de hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) y hematocrito (Hto). Para más información referente a morfología, función y patologías se puede consultar el apéndice D1.

La membrana citoplasmática de los GRs ha sido utilizada como modelo de estudio en diversas patologías. Esto ha permitido no solo el desarrollo de nuevas y sofisticadas técnicas, también adiciona mayor información acerca de los procesos celulares en condiciones saludables y patológicas (Escorza & Salinas, 2006). El análisis de la estructura celular permite la identificación y clasificación de patologías (S. Chen, Zhao, Wu, Yao, & Zhang, 2012).

Simulación de Imágenes de Glóbulos Rojos Patológicos y Saludables

Durante años, el análisis de imágenes biomédicas ha sido cada vez más importante en la investigación médica y obtención de diagnóstico. El uso de herramientas de procesamiento de imágenes resulta necesario sobre todo cuando las imágenes analizadas son muy numerosas o no tienen buena calidad de imagen (Ortiz, Torres, De Juan, & Cuenca, 2002). Khairy, Foo, & Howard (2010) utilizaron un enfoque computacional para el análisis cuantitativo de los cambios morfológicos de GRs expuestos a distintas concentraciones de Urea, NaCl y albúmina sérica bovina (BSA). La parametrización de los armónicos esféricos mostró que: (i) La asociación membrana-esqueleto (MS) es importante para la estabilización de la forma del GR contra perturbaciones tales como la composición asimétrica de lípidos en la membrana y puede proporcionar una explicación cuantitativa de las distintas formas del GR. También la interacción de los lípidos de la membrana y las proteínas estructurales del citoesqueleto pueden ser importantes en otras dismorfologías de células sanguíneas (poiquilocitosis hereditaria y esferocitosis). (ii) El citoesqueleto de la membrana realiza una función de homeostasis para mantener la integridad del eritrocito y el equilibrio celular (homeostasis) puede ser una gran función de la estructura del GR (figura 7).

Por otra parte, Peng et al. (2013) estudiaron las interacciones biomecánicas entre la MS en un GR mediante simulación mesoscópica (comienza el estudio en un nivel nanométrico y se extiende hasta unos cientos de micrómetros). Trataron a la bicapa lipídica y citoesqueleto por separado desarrollando un modelo de “dos componentes”, para un único GR, utilizando la Dinámica de Partículas Disipativas (DPD). El modelo de dos componentes demostró ser capaz de incorporar energía elástica y de cizallamiento, las interacciones tangenciales y viscosidades de la membrana lipídica y citoesqueleto por separado. Lograron cuantificar la deformación del citoesqueleto y la estimación directa de fuerza de interacción entre la bicapa lipídica y citoesqueleto a nivel molecular. La determinación de fluctuaciones de la membrana del GR proporciona una capacidad de diagnóstico para evaluar la salud o estado patológico de todo el GR.

Asimismo, Lei & Karniadakis (2012) emplearon un modelo a multiescala por DPD para modelar GRs falciformes (forma de hoz) y sanos. El modelo considera al GR como una red de enlaces viscoelásticos combinando los parámetros de energía de flexión, restricciones de superficie y volumen. El modelo determinó las propiedades mecánicas

de diferentes morfologías celulares en 3D que correspondían a las formas típicas observadas por SEM| Microscopio Electronico de Barrido)de GRs falciformes. Además, se cuantificaron los diferentes grados de distorsión de las distintas formas durante la transformación del GR sano hasta la forma de hoz, obteniendo resultados consistentes con las observaciones de imágenes médicas, con lo cual construyeron tres formas típicas simuladas de las células falciformes (figura 8). Sus propiedades reológicas revelaron un efecto profundo en la rigidez de la membrana celular durante el procedimiento de desoxigenación y los resultados simulados del flujo de cizallamiento de las diferentes etapas de las formas del GR falciforme indicaron que la morfología celular influía en los valores de viscosidad de cizallamiento. Sus resultados de simulación validan la dependencia de la reología de SS-GRs sobre la morfología celular.

Por ultimo, se han analizado tres características geométricas para distinguir siete formas de GRs de pacientes con anemia (codocitos, equinocitos, en forma de lágrima, eliptocito, en forma de hoz, estomatocitos, hipocrómicos) y sanos (forma normal): la descripción de Fourier, el aspecto de radio y los momentos (Ali, Ahmad, George, Der, & Aziz, 2013). En conjunto con la medición de la distancia “city block” lograron calcular las similitudes de las imágenes de GRs obtenidas comparadas con valores de referencia ya establecidos en una base de datos. Este método compara y clasifica las similitudes de las imágenes mediante la distancia entre dos píxeles conectados, esta información permite hacer un conjunto de valores de identidad para cada forma celular en una base de datos. Las células analizadas se dividieron en dos grupos: esféricas (codocitos, estomatocitos e hipocrómicos) y no esféricas (equinocitos y en forma de lágrima, eliptocitos y hoz). El estudio reveló que la combinación de las tres características geométricas (Descriptores de Fourier, momentos y la relación de aspecto) comparadas entre sí con la medición de la distancia “city block” proporciona un alto poder de discriminación aproximado del 98%. Con esto demostraron que los sistemas automatizados de reconocimiento de imágenes proporcionan ventajas significativas para el análisis en la medicina dado a que las células tienen forma, color y tamaño diversos que son difíciles de clasificar por los sistemas automatizados convencionales.

Estas metodologías de simulación han logrado clasificar las formas de GRs patológicos y han dado paso a los programas de análisis de imágenes, los cuales están siendo utilizados en los procesamientos de caracterización de imágenes.

Microscopía de Fuerza Atómica en el Estudio de Glóbulos Rojos

La AFM es una revolucionaria herramienta analítica de alta resolución que permite observar detalladamente la topografía de superficies con una resolución que puede alcanzar la escala nanométrica o nivel atómico, molecular o macromolecular, por lo que ha sido un instrumento esencial en el campo biomédico.

La AFM permite el análisis de células en medios muy cercanos al fisiológico, sumergidas en líquidos, aire o vacío (Haugstad, 2012; Ortiz et al., 2002; Parot et al., 2007; Shih, King, & Pu, 1995). La caracterización de GRs ha permitido profundizar en la estructura celular con mayor fidelidad para diferenciar células en condiciones normales de las que presentan alteraciones patológicas, gracias a la caracterización de obtenida. La AFM ha ido incrementando sus aplicaciones en el área biomédica y tiene la ventaja de acoplarse con otras metodologías, permitiendo obtener imágenes de alta resolución.

La capacidad de la AFM para la detectar simultáneamente aspectos topográficos y micro-mecánicos expande la caracterización celular por múltiples parámetros en un análisis sencillo (Francis, Lewis, Wright, & Conlan, 2010). Como consecuencia, la AFM introduce nuevas metodologías de estudios y conceptos para determinar la “salud” celular.

Propiedades mecánicas y topográficas

Las capacidades de la AFM se han expandido rápidamente más allá de la obtención de imágenes topográficas, ahora permite el análisis de una amplia gama de diversas propiedades en distintos materiales incluyendo tejido humano. Esta apertura de métodos permite que investigadores realicen estudios especializados sobre los GRs. La caracterización nanomecánica es adecuada para tener una mejor percepción de como las biomoléculas individuales involucradas en los complejos y tejidos biológicos son capaces de producir propiedades a macroescala (Kurland, Drira, & Yadavalli, 2012).

Para empezar, Nowakowski, Luckham, & Winlove (2001) realizaron una exploración topográfica (morfológico y de perfil lineal) de GRs sanos y esferocitos caracterizada por AFM. Encontraron que los esferocitos tenían mayor altura que los GRs sanos pero el mismo diámetro. En cuanto a la morfología, los esferocitos mostraban

depresiones de diferentes profundidades, tamaños y longitudes, y las células normales presentaban depresiones con tamaño, profundidad y longitudes muy homogéneas. Sugieren que las depresiones de menor tamaño encontradas en la superficie de esferocitos corresponden al debilitamiento de la unión de la membrana con la espectrina y depresiones de mayor tamaño al rompimiento de los punto de anclaje del citoesqueleto a las proteínas integrales de la membrana plasmática.

Además, en otro estudio se realizó un análisis topográfico *in situ* y se obtuvieron las propiedades mecánicas de los GRs (esferocitos versus normocitos) con el uso de dos puntas, estándar y “super-tip” (punta estándar que contiene unida una fibra muy fina de carbono), con las cuales caracterizaron y analizaron los efectos de compresibilidad (cambio de volumen como respuesta a la variación de presión o tensión media) sobre la superficie de los GRs. Y por otro lado hicieron uso de la técnica de modulación (la punta oscila a baja frecuencia de 5 kHz y una amplitud de 1nm) para una mejor medición. Demostraron que la “super-tip” ofrece una mejor resolución, debido a que disminuyó el error en las dimensiones de las imágenes caracterizadas. Los efectos de compresibilidad y la técnica de modulación sobre la superficie celular exhibieron que el citoesqueleto está directamente anclado debajo de la membrana y permiten medir sus propiedades mecánicas. Los esferocitos presentaron un debilitamiento en el anclaje de su membrana con el citoesqueleto y mostraban que las depresiones formadas en la superficie eran resultado de esta pérdida de unión membrana-citoesqueleto (Nowakowski & Luckham, 2002).

Posteriormente, Y. Chen & Cai (2006) contribuyeron a la medicina forense mediante un análisis de GRs caracterizados con AFM en modo “tapping” con la estimación del momento de muerte. La muestra fue depositada en la superficie de una mica y fueron fijadas al aire, la mica se montó en la platina del AFM durante 5 días (humedad de 75%, temperatura 25°C) y se llevó a cabo el seguimiento del cambio morfológico de los GR. Observaron deformaciones de la superficie y la ultraestructura celular en distintos lapsos de tiempo desde 0.0 – 0.5 días. Se observaron cambios en la ultraestructura superficial como la aparición de fisuras, la contracción de las células y especialmente protuberancias en escala nanométrica. Con esto demostraron que la AFM es una técnica potencialmente poderosa para auxiliar en la ciencia forense.

Por otra parte, Kozlova et al. (2014) estudiaron la topografía, a micro y nanoescala de la membrana de GRs expuestos a distintas concentraciones de hemina, para observar las deformaciones ocasionadas por el rompimiento de los puntos de unión entre las proteínas del citoesqueleto y la membrana celular. La exposición de los GRs a las distintas concentraciones de hemina provocó dos tipos de formas celulares, equinocitos y esferocitos. Los equinocitos presentaron una separación de 120 – 200 nm entre los “granos” producidos por la acción de la hemina (a baja concentración) la cual provocó un debilitamiento y quebrantamiento entre la proteína 4.1 y la espectrina. Los esferocitos presentaron estructuras planas y convexas en la membrana, inducido por la alta concentración de hemina. La hemina causa una transformación de tetrámeros en los dímeros de espectrina. Los dímeros de la espectrina pierden su enlace estructural y se acortan. El acortamiento y entrecruzamiento de los filamentos de espectrina forman una vesiculación hacia el exterior de la membrana. (figura 9).

También M. Girasole et al. (2000) indujeron cambios morfológicos en GRs normales tratados con nifedipina a diferentes concentraciones y tiempos de incubación. El efecto fue caracterizado en modo NC-AFM. Describieron con un análisis cuantitativo los cambios morfológicos de la membrana y la estructura completa de los GRs bajo el efecto de la nifedipina. Observaron que se formaron células equinocitos a las cuales se les realizaron un perfil lineal de sus espículas y también obtuvieron el cambio de rugosidad sobre la membrana. Explicaron que la nifedipina se inserta en la capa externa de la membrana del GR, pero no logra ser translocada al interior de la membrana. Sin embargo, indujo un proceso de vesiculación causando la aparición de espículas. Las imágenes obtenidas con la AFM orientaron a una mejor clasificación de estas células patológicas. Posteriormente, continuaron su trabajo analizando el efecto morfológico sobre eritrocitos tratados con agentes químicos (incluyendo algunos métodos de tinción y fijación de uso común); los datos revelaron que las sustancias químicas implicadas en los métodos de preparación de muestra pueden generar distintas distorsiones en la célula (M. Girasole et al., 2001).

En otros estudios sobre la dinámica y las propiedades mecánicas de las células asociadas a distintos eventos celulares (incluyendo patologías) tales como la diferenciación, el envejecimiento, la activación fisiológica y electromotilidad; se recolectaron datos respecto al módulo de Young de GRs. Para los eritrocitos sanos este valor fue de 11 a 14 E (kPa), 22 a 64 E (kPa) en la esferocitosis hereditaria, talasemia y

deficiencia de G6PD. Hicieron hincapié de que la AFM es una herramienta efectiva para el estudio de las propiedades de la membrana y submembrana. También abordaron que la elasticidad celular puede ser efectiva para investigar las características y dinámica del citoesqueleto (Kuznetsova, Starodubtseva, Yegorenkov, Chizhik, & Zhdanov, 2007).

Finalmente, Li et al. (2012) investigaron las propiedades mecánicas de los GRs en condiciones normales y con ello, lograron identificar los cambios durante un proceso patológico. Con el uso de microesferas unidas a la punta del cantiléver en modo tapping obtuvieron valores del módulo de Young de GRs de 0.1-0.2 kPa, los cuales fueron pequeños debido a la elasticidad de la membrana del GR. Esta elasticidad permite que los eritrocitos atraviesen los capilares más estrechos para lograr transportar el oxígeno hacia donde el cuerpo lo requiera. La AFM no solo puede ser capaz de obtener imágenes de alta resolución, sino que también es adecuada para resolver ciertas cuestiones biológicas y biomédicas, como por ejemplo en el reconocimiento de moléculas individuales.

En un estudio reciente de Zhang, Liu, Zhang, & Wang (2014), se analizaron eritrocitos irradiados con iones de carbono (CIR) mediante AFM para obtener las imágenes y propiedades mecánicas. La caracterización se llevó a cabo en modo C-AFM. La punta que utilizaron, además de ser sensible a los cambios de superficie y propiedades mecánicas, permitió diferenciar la deformación de la superficie y contribuyó al contraste de imagen de AFM. Observaron que la CIR sobre los GRs induce cambios notables en la composición y reorganización de la espectrina $\alpha 1$ del citoesqueleto. Además, se afecta la tensión o estrés local que resulta en un cambio de la microestructura topográfica y propiedades mecánicas (rigidez celular) durante el proceso de remodelación morfológica. Proponen que dicha proteína (espectrina $\alpha 1$) podría ser utilizada como un biomarcador para detectar la deformación de la membrana y cambios profundos dentro del eritrocito.

Rugosidad

Un concepto que se ha sumado para correlacionar la salud de la membrana del eritrocito es la rugosidad. El estudio de la rugosidad de los eritrocitos considera los siguientes puntos: 1) El valor de la rugosidad de la membrana se puede considerar constante en toda la superficie de la célula (debido a que los valores obtenidos son muy

cercanos entre sí y, como consecuencia el promedio de una R_{rms} determinada puede ser considerada como una marca para la identificación del GR; 2) Como cada célula de una muestra es marcada con un solo valor de R_{rms} el promedio del valor de R_{rms} de todas las células permiten resumir la propiedad de rugosidad de toda la muestra; 3) El valor de R_{rms} de una muestra con diferentes formas celulares (codocitos, esferocitos, etc.) está ligada a una información más intrínseca y profunda de las diferentes estructuras morfológicas (Marco Girasole et al., 2012; M. Girasole et al., 2010).

Se evaluó la rugosidad por AFM de la membrana de GRs de pacientes con esferocitosis hereditaria y sanos. Los GRs fueron sometidos a técnicas de tinción de uso común en el laboratorio clínico y tratamientos de secado SEM bajo distintas condiciones experimentales. Dos modos fueron usados para la caracterización, IC-AFM y C-AFM, a temperatura ambiente y humedad relativa de 30%. Demostraron que el valor de R_{rms} incrementa al aumentar el área de escaneo. También desarrollaron protocolos basados en utilizar el valor de R_{rms} de la membrana plasmática de los GRs como un parámetro morfológico independiente de la forma celular (M. Girasole et al., 2010). En un estudio posterior, se dio seguimiento al fenómeno de envejecimiento celular al observar que la rugosidad se ve disminuida drásticamente con la edad del eritrocito. Estos resultados proporcionaron un marco de referencia para futuros estudios dirigidos al desarrollo de mejores condiciones de conservación y tratamiento de células. La finalidad fue reducir los efectos secundarios en transfusión de sangre (Marco Girasole et al., 2012).

Otros autores analizaron alteraciones en la ultraestructura de las membranas de GRs deficientes de Glucosa-6-fostado deshidrogenasa (G6PD) con AFM en modo IC-AFM. Utilizaron una punta de nitruro de silicón (altura 30 μm , anchura de 32 μm , un espesor de 0.3 μm , frecuencia de oscilación de 400 kHz y constante de fuerza de 4N/m). El AFM fue irradiado con luz ultravioleta durante 15 min para eliminar los contaminantes. Midiéron la Rugosidad media aritmética (R_a), Rugosidad media cuadrática (R_q) y el módulo de Young en áreas de escaneo de 1 x 1 μm con 256 X 256 píxeles y 1,95 Hz. Observaron un cambio significativo en los GRs con deficiencia de G6PD; donde el módulo de Young calculado fue tres veces mayor al de las células normales. Indicando con esto que cierta población de GRs presenta grandes alteraciones en la estructura del citoesqueleto. La rugosidad de los GRs con deficiencia de G6PD se incrementa significativamente ante los controles de GRs. Esto proyecta un reordenamiento de la

composición lipídica, la alteración en la estructura y el estado funcional de la membrana (Jia Tang et al., 2015).

Comparación de AFM con técnicas convencionales

Otra parte integral es la búsqueda de la correlación entre estudios de diagnóstico convencionales con la AFM. Maciaszek & Lykotrafitis (2011) emplearon la técnica de AFM para medir la rigidez de GRs humanos anormales de sujetos con el genotipo de células falciformes. Compararon el módulo de Young y determinaron que los eritrocitos patológicos fueron aproximadamente tres veces más rígidos que los normales. Esto indica el efecto de la polimerización de la hemoglobina falciforme; así como, posibles cambios en la organización del citoesqueleto celular asociados con la patología.

Anteriormente, se realizaron análisis de la forma, tamaño, anchura y espesor de GRs de pacientes que sufrieron una esplenectomía. Compararon el VCM versus el volumen corpuscular medio inmovilizado (VCMI) y AS medidos con AFM, encontrando que existe una estrecha correlación con los parámetros de rutina obtenidos en un laboratorio clínico (O'Reilly, McDonnell, & O'Mullane, 2001).

Mukherjee, Saha, Routray, & Chakraborty (2015) realizaron una revisión de las diversas aplicaciones de la AFM en la caracterización topográfica de los GRs. De la información recolectada hicieron énfasis del papel de la AFM: i) la formación de imágenes de la estructura de los GRs con resolución molecular (o incluso submolecular); ii) el estudio de fijación al aire y vacío dentro de una gran gama de temperaturas; iii) llevar a cabo estudios en condiciones fisiológicas con la posibilidad de cambiar los parámetros de pH o la fuerza iónica, que imita la dinámica de vida en tiempo real dentro del cuerpo humano y, iv) la cuantificación de las propiedades biofísicas y mecánicas de la superficie (rugosidad, la adhesión, la rigidez, elasticidad) y las fuerzas intermoleculares. Toda esta información que han recopilado indica que no hay duda de que la AFM se aplicará en un futuro para hacer frente a cuestiones biológicas sin resolver respecto de los GRs. Sugieren que se necesita más investigación para hacer el uso de AFM más amigable para que permita un diagnóstico directo y una evaluación de las enfermedades hematológicas.

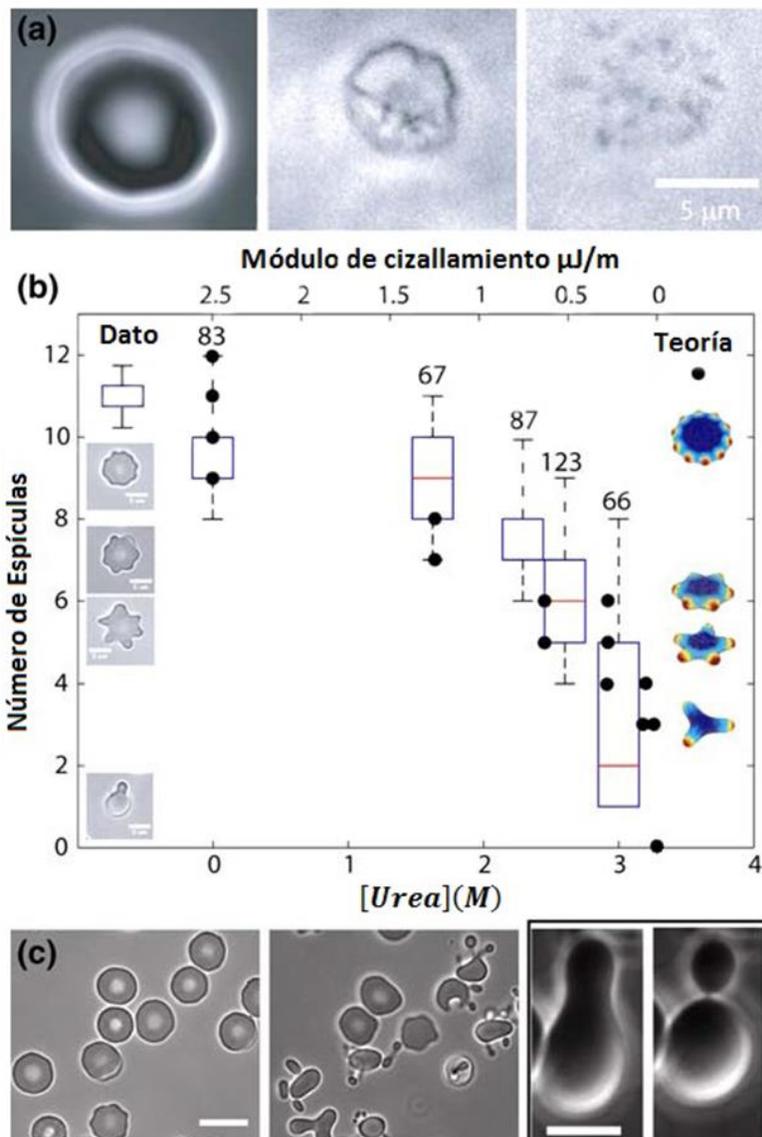


Figura 7. Cambios de la forma eritrocitaria por la exposición a diferentes concentraciones de urea. (a) De izquierda a derecha se observa un eritrocito discoide, se va removiendo la membrana Tritón X-100 (imágenes por microscopía de fase de contraste). (b) Los diagramas de caja muestran el número de espículas de los equinocitos tipo I como una función de la concentración de urea. (c) El efecto de urea en discocitos bajo diferentes concentraciones de NaCl de izquierda a derecha eritrocitos en solución fisiológica y después de aumento con urea y NaCl hasta que se convierten en una célula en forma de lágrima y luego se divide en vesículas.

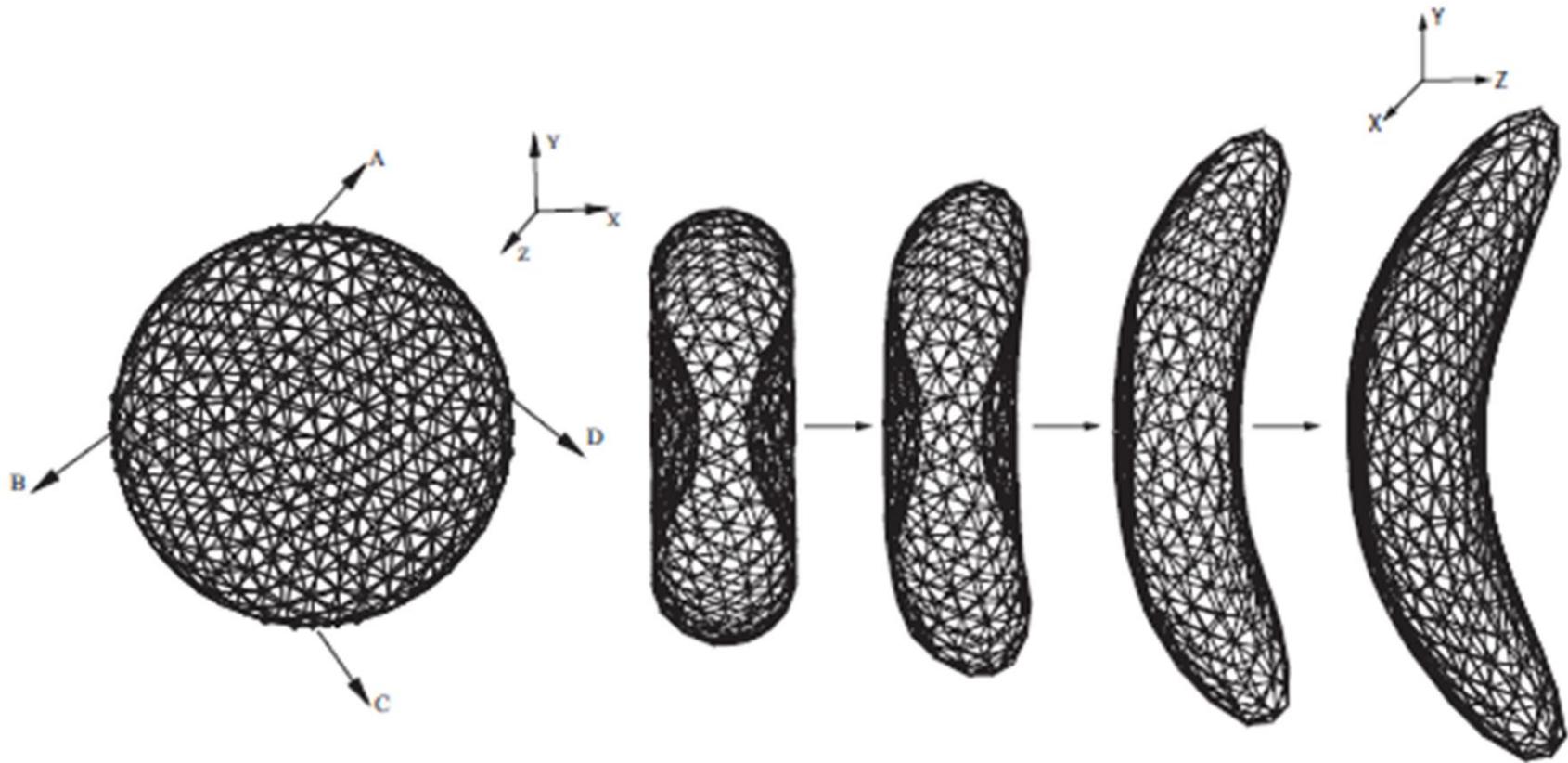


Figura 8. Simulación en malla triangulada durante la transformación morfológica de un glóbulo rojo sano a hoz. (Izquierda) malla triangulada de glóbulos rojos. A, B, C y D son los sellos que representan los cuatro puntos de anclaje donde se aplica la fuerza de estiramiento. (Derecha) instantáneas sucesivas de un GR durante su transición morfológica a la forma de hoz.

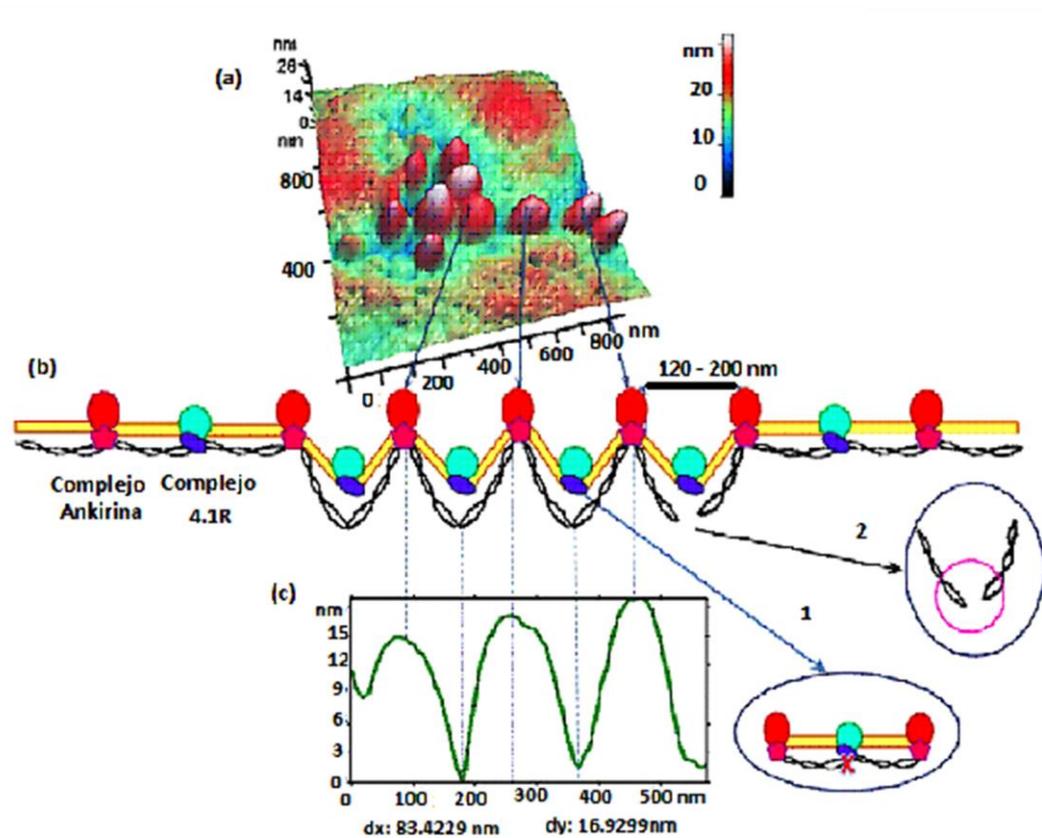


Figura 9. Modelo de las interacciones entre las proteínas de la membrana.

(a) Con la AFM se pudo observar cómo se debilitó la membrana ocasionada por la acción de hemina, esto es un mecanismo de aparición de defectos topológicos de granos que corresponden a los círculos en (b), los complejos de proteína 4.1R descienden a nivel local y los complejos de anquirina se quedaron en la superficie. La hemina es capaz de alterar la conformación de espectrina. De acuerdo con este mecanismo el período de espacio entre los “granos” se trata de 120- 200 nm (b y c).

JUSTIFICACIÓN

La microscopía de fuerza atómica posee una resolución de imagen a nano escala y potencial de realizar múltiples mediciones morfométricas con una extraordinaria precisión, entre ellos el método de grano el cual podría proporcionar mayor confiabilidad numérica del área y volumen en la clasificación de micro y macrocitosis al mismo tiempo que se realiza un análisis morfológico con una fina resolución estructural. En la clínica el Volumen Corpuscular Medio es utilizado como método de rutina para la clasificación de anemias micro y macrocitosis. Sin embargo, múltiples factores de procesamiento y otras patologías causan interferencias en los analizadores hematológicos, por lo que es necesario complementarse con un análisis morfológico por microscopía convencional.

HIPÓTESIS

Las propiedades morfométricas de glóbulos rojos, particularmente la rugosidad medida por microscopía de fuerza atómica, permite la discriminación entre las diferentes morfologías celulares en anemias macrocíticas y microcíticas.

OBJETIVOS

General

Identificar y cuantificar las características morfométricas (tamaño, forma, área superficial: volumen corpuscular medio) y la rugosidad de la membrana de los GRs con morfología microcítica y macrocítica como indicadores de una patología utilizando los métodos ASS, ASG y VGC.

Particulares

- Obtener imágenes de la superficie de los GRs patológicos y sanos usando el AFM.
- Determinar las características morfométricas (tamaño y forma) de los GRs.
- Utilizar dos métodos de evaluación para obtener el área superficial (ASS y ASG) y volumen VGW de los GRs basado en la morfométrica del AFM.
- Correlacionar el AS obtenido por los métodos de superficie y grano con los valores de VCM obtenido de la BH.
- Determinar la rugosidad de la membrana de los GRs con microcitos y macrocitos.

METODOLOGÍA

Selección de Donadores

En este trabajo se utilizaron muestras de sangre donadas de manera voluntaria y bajo el consentimiento informado de sujetos en el Instituto Mexicano del Seguro Social número dos (IMSS) de Hermosillo, Sonora.

Criterios de Inclusión

- Cumplir con los criterios de inclusión y exclusión de los donadores de banco de sangre establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012.
- Las muestras de sangre fueron clasificadas de la siguiente manera:
- VCM menor de $80 \mu\text{m}^3$ para la microcitosis.
- VCM mayor de $100 \mu\text{m}^3$ para la macrocitosis.
- VCM entre 80 a $100 \mu\text{m}^3$ para las muestras normocíticas.

Recolección de Muestras

La sangre se obtuvo por venopunción, y fue colectada en tubos al vacío que contienen anticoagulante (EDTA, ácido etilen-diamino-tetraacético). Las muestras incluyen donadores voluntarios (diagnosticados con micro y macrocitosis, así como normocíticos) del banco de sangre del IMSS de Hermosillo, Sonora. Los tubos fueron transportados en un contenedor especial para muestras biológicas después de la recolección.

Preparación del Frotis Sanguíneo

Se realizó un extendido de sangre periférica (frotis). Se colocó una gota de sangre de (10 a 20 μl) en un extremo del portaobjetos, utilizando un segundo portaobjetos para deslizar la misma sobre el vidrio. Después se dejó secar al medio ambiente por aproximadamente 10 minutos (Carr & Rodak, 2010).

Obtención de Imágenes por Microscopía de Fuerza Atómica

Se obtuvieron imágenes topográficas de los GRs en cada una de las muestras macro, micro y normocítica. Estas topografías se realizaron en modo de NC-AFM en la AFM de áreas de escaneo 25, 50 y 100 μm a una velocidad de escaneo de 1Hz con el cantiléver Si (PPP-NCHR3M) con una anchura de 30 μm , espesor 4 μm , longitud 125 μm , constante de fuerza de 42 N/m y frecuencia de 330 Hz.

Análisis de Imágenes Caracterizadas con el Software XEI

Las muestras caracterizadas fueron analizadas con el Software XEI. XEI es un programa de software que proporciona herramientas fáciles de usar y dinámicas para el procesamiento de imágenes, el análisis cualitativo y cuantitativo, estadística, exportación e impresión de imágenes procesadas y resultados de las mediciones (Corporation, 2011).

Clasificación de Glóbulos Rojos

Clasificación por Volumen Corpuscular Medio

Se realizó un análisis estadístico del VCM, Hb y HCM obtenido en la Biometría hemática (BH) proporcionada por el banco de sangre y se clasificaron en macrocitosis y microcitosis. Para medir el VCM se obtuvo la muestra de sangre periférica total con EDTA, la cual se mantuvo en agitación constante, y se colocó en la parte de toma de muestra del analizador hematológico ABX MICRO ES 60 HORIBA (Micro 60 OT 806OT85549), el cual solo aspira 10 μl de sangre. Los valores de VCM para las muestras normales se encontraron entre los rangos normales (80 a 100 μm^3), (menor a 80 μm^3) para las microcitosis y (mayores de 100 μm^3) para las macrocitosis. También se tomaron en cuenta la concentración de Hemoglobina (Hb) y la Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM). Todos los datos fueron capturados en la base de datos Microsoft Excel.

Clasificación por Área Superficial (AS)

Se efectuó una reclasificación de las muestras en microcitosis, normocitosis y macrocitosis mediante el AS utilizando las metodologías de Superficie y de Grano. Se analizaron 150 células con microcitosis, macrocitosis y normocitosis de imágenes obtenidas con la AFM en modo NC-AFM, con áreas de escaneo de 100 X 100 μm . Las dos metodologías fueron comparadas entre sí.

Área Superficial por el Método de Superficie (ASS)

Se obtuvo el ASS de los GRs indirectamente de las imágenes topográficas con área de escaneo de 100 X 100 μm en modo NC-AFM con la AFM. La célula analizada fue colocada dentro del área del rectángulo verificando que estuviera toda la célula dentro y no excediera su área. Cada valor arrojado por el programa se contuvo en una base de datos para su análisis numérico (figura 10).

La población celular fue de 450 células (150 células para cada caso “microcitosis, normocitosis y macrocitosis” clasificados por el VCM). Con el programa Origin 9 se realizaron los cálculos estadísticos promediando valores por normo, micro y macrocitosis, así como el comportamiento gráfico. Por último se realizó un análisis descriptivo de los datos y se establecieron los rangos con un intervalo de confianza del 95% con el software Prisma 6.

Área superficial y Volumen por el Método de Grano Mediante Detección de “Cuencas” (ASGc y VGW)

Fueron analizadas imágenes de eritrocitos con áreas de 100 X 100 μm . Una vez habilitado la vista de grano se seleccionó el método de detección por “Cuencas” utilizando distintos niveles de filtros. Las células seleccionadas se diferenciaron en colores y el programa determinó el área superficial y volumen para dichas selecciones (figura 11). Se excluyeron las células que se sobreponían o se encontraban incompletas en el área caracterizada. Se sumaron las áreas superficiales y volumen (valores arrojados por el programa XEI) en las células que tenía más de un valor, para obtener un solo valor de área superficial y de volumen. Con el programa Origin 9 se calculó el promedio por microcitosis, normocitosis y macrocitosis así como el comportamiento gráfico. Por último

se realizó un análisis descriptivo de los datos y se establecieron los rangos con un intervalo de confianza del 95% con el software Prisma 6.

Caracterización Morfológica de Glóbulos Rojos Basada en la AFM

Se realizó una exploración de los frotis de microcitosis, macrocitosis y normocitosis (microscopio invertido, 40x). Se obtuvieron imágenes de AFM para observar a detalle la topografía de los GRs. Las características morfológicas de los GRs (distribución de tamaño y forma) fueron cotejadas con las descripciones establecidas para los GRs (Renu, Pati, & Mahapatra, 2012). El análisis consistió en la observación de las imágenes en 2D y 3D, además de un análisis por variación de colores que proporciona el programa XEI.

Perfil Lineal

Se analizaron imágenes caracterizadas de GRs con la AFM en modo de NC-AFM en área de 50 μm . Se utilizó el tipo de línea "slanted line" para medir altura, diámetro y obtener sus parámetros estadísticos, esta nos permitió realizar un análisis de la célula completa (figura 12). El otro tipo de línea fue "Slanted average line" con la cual obtuvimos las alturas promedio de la zona central del eritrocito (biconcavidad) (figura 13). Para el análisis morfométrico se trazó la línea "slanted line" a una distancia mayor al tamaño del GR y se midió la altura y diámetro de cada célula con la aplicación "flechas"; a estos parámetros se les restó la altura del plasma para obtener la altura exacta de la célula. En el caso de la concavidad se midió tanto su altura de profundidad como el diámetro. Los datos numéricos fueron recolectados y se realizó un análisis comparativo de alturas y diámetros tanto de la célula completa como su concavidad de cada forma existente en las muestras.

Se analizaron 5 células de cada forma celular encontrada. Las células fueron medidas en perfil lineal trazando varias líneas de un extremo a otro a través de la célula. También, se trazó una línea buscando la zona bicóncava de los eritrocitos, donde en caso de no existir, se recolectó la información encontrada. Para obtener la altura y el diámetro de cada célula, se hizo uso de la aplicación de "flechas", las cuales fueron colocadas de la base inferior derecha a la izquierda para obtener el valor exacto del diámetro; así como,

otro par de flechas colocadas desde la base inferior de la célula hasta el punto de mayor altura de la misma, con esto se obtuvo el valor delta en X y Y. Para la exploración de la búsqueda de la concavidad, se realizó una exploración sobre la parte superior del eritrocito, trazando una línea desde un extremo al otro de la zona cóncava en donde nuevamente se hizo uso de dos pares de flechas para obtener el delta en X y en Y. En caso de que existieran varias zonas cóncavas, estas se midieron por separado, y en caso de que no existiera zona cóncava se trazó la convexidad.

Rugosidad

Se analizaron imágenes de eritrocitos escaneadas en áreas de 50 X 50 μm para la obtención de alturas con el método de perfil lineal. Con la línea "Slanted line" se obtuvo la altura de esa línea trazada (para la célula completa como de su zona bicóncava) y "Slanted average line" solo fue usada para obtener las alturas promedio de toda la zona bicóncava. Estas alturas fueron recolectadas en una base de datos para medir la rugosidad. La rugosidad fue calculada con la (ecuación 2) anteriormente explicada.

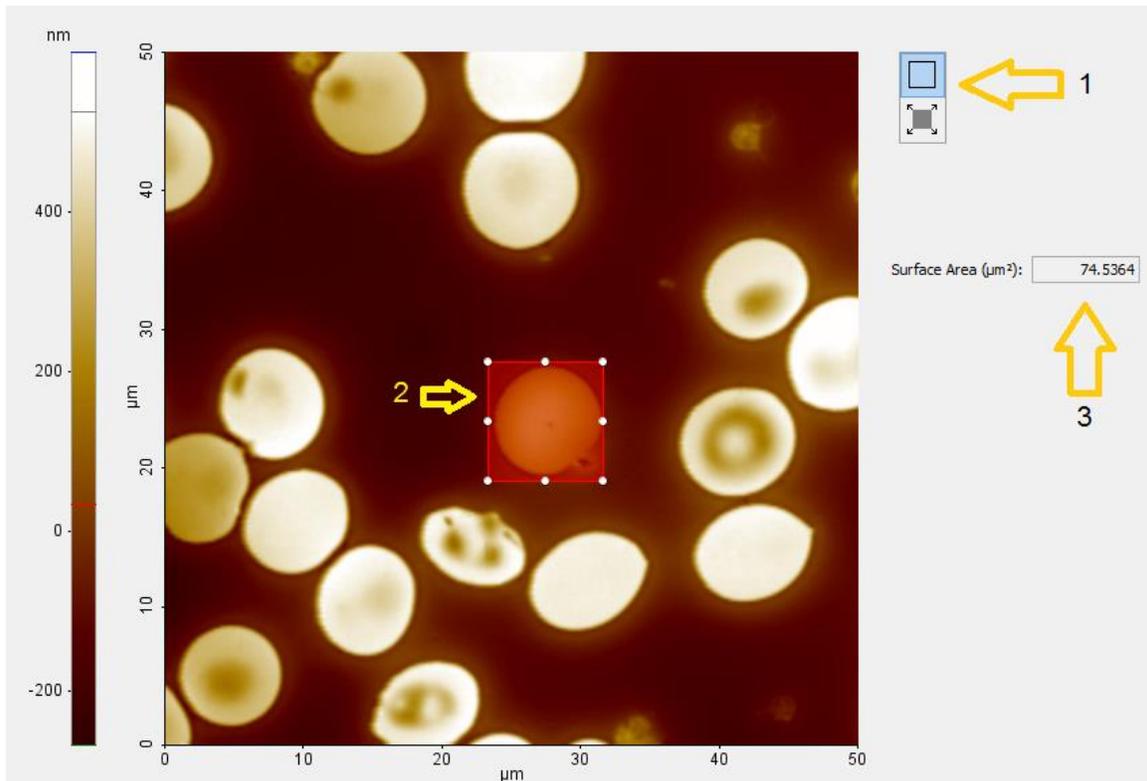


Figura 10. Determinación del AS por el método de superficie.
Se realizó en el programa XEI y el área de escaneo fue de 50 X 50 μm. Al seleccionar la célula utilizando un recuadro nos arroja el valor del área en μm².

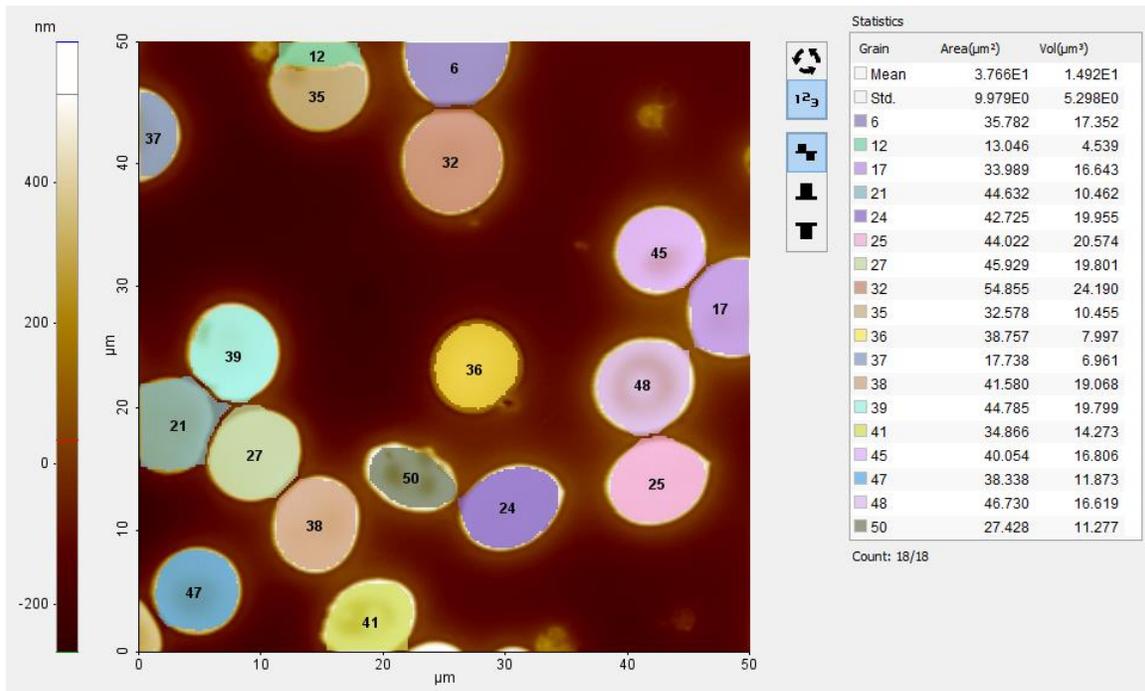


Figura 11. Determinación del AS y Volumen (VGW) por método de grano. Se realizó en el programa XEI en imágenes de 50 X 50 μm . El algoritmo selecciona cada célula y el programa arroja los valores de AS y VGW (μm^2 y μm^3).

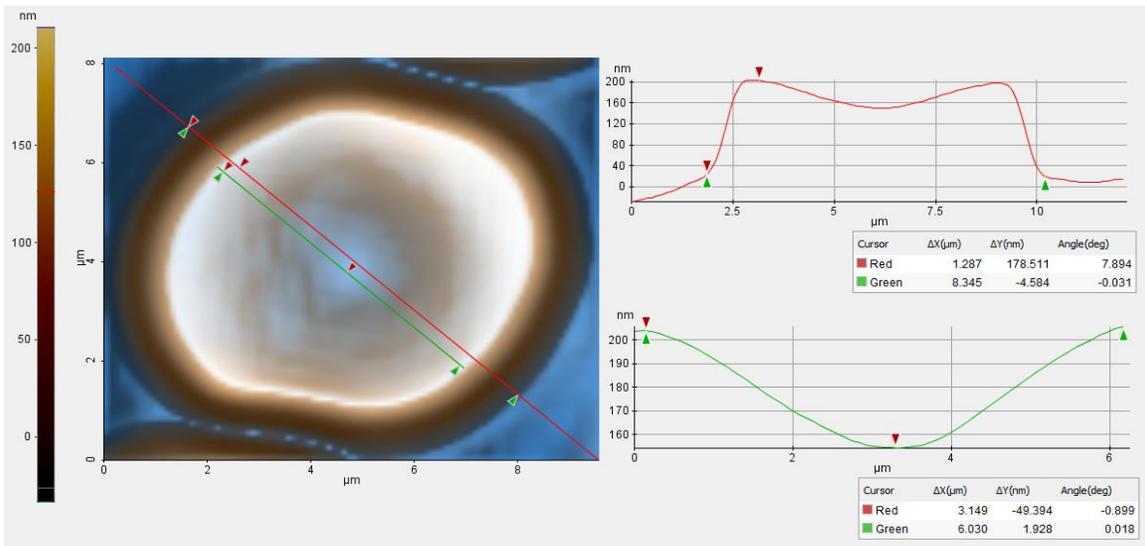


Figura 12. Análisis del perfil de línea (Slanted line) celular. El programa XEI permite el análisis directo del perfil celular utilizando dicha herramienta. Al lado derecho se muestra el perfil topográfico de un normocito.

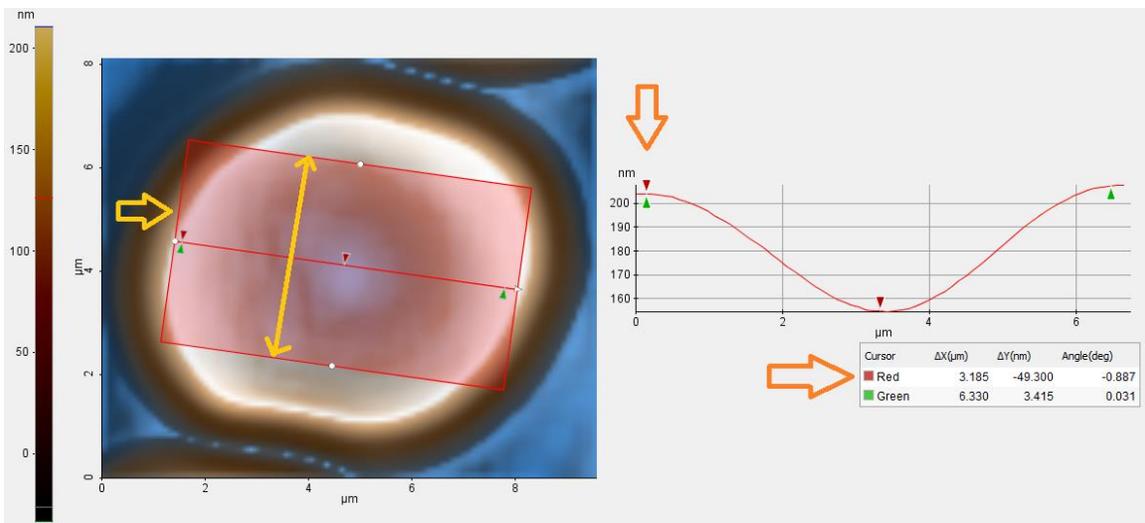


Figura 13. Perfil lineal mediante el método de línea promedio. El programa XEI permite el análisis directo del perfil celular utilizando dicha herramienta. Al lado derecho se muestra el perfil topográfico de un normocito.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Biometría Hemática

A partir de la BH se obtuvieron las concentraciones de Hb, HCM, CHCM y VCM. Los valores estadísticos se muestran en la figura 14 (Villamor & Esteban, 1993). La clasificación por cruces para la poiquilocitosis se explica en el apéndice D1.6.

En las muestras agrupadas como microcitosis se trató de células microcíticas hipocrómicas debido a su disminución de VCM y HCM. Aunque solo una presentaba disminución de Hb. En cuanto a la forma, dos muestras presentaban poiquilocitosis ligera (++) y poiquilocitosis moderada (+). La primera presentó codocitos (++) , ovalocitos (+) y esferocitos (+). Esto puede explicar la disminución de Hb. La segunda tenía células esferocíticas (++) y equinocitos (+) y su hemoglobina no estaba disminuida. Encontramos una muestra con esferocitosis marcada (+++) pero concentración de Hb normal.

Las muestras macrocíticas presentaron un VCM moderado y HCM normal (solo una con elevado HCM). Por lo que obtuvimos muestras macrocíticas normocrómicas y una sola macrocítica hiperocrómica. En las muestras macrocíticas normocrómicas encontramos una con células codocitos (+), otra con células equinocitos (+) y células sin alteraciones. Por otra parte la muestra macrocítica hiperocrómica no presentaba células alteradas pero si normocitos con muy poca concavidad.

Las células con VCM y HCM normales presentaron formas sin patologías. Solamente se observó una muestra con equinocito (+) lo cual se considera normal.

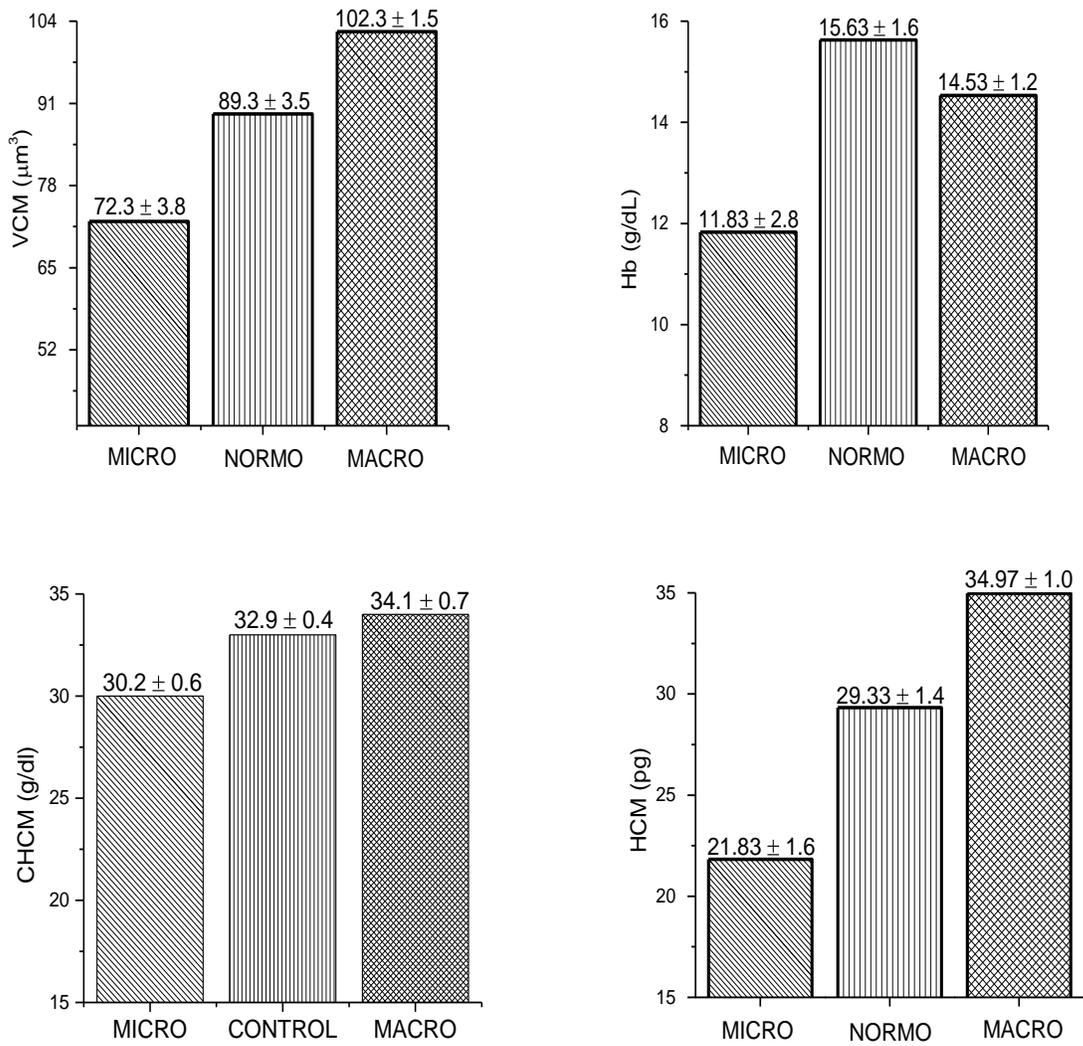


Figura 14. Concentración de VCM Hb, CHCM y HCM. Se obtuvieron a partir de la biometría hemática, los gráficos representan la media de las muestras analizadas utilizando el programa Origin 9.

Reclasificación de Muestras Mediante el Área Superficial y Volumen con AFM

El área superficial fue obtenida a través de dos ajustes, el análisis de superficie (ASS) y el de grano mediante detección de “Cuencas” (ASG) con el programa XEI de muestras caracterizadas basado en la AFM.

Área Superficial por el Método de Superficie (ASS)

Los valores promedios obtenidos para las muestras con microcitos fue de $74.51 \pm 10 \mu\text{m}^2$, los normocitos tienen una media de $80.38 \pm 8.7 \mu\text{m}^2$ y las macrocitos una media de $97.91 \pm 12 \mu\text{m}^2$. El análisis se realizó mediante una ANOVA de una vía ($p < 0.001$), la diferencia entre las medias se determinó mediante la prueba de Tukey's, donde se observó que todos los grupos son diferentes entre sí ($p < 0.001$).

Área Superficial por el Método de Grano Mediante Detección de “Cuencas” (ASGc)

El comportamiento de distribución del área superficial por el método de grano mostró que existen diferencias entre las muestras macro, micro y normocíticas. Los normocitos presentaron una ASG de $48.98 \pm 8.3 \mu\text{m}^2$, las microcitos de $46.78 \pm 9.6 \mu\text{m}^2$ y $59.72 \pm 9.8 \mu\text{m}^2$ para las macrocitos. En el análisis de ANOVA de una vía ($p < 0.001$), se encontraron que todas son diferentes entre sí ($p < 0.05$). Se realizó un análisis descriptivo de los datos y para establecer el rango con ambas metodologías utilizando un intervalo de confianza del 95%. Utilizando el ASS se consideran con microcitos a valores menores de $75 \mu\text{m}^2$ con valores normales entre 76 a $87 \mu\text{m}^2$ y macrocitos a valores mayores $88 \mu\text{m}^2$. En el caso de ASG, los rangos establecidos son menor de $47 \mu\text{m}^2$ para la microcitos, de 48 a $55 \mu\text{m}^2$ para valores normales y mayor a $56 \mu\text{m}^2$ en el caso de la macrocitos (tabla 1).

Nuestros resultados mostraron que ambos métodos son adecuados para determinar el AS mediante la AFM. En la figura 15 se muestra como el ASG tiene una distribución más uniforme que la que se observa en los datos obtenidos por el ASS. Con el ASS se obtuvo un comportamiento cercano al obtenido por O'Reilly et al. (2001), donde obtuvieron el valor de $69.8 \mu\text{m}^3$ para células en microcitos, $79.9 \mu\text{m}^3$ en GR normocíticos y $89.7 \mu\text{m}^3$ en macrocitos.

Los datos de ASG no han sido analizados por otros autores; sin embargo, al compararlos con nuestros valores de ASS presentan una correlación (figura 16). Esto se debe a que el método de grano por cuencas es un poderoso método de segmentación algorítmica de imágenes basado sobre la discontinuidad de los niveles de altura, que delimita de forma eficiente cada una de las células del frotis diferencial para su posterior análisis morfológico (C. Villacrez, 2011). En comparación con el método de superficie en el cual también toma en cuenta valores de superficie que rodea al eritrocito y no forma parte del mismo, ya que la metodología realiza un cálculo no discriminativo (Corporation, 2011). C. Villacrez (2011) analizó la morfología de multicapas nanométricas de Vanadio/Nitruro de Vanadio (V/VN) crecidas sobre un sustrato por el método de grano con el software AnaCe, el cual le permitió delimitar de forma eficiente cada uno de los granos de la multicapa, incluso aquellos muy pequeños que resultan difíciles de analizar. Estos valores de ASS son más cercanos al VCM de la BH.

Tabla 1. Valores de AS por Métodos de Superficie y Grano

Método	Microcitosis μm^2	Normales μm^2	Macrocitosis μm^2
Superficie	74.51 \pm 10	80.38 \pm 8.7	97.91 \pm 12
Grano	46.78 \pm 9.6	48.98 \pm 8.3	59.72 \pm 9.8

Rangos estadísticos establecidos de ASS y ASG

Superficie	< 75	76-87	> 88
Grano	< 47	48-55	> 56

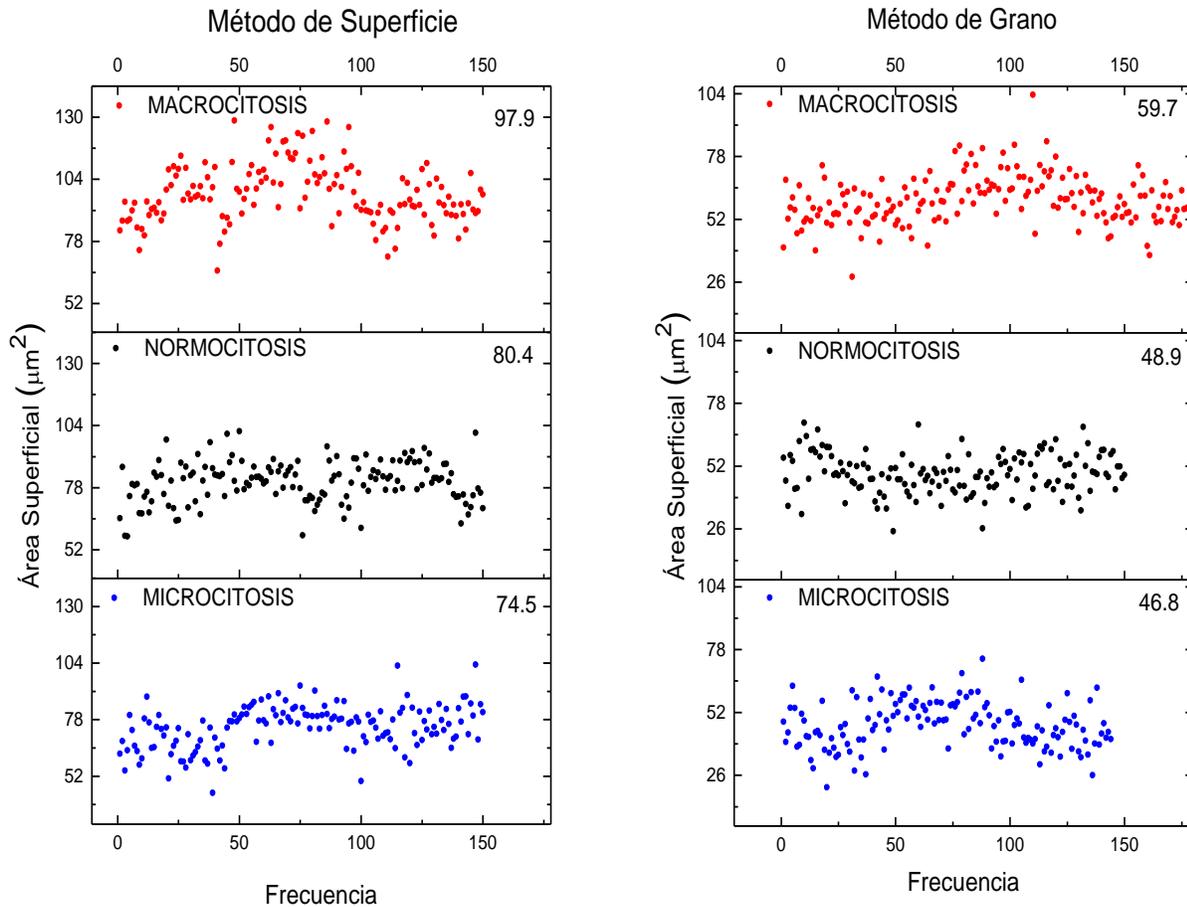


Figura 15. Comparativo del área superficial entre dos métodos (de superficie y grano).
 (A) El gráfico muestra la distribución de área superficial por el método de superficie donde los valores representan el análisis de 150 células en cada muestra. Al realizar una prueba de comparación de medias (T-test) se detectaron diferencias significativas entre las muestras en normocitosis y microcitosis ($p = 0.03$), así como una diferencia entre normocitosis y macrocitosis ($p < 0.0001$) en los valores obtenidos por el método de grano. De igual manera se observó diferencias entre los valores obtenidos por el método de superficie ($p < 0.0001$).

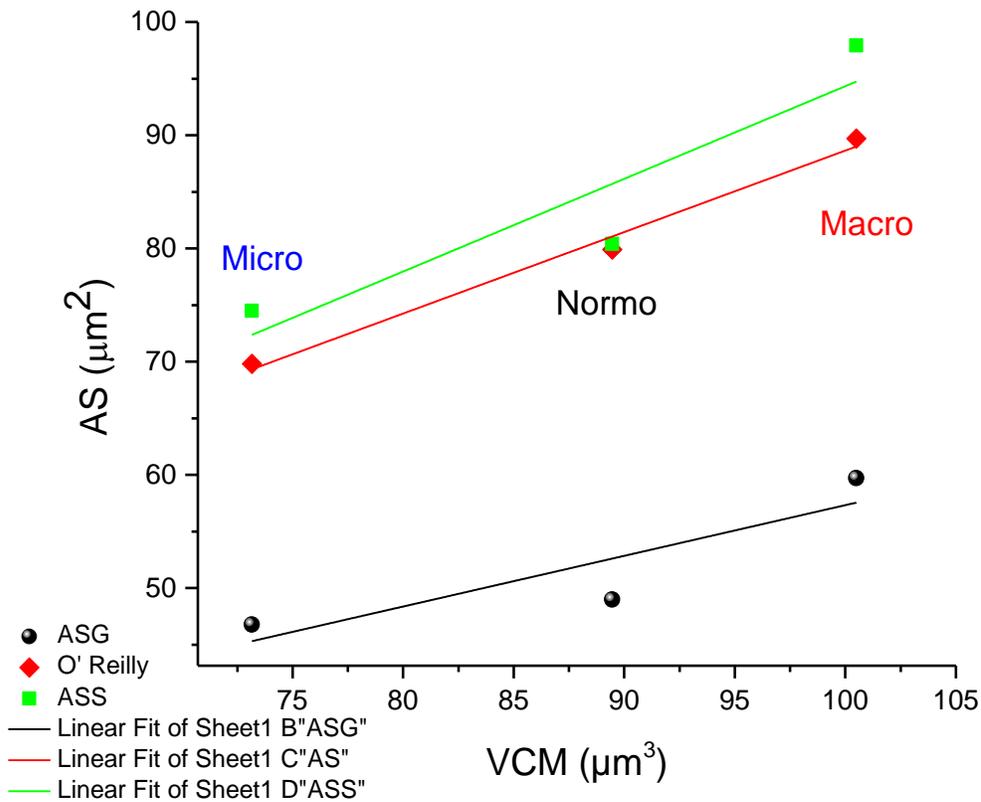


Figura 16. Comparación entre el AS y el VCM.

Los valores obtenidos mediante AS por el método de superficie se representan con el cuadro verde, los valores por el método de grano con la esfera negra y la referencia bibliográfica con el rombo rojo. El gráfico muestra los valores promedio obtenidos por cada método en las muestras de izquierda a derecha, micro, normo y macrocitosis. El ASS presentó una R^2 de 0.7 y relación de Pearson de 0.889. El ASG (línea negra) tiene un comportamiento igual a la ASS. El valor de R^2 fue de 0.71 con una relación de Pearson de 0.924 para el ASG.

Volumen por el Método de Grano Mediante Watershed

Se realizó el análisis de volumen de muestras microcíticas, normocíticas y macrocíticas por el método de grano (watershed o cuenca) y fue comparado con el VCM con la finalidad de obtener unidades comparativas en μm^3 de un procesador automático versus AFM. También fue comparado con el ASG y ASS con VGW. La distribución en el valor del VGW obtenido mostró un comportamiento proporcional al VCM en las diferentes muestras analizadas. Demostró, que las diferencias entre micro y normocíticas es mayor que en los valores obtenidos por ASS y ASG, de la misma manera las diferencias entre las normo y macrocíticas se hicieron mayor en comparación con los otros métodos.

El análisis se realizó mediante una ANOVA de una vía ($p < 0.001$), se encontraron que todas son diferentes entre sí ($p < 0.05$). Se compararon los valores de ASS y ASG con el VGW obteniendo una buena correlación entre sí. El cálculo de R^2 para ASS fue de 0.98464 y de 0.94162 para ASG. El VGW presentó un comportamiento similar a los obtenidos por O'Reilly, McDonnell et al. 2001 el cual fue llamado Volumen Celular Medio Inmovilizado (VCMI) (O'Reilly et al., 2001). Se pudo obtener un resultado concordante de VGW al VCMI comparado con la BH (figura 17 y 18). Se calculó la R^2 la cual fue de 0.82195 para VGW y 0.95445 en el VCMI. Se establecieron los rangos para el VGW en las muestras micro menor de $22 \mu\text{m}^3$, normo $22\text{-}44 \mu\text{m}^3$ y mayor a $44 \mu\text{m}^3$ macrocíticas con relación a la desviación estándar de la media. Lo que indica una buena correlación entre los métodos convencionales y los analizados por AFM.

El VGW podría ser una buena herramienta para la clasificación de células con micro, normo y macrocitos. Aunque no se obtuvo un valor de R^2 mayor que para ASS y ASG, se correlaciona mayormente con el VCM, siendo las mismas unidades y el concepto (relación Volumen-Volumen). Este resultado es semejante con aquellos obtenidos por O'Reilly et al. (2001) sobre el cálculo de VCMI, por lo que es comparable.

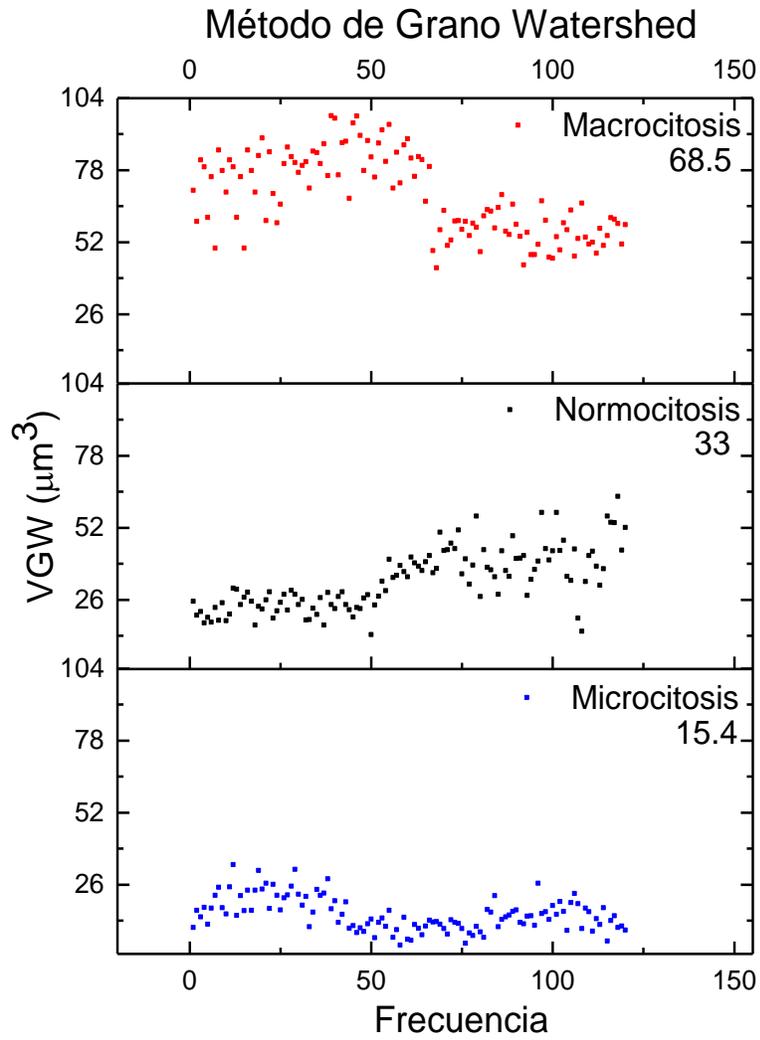


Figura 17. Valores de VGW.
 Los valores se obtuvieron a partir del análisis de 150 células en cada muestra. El análisis comparativo entre medias (T-test) reveló que existen diferencias entre las muestras ($p < 0.0001$).

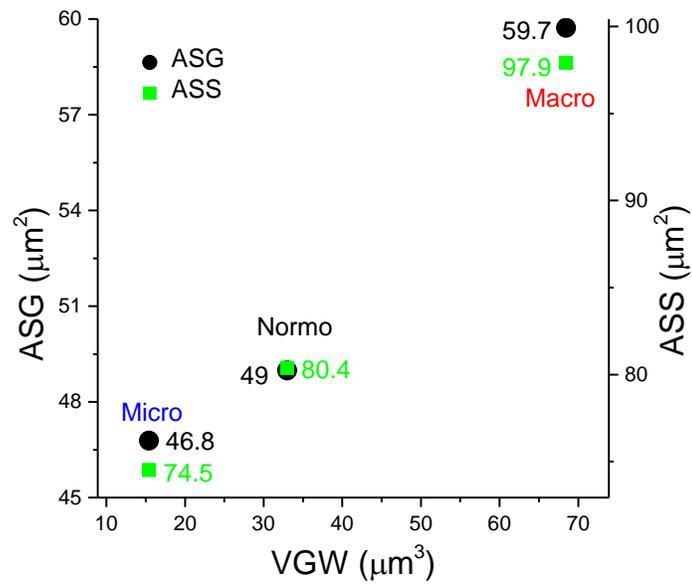
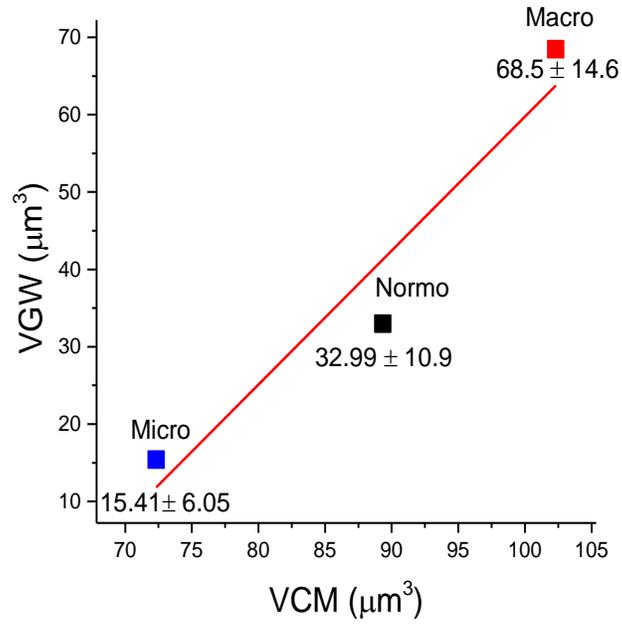


Figura 18 Análisis Comparativo entre Métodos.

El gráfico superior muestra la comparación del VGW (R^2 de 0.82195 y relación de Pearson 0.95) vs VCM. En la parte inferior ASS (R^2 de 0.98464 y relación de Pearson 0.996) y ASG (R^2 de 1 y relación de Pearson 1) con el VGW.

Análisis Morfológico de Glóbulos Rojos en Microcitosis y Macrocitosis

Se encontraron cuatro formas eritrocitarias en las muestras microcíticas y macrocíticas y se obtuvieron sus porcentajes (tabla 2, figura 19 y figura 20). La presencia de células dianas y equinocitos en las muestras normocíticas indica que puede haber una cantidad de células anormales en un porcentaje muy reducido sin que se encuentre ninguna patología. La presencia de equinocitos pueden deberse a un mal barrido del frotis, aunque si la frecuencia fuera elevada podría indicar enfermedades del hígado, insuficiencia renal crónica o una reciente transfusión (Rosa, 2003). Por su parte, el análisis de células diferencial de personas sanas revelan un pequeño número de poiquilocitosis, por lo general menor de 2% (Walker, Hall, & Hurst, 1990).

Tabla 2. Características Morfométricas de los Glóbulos Rojos.

		MICROCITOSIS	NORMOCITOSIS	MACROCITOSIS
TAMAÑO	MICROCITO	49.4	26.0	2.7
	NORMOCITO	47.4	72.0	41.3
	MACROCITO	3.2	2.0	56.0
FORMA	NORMOCITO	67.3	92.7	74.7
	CODOCITO	27.4	2.0	24.0
	ESFEROCITO	4.0	0.0	0.0
	OVALOCITO	1.3	0.0	0.0
	EQUINOCITO	0.0	5.3	1.3

*Valores obtenidos a partir del total de células analizadas (n = 150), porcentajes (%).

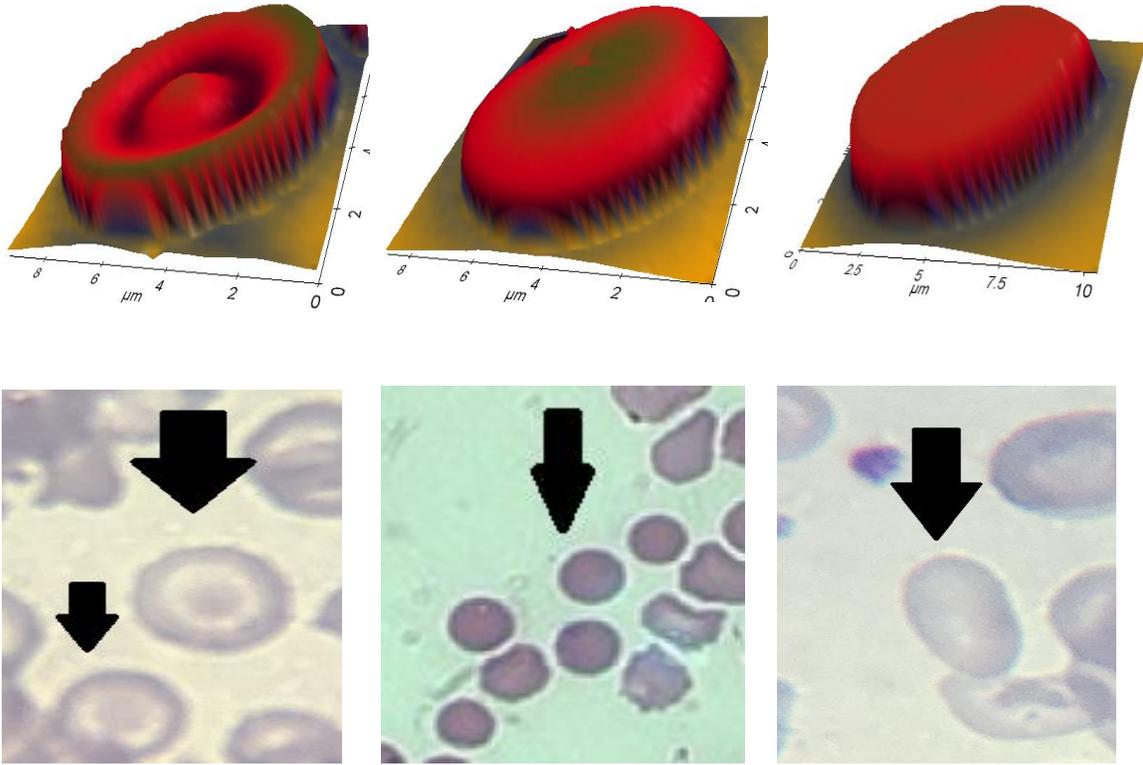


Figura 19. Morfología Celular en Microcitosis.
De izquierda a derecha se muestra un codocito, esferocito y ovalocito.

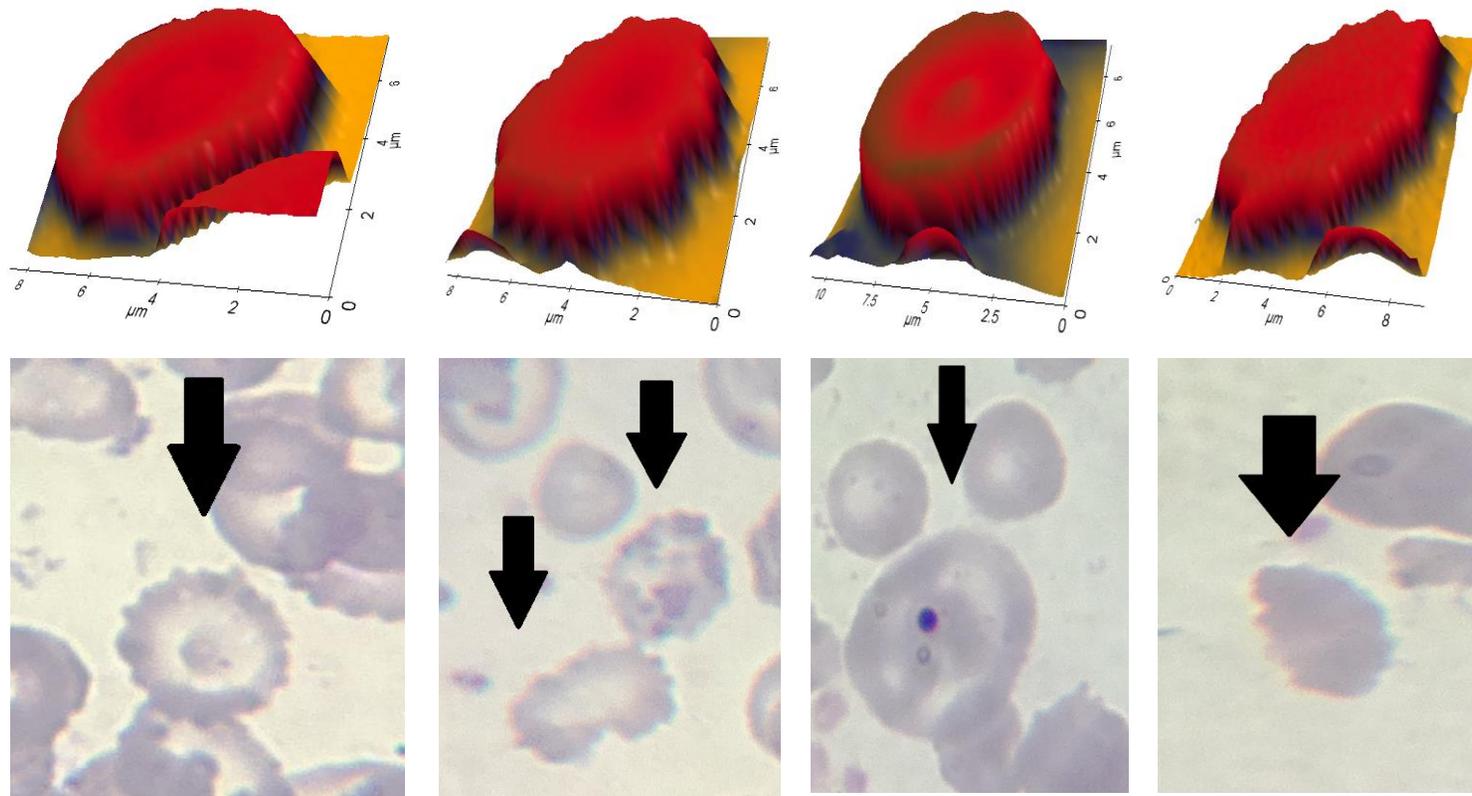


Figura 20. Morfología Celular en Normocíticas y Macrocítcas.

Las imágenes superiores son GRs caracterizados por AFM en modo de NC-AFM en áreas de 25 X 25 μm y 50 X 50 μm. Las muestras inferiores son imágenes de frotis de sangre periférica con tinción Wright. Utilizados como referencia de izquierda a derecha se muestra un codocito y equinocitos de tamaño normal. Las dos últimas son codocito y equinocito macrocítico.

Descripción de los Glóbulos Rojos por Forma y Perfil Lineal

Se analizaron muestras con microcitosis, macrocitosis y normocitosis escaneadas con AFM en modo NC-AFM con área de 8 X 8 μm , 10 X 10 μm , 25 x 25 μm y 50 x 50 μm . El estudio de las formas consistió en comparar la células del mismo tipo en condiciones de tamaño micro, normo y macro. El perfil lineal se calculó mediante el promedio de las alturas y diámetros de la célula completa y la parte bicóncava del eritrocito. A continuación se describe el perfil lineal de cada tipo de células en las distintas formas micro, macro y normocitosis.

Normocito

En las muestras normales la morfología predominante fue en forma de disco, la cual presenta un borde periférico de aproximadamente 3 μm de diámetro del cual inicia su forma cóncava, esta zona tiene una regularidad de alturas de picos y valles continuas casi uniforme (figura 20). La concavidad puede variar en su profundidad (figura 21). El perfil lineal de las células sanas tuvo un valor promedio de diámetro de $8.676 \pm 0.191 \mu\text{m}$ y una altura de $834.561 \pm 140.80 \text{ nm}$ para la célula completa. La zona bicóncava mostró un diámetro promedio de $6.457 \pm 0.467 \mu\text{m}$ y una profundidad de $126.476 \pm 115.50 \text{ nm}$ de altura. Los efectos de los diferentes materiales de sustrato (mica o vidrio) sobre la morfología de la biconcavidad celular pueden influir en el análisis de las muestras. En la mica, un eritrocito normal presenta mayor biconcavidad (con una concavidad típica) que el frotis en vidrio (concavidad más plana), así como la anchura, diámetro, VCM y AS (Wu et al., 2009).

Bürker (1922) señala que existe una correlación entre el área de superficie del GR y su contenido de hemoglobina, dado que la cantidad de hemoglobina por μ^2 de área fue constante en todos los mamíferos que investigó. Basado en esta investigación, Ponder (1924) analizó la correlación del contenido de Hb entre el volumen y área de un GR y el contenido de Hb. Concluyó que tanto la correlación AS versus la concentración de hemoglobina como la correlación del Volumen versus la concentración de Hb son buenas. Sin embargo, presenta una dificultad decir por las dos debido a la resolución de las imágenes del sistema óptico utilizado. Especifica que las mediciones de AS y volumen pueden tener un error de ± 0.1 (figura 22) (Ponder, 1924; Zhang et al., 2014). La

resolución de la AFM podría minimizar este error, por consiguiente también mejoraría la correlación de la concentración de Hb entre el AS y Volumen de un eritrocito. Esto explica el comportamiento lineal de la distribución de alturas, diámetro de la célula completa y concavidad con la concentración de hemoglobina. Aunque para establecer esta información hace falta realizar el cálculo de la correlación descrita por Ponder (1924).

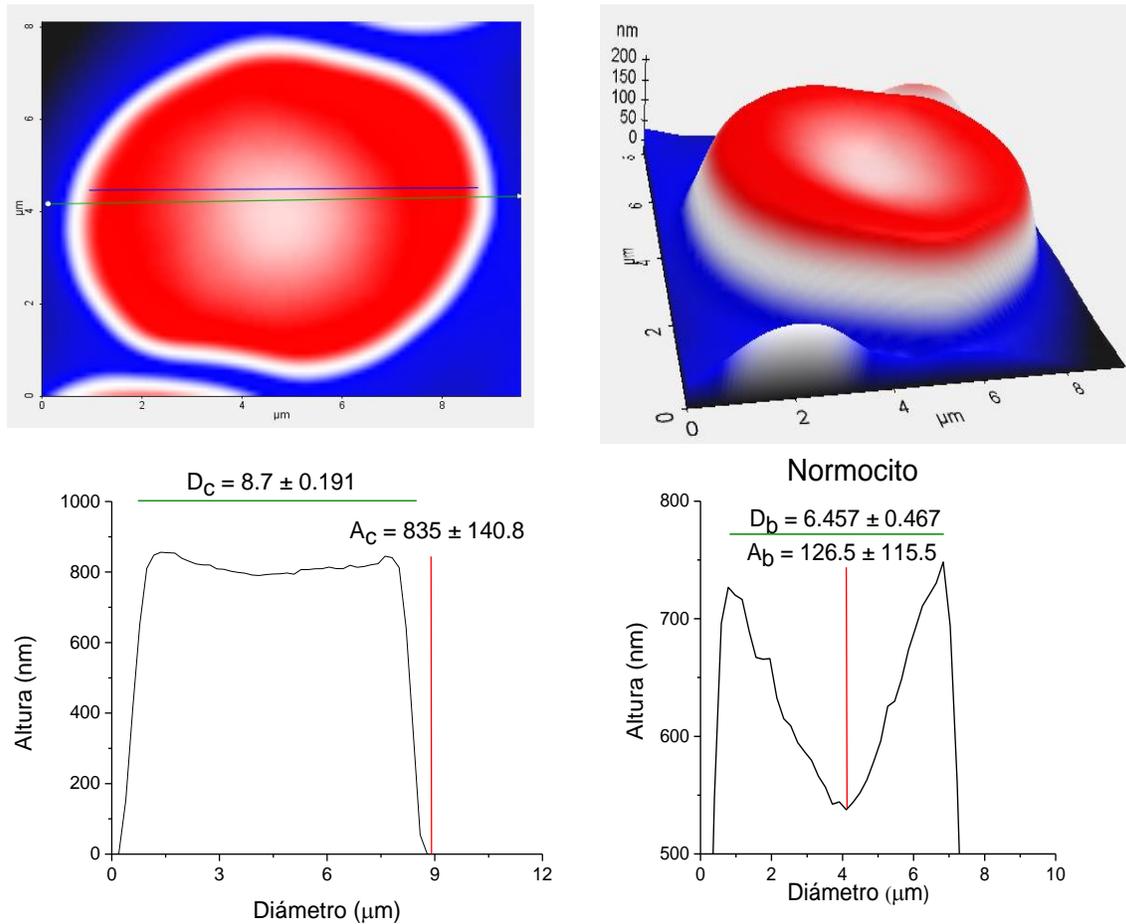


Figura 21. Perfil lineal de un Glóbulo Rojo normal. Parte superior de izquierda a derecha, imágenes en 2D y 3D obtenidas en AFM en modo de NC-AFM con una resolución de 256 (pxl) de ancho y 256 (pxl) de alto en áreas de $25 \times 25 \mu$ de escaneo. Parte inferior de izquierda a derecha diagramas de altura y diámetro de la forma celular completa, seguido del diagrama de la concavidad.

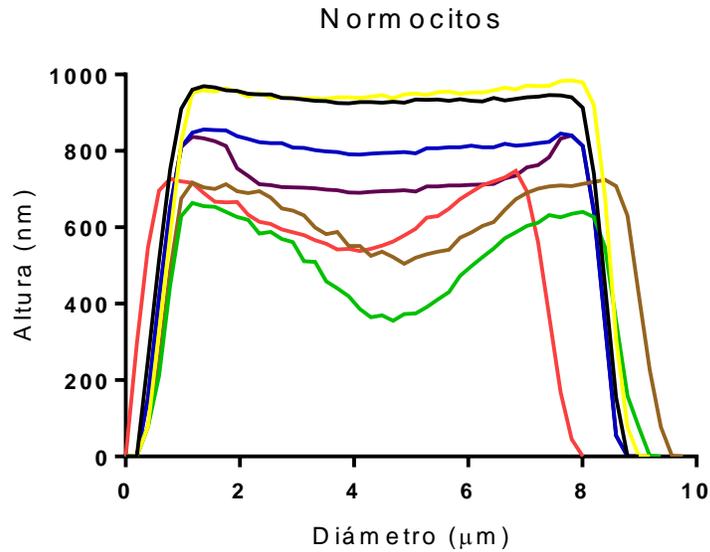


Figura 22. Perfil de Línea Característica de Normocitos.
La gráfica muestra el comportamiento de alturas y diámetros de eritrocitos normales.

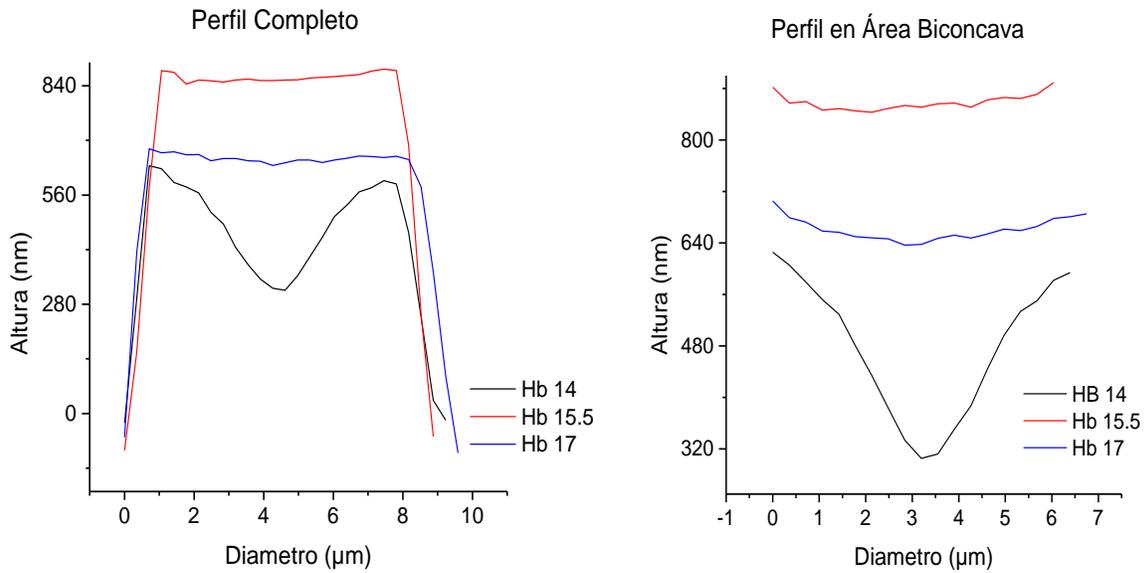


Figura 23. Relación Entre la Concentración de Hb y el Perfil Lineal.
Se tomó el perfil de una célula representativa del promedio de la muestra para mostrar la relación entre la concentración de Hb y la morfología celular.

Normocitos en Muestras con Micro y Macroцитosis

La comparación de los parámetros obtenidos de la célula normal con las células micro y macrocíticas mostraron para las células microcíticas un diámetro de $7.68 \pm 0.282 \mu\text{m}$ y una altura de $513.831 \pm 39.316 \text{ nm}$, los cuales fueron menores al valor normal de la forma celular completa; el diámetro de la zona bicóncava también fue menor, $5.467 \pm 0.503 \mu\text{m}$, y su concavidad tuvo una altura de $91.337 \pm 80.459 \text{ nm}$. Para la macrocitosis, las mediciones de la célula completa presentaron un comportamiento de diámetro de $9.849676 \pm 0.5 \mu\text{m}$ y una altura de $778.654 \pm 86.00 \text{ nm}$; en su zona bicóncava el diámetro fue de $7.769 \pm 0.554 \mu\text{m}$ y su concavidad de $105.794 \pm 34.335 \text{ nm}$ de altura (figura 23).

En la figura 24 se compara el comportamiento de alturas y diámetros de las células completas y la concavidad de GR con formas normales en la micro, normo y macrocitosis. En las células completas, el macrocito (línea roja) tiene una altura muy cercana al GR normal (línea negra) pero es mucho mayor al microcito (línea azul) (figura 24). En cuanto los diámetros el normocito (línea negra), éste es menor y el macrocito (línea roja) mayor que las otras células. La concavidad exhibe una similitud entre el microcito y normocito, sin embargo el macrocito tiene un diámetro mayor al normocito y una forma notoriamente irregular en la concavidad (figura 25).

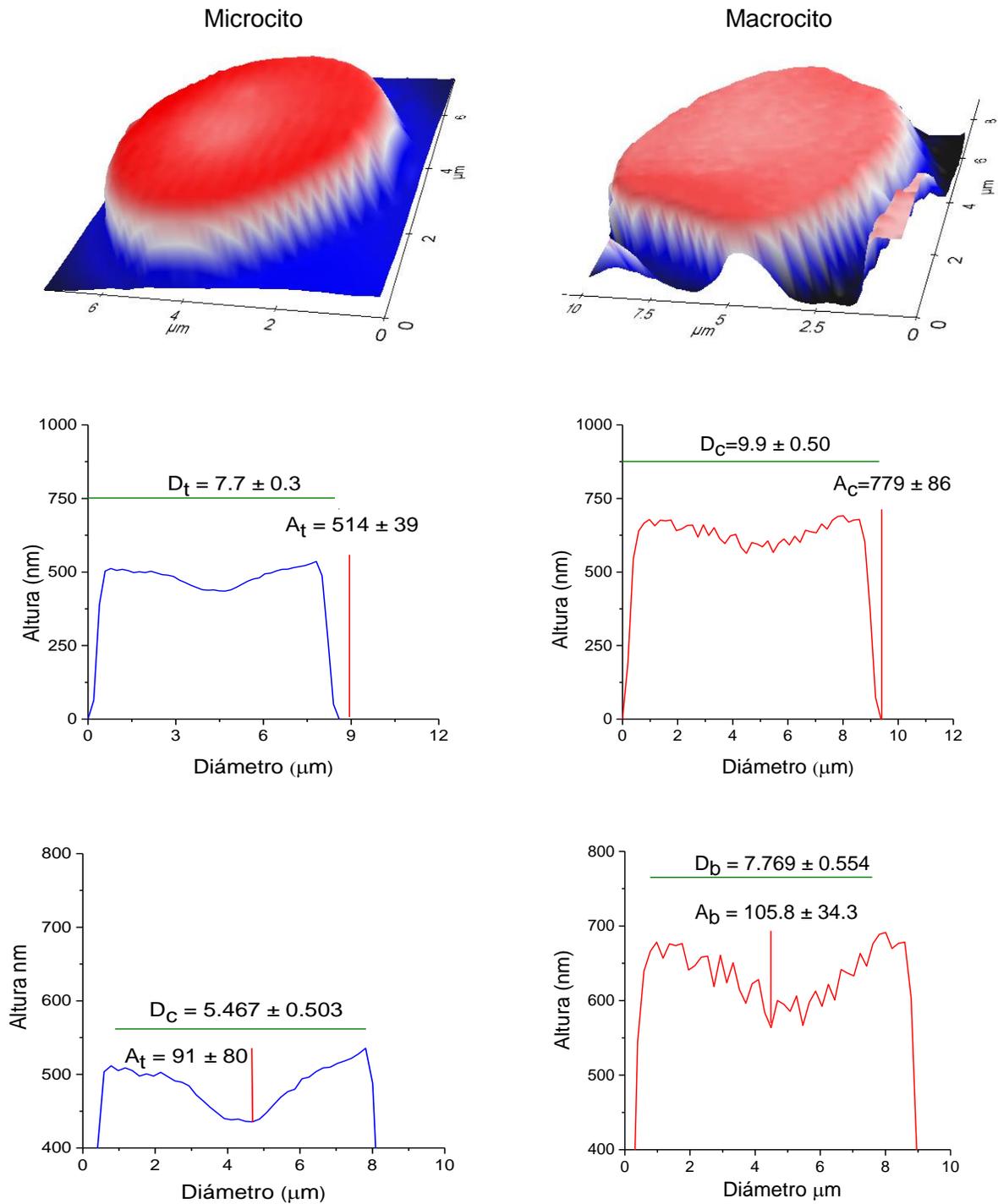


Figura 24. Forma y Perfil Lineal de GR microcítico y macrocítico. La imagen (3D) y los gráficos representan el promedio de cinco células analizadas en cada muestra. Del lado izquierdo se encuentran las células microcíticas con forma normal y hacia la derecha las macrocíticas con forma normal. En la parte media los histogramas de las células completas y en la parte inferior histogramas de la concavidad.

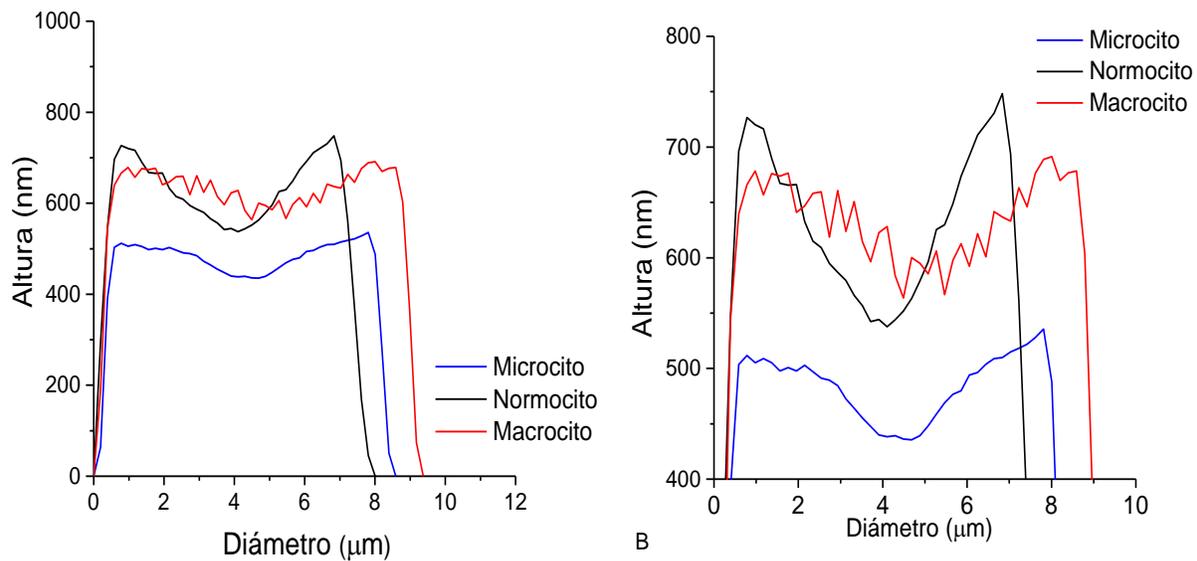


Figura 25. Comparación del Perfil Lineal de eritrocitos de forma normal con micro, normo y macrocitos. Histograma de las células completas (A) y del comportamiento de la concavidad (B).

Codocito

Se observaron tres variaciones de codocitos, disco, oval y equinocito. Después del borde periférico inicia la declinación de la concavidad. La pared de la zona cóncava pierde la irregularidad de alturas y valles mostrando una superficie más lisa. En la zona central comienza la elevación de una protuberancia (característica más importante y conocida de esta célula). Puede tener más de una protuberancia, por ende se generan profundidades (la cantidad depende de las protuberancias existentes) y la parte superior de la protuberancia tiene forma de campana. La protuberancia también tiene distintos grados de alturas y diámetros. Su tamaño puede ser micro, macro o normocítico. En la figura 26A se muestra un codocito que tiene 5 zonas convexas de distintas profundidades, por lo que forma un punto de unión en los cuatro orificios, su forma periférica es oval. De las imágenes de codocito normocítico se dificulta distinguir la protuberancia central; sin embargo, el histograma (perfil topográfico) permite visualizarlo (figura 27B) y medir con mayor facilidad. La membrana de los codocitos es menos lisa que cuando se encuentra en micro y macrocitos. El codocito macrocítico tiene forma ondulada en la periferia de la célula (borde) pero la forma característica y protuberancia se distinguen perfectamente (figura 26D).

El perfil lineal de los codocitos muestra que cuando se encuentran como microcitos tienen un diámetro de $8.647 \pm 0.406 \mu\text{m}$ y altura de $514.902 \pm 65.687 \text{ nm}$. Los codocitos de tamaño normal presentan un diámetro de $9.212 \pm 0.393 \mu\text{m}$ y altura de $755.921 \pm 69.218 \text{ nm}$. El tamaño macrocítico tiene un valor de $9.296 \pm 0.593 \mu\text{m}$ de diámetro y una altura de $9.296 \pm 0.593 \text{ nm}$. En la zona bicóncava también va aumentando el diámetro pero en cuanto a la altura, el microcito tiene mayor profundidad, seguido del macrocito, donde el normocito tuvo la menor profundidad. La protuberancia central es fácilmente observada en los macrocitos y microcitos, pero cuando se encuentra en un tamaño normal esto se dificulta. También fue notorio que en estas condiciones la superficie tiene una forma más irregular (figura 27 y figura 28).

Los codocitos observados mostraron una variación de tamaños y formas. En cuanto al tamaño, los microcodocitos podrían deberse a tipos de anemias por hemoglobinopatías, deficiencia de hierro y talasemias (figura 26A y B). Codocitos que tienen un aumento de área superficial (macroscitos) podrían ser encontrados en muestras con ictericia obstructiva o aumento del colesterol no esterificado ocasionando un exceso de membrana (figura 26C). Por otro lado, las formas encontradas son del tipo I, las cuales representan daños efectuados por el desplazamiento del portaobjetos en un frotis diferencial y, del tipo II donde variaban la profundidad y número de zonas cóncavas. Se encontraron equinocodocitos, los cuales tienen la forma de campana en la concavidad y periferia de equinocito (figura 28D) (Bessis, Brecher, & Gaillard, 2012; Grinspan, 1985). Nuestras mediciones concuerdan con las dimensiones obtenidas en un estudio previo donde se obtuvo un diámetro de $7.250 \mu\text{m}$ y 369 nm de altura (Zachee, Snauwaert, Vandenberghe, Hellemans, & Boogaerts, 1996).

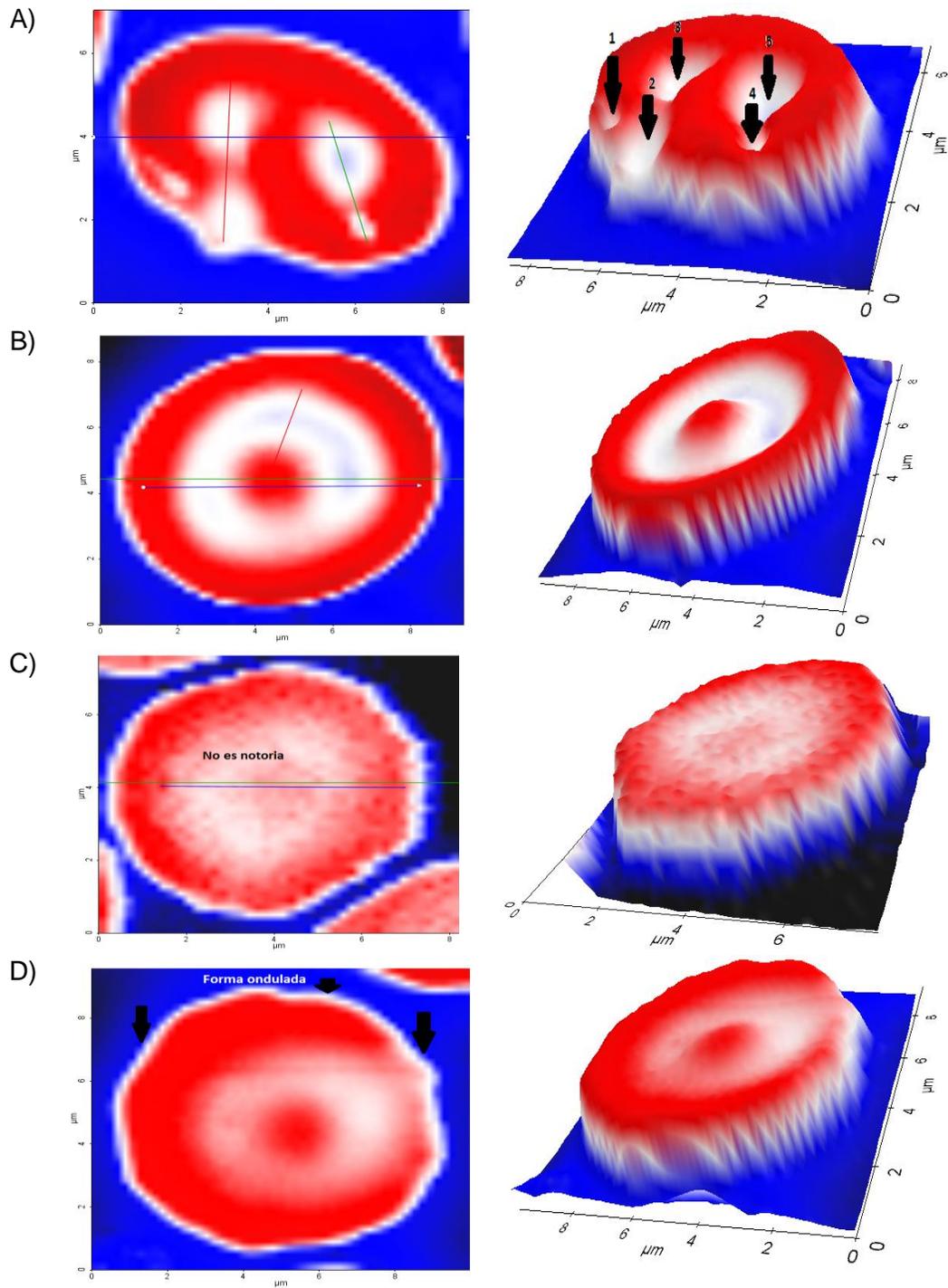


Figura 26. Codocitos en Micro, Normo y Macroцитosis. Las imágenes de la izquierda son en 2D y la derecha en 3D, que representan (A) microcítico con 5 zonas convexas, (B) microcítico con forma común, (C) normocítico y (D) macrocítico.

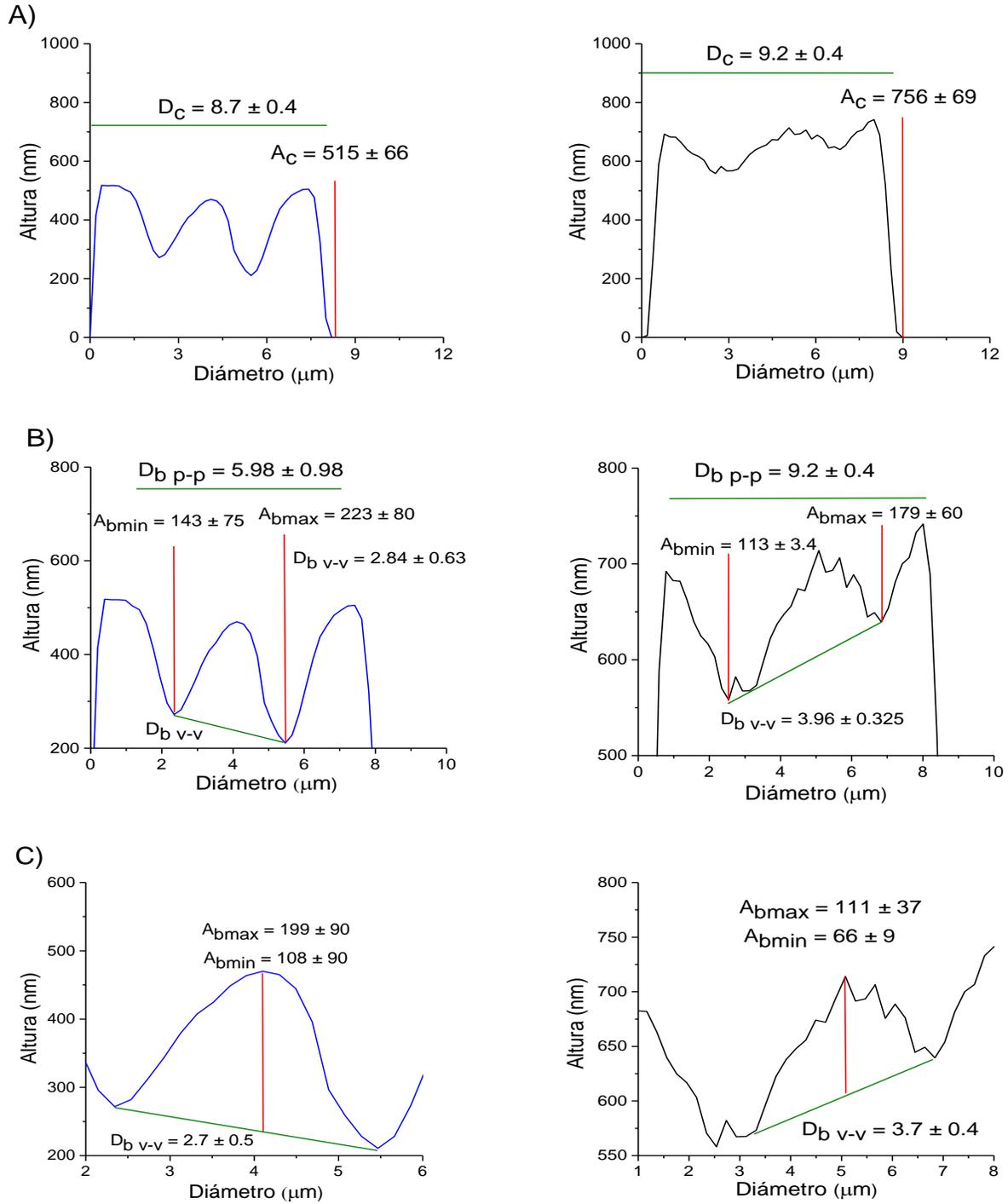


Figura 27. Perfil Lineal de Codocitos. Los histogramas representan el perfil lineal de cada zona de la célula con forma de codocito. (A) célula completa, (B) concavidad y (C) protuberancia.

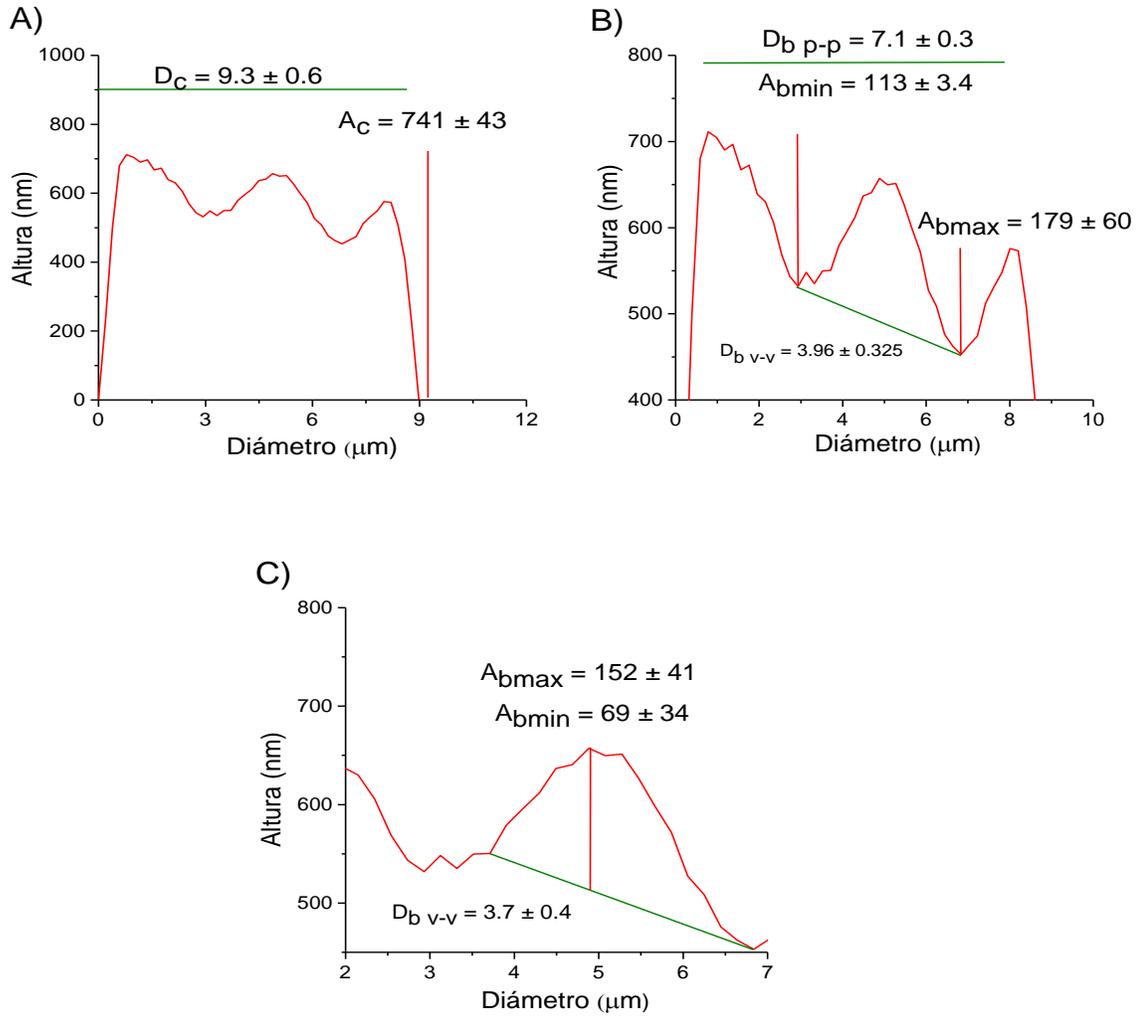


Figura 28. Perfil Lineal de Codocitos en Macroцитosis.
 (A) Se muestra el gráfico de la célula completa, en (B) de la zona convexa y en (C) el gráfico de la protuberancia.

Equinocito

Los equinocitos tienen forma más alargada casi oval o discoidea que los GRs normales o macrocito. La presencia de espículas es un indicativo del tipo I (transformación de los discocitos normales a equinocitos) ya que aún no han perdido sus elongaciones. En la figura 29 el equinocito normocítico cuenta con 9 espículas y el macro con 11, estas también varían de longitud y distancias entre el pico de una y el pico de otra. Después del borde periférico inicia la concavidad hasta formar una zona plana central, esta varía dependiendo de la longitud del eritrocito. Los equinocitos solo se encontraron en tamaño normo y macrocito. Otro detalle importante es el aspecto irregular en condiciones de macrocitos que en la normocitosis. El diámetro promedio de los equinocitos se observó mayor cuando es una célula macrocítica, pero tiene mayor altura cuando es un equinocito de tamaño normal. La concavidad de ambas tiene un diámetro promedio de $7.2 \mu\text{m}$ y una profundidad mayor para los equinocitos de tamaño normal. Ambos tienen una zona plana ovalada, que en condiciones de tamaño normal es mayor que cuando presenta macrocitos (figura 30). En otro estudio se obtuvieron valores del diámetro y altura para un equinocito, los cuales fueron de $9.04 \pm 0.89 \mu\text{m}$ y $520 \pm 110 \text{ nm}$ respectivamente (Lamzin & Khayrullin, 2014).

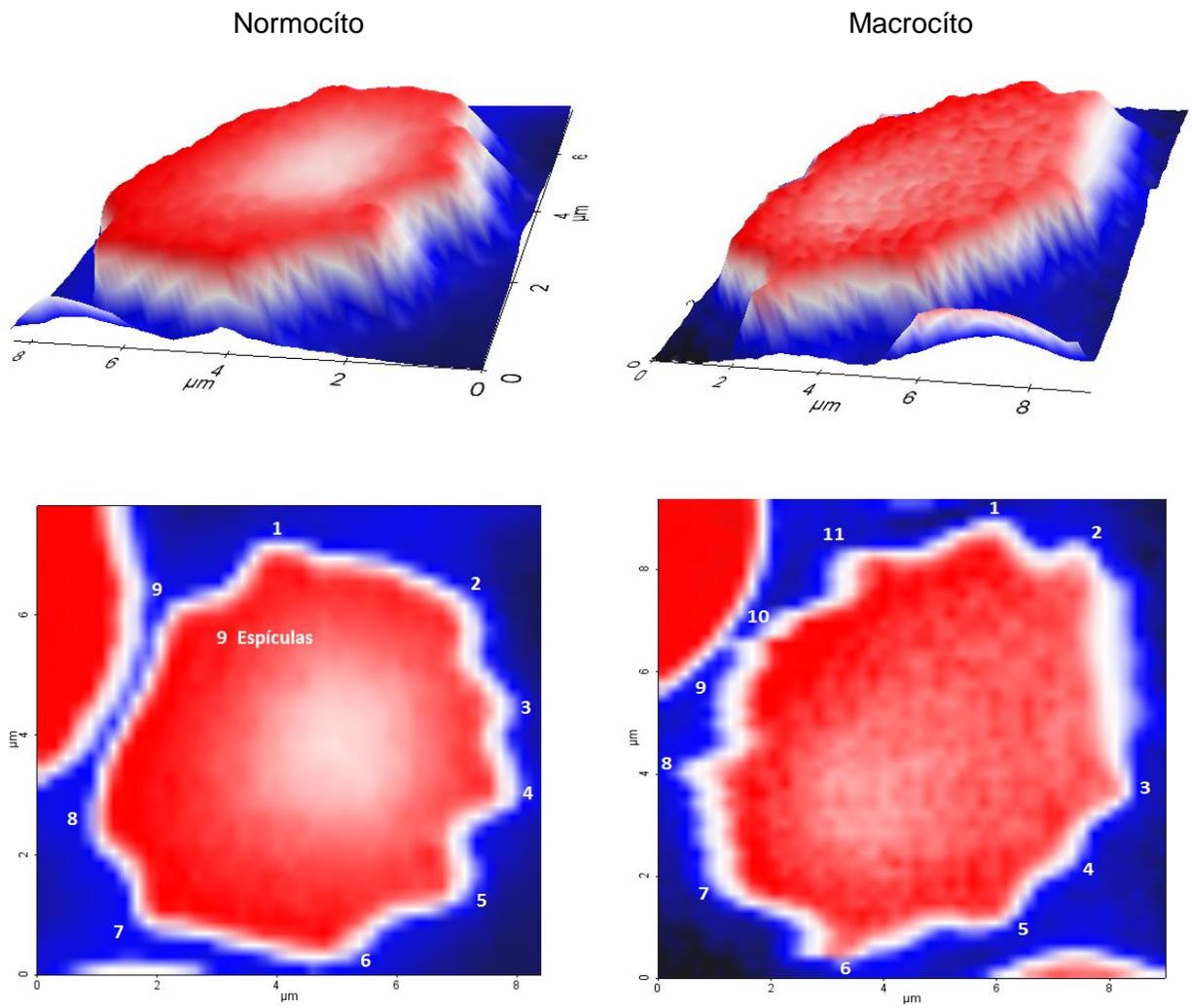


Figura 29. Imágenes en AFM de equinocitos. En la parte superior se presentan las imágenes en 3D y en la inferior en 2D con descripción del número de espículas en células normocíticas (izquierda) y macrocítica (derecha).

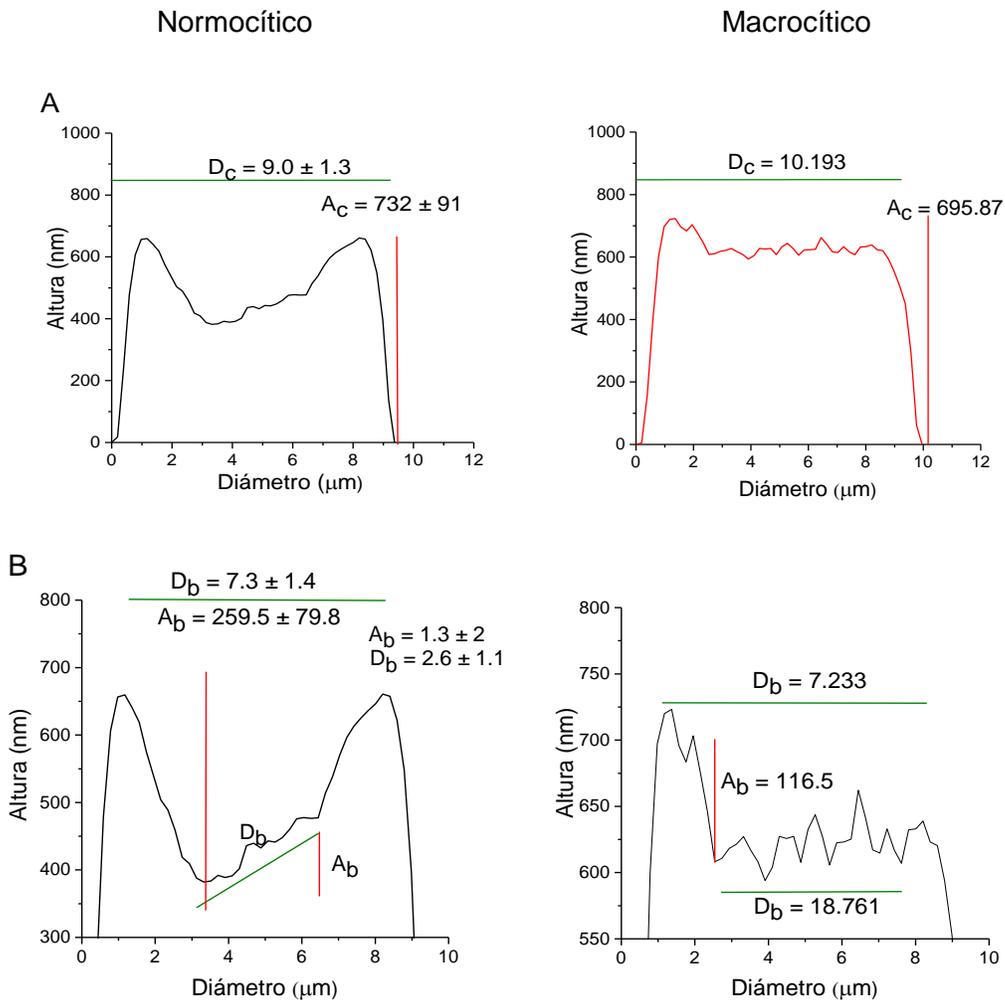


Figura 30. Perfil de Lineal de Equinocitos. (A) Representa la célula completa y (B) el área biconcava de equinocitos en normocitosis (izquierda) y macrocitosis (derecha).

Esferocito

Los esferocitos se caracterizan por tener forma esférica. Los resultados que obtuvimos revelan que la zona convexa posee una comisura (tipo estría) donde se eleva la membrana en la parte central del eritrocito, además inicia la pérdida de rugosidad. En la parte más elevada del eritrocito se observó que la superficie es prácticamente lisa y se encuentra la presencia de una pequeña zona profunda (orificio). Se encontraron esferocitos que conservaban parte de su rugosidad superficial pero con distribución de alturas muy irregular y evidencias de pérdida de la rugosidad (figura 31).

El perfil lineal indica que tienen un diámetro promedio de $8.652 \pm 0.583 \mu\text{m}$ y una altura promedio de $553.583 \pm 167.778 \text{ nm}$. En la forma convexa tiene un diámetro promedio de $7.038 \pm 0.167 \mu\text{m}$ y altura de elevación promedio de $84.864 \pm 71.672 \text{ nm}$; la formación del orificio tiene un diámetro promedio de $0.894 \pm 0.293 \mu\text{m}$ y profundidad promedio de $27.619 \pm 29.446 \text{ nm}$ (figura 32). Se observó que el esferocito, debido a su pérdida de membrana celular, va reduciendo su tamaño y perdiendo la forma irregular de la membrana hasta quedar completamente lisa, con cicatrices de estiramientos alrededor del borde y en la parte superior de la zona convexa.

El promedio del diámetro se encontró ligeramente más pequeño a los valores obtenidos en otros trabajos, cuyo valor es de $10 \mu\text{m}$, y las alturas de esferocitos en formación es mayor al de una célula normal, la cual se ha establecido en $2 \mu\text{m}$. Nuestros resultados muestran esferocitos con diámetros por debajo del valor reportado pero con un aumento en la altura promedio característica. También se observó la formación de hoyuelos en las células normales y esferocitos, donde el radio de los hoyuelos es mayor en los esferocitos, lo cual es probable dado que la estructura proteica (citoesqueleto) se debilita y por lo tanto la naturaleza de un eritrocito normal (forma bicóncava) cambia a ser esférica.

Nowakowski et al. (2001) caracterizaron esferocitos con AFM y obtuvieron que las células hinchadas (esferocitos) son más altas (aproximadamente $3 \mu\text{m}$) que las normales. El diámetro que obtuvieron fue de $10 \mu\text{m}$. Pero debido al error del ángulo de la punta este valor puede ser menor al real. Este error podría ser de $1\text{-}2 \mu\text{m}$. La disminución del tamaño celular del esferocito se debe a la liberación progresiva de vesículas con una mayor concentración de lípidos que proteínas, disminuyendo su AS (Diez-Silva et al., 2010). Nuestros resultados también coinciden con los obtenidos en otro trabajo donde el diámetro es de $7.38 \pm 7.80 \mu\text{m}$ y la altura de $630 \pm 0.68 \text{ nm}$ para los esferocitos (Lamzin & Khayrullin, 2014). Zachee et al. (1996) encontraron protuberancias iniciales en esferocitos con diámetros de 80 a 120 nm y alturas de 40 a 80 nm generadas por la vesiculación de esferocitos. En el caso de la esferocitosis hereditaria, el esferocito experimenta daños en las proteínas provocando la desconexión (espectrina, anquirina, banda 3 y 4.2) seguido por vesiculación y como consecuencia disminuye el tamaño de un esferocito.

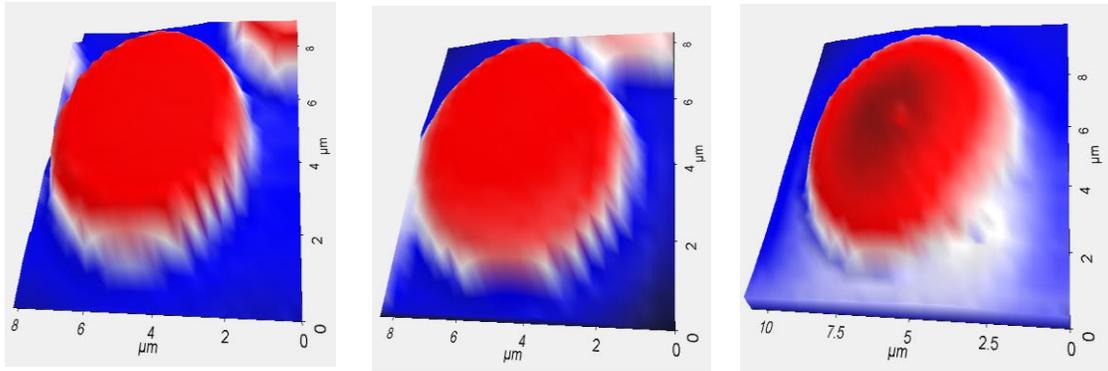


Figura 31. Ovalocitos en distintas etapas de desarrollo.
Las tres imágenes corresponden a esferocitos microcísticos, en diferentes etapas en el proceso de completar su forma esférica característica.

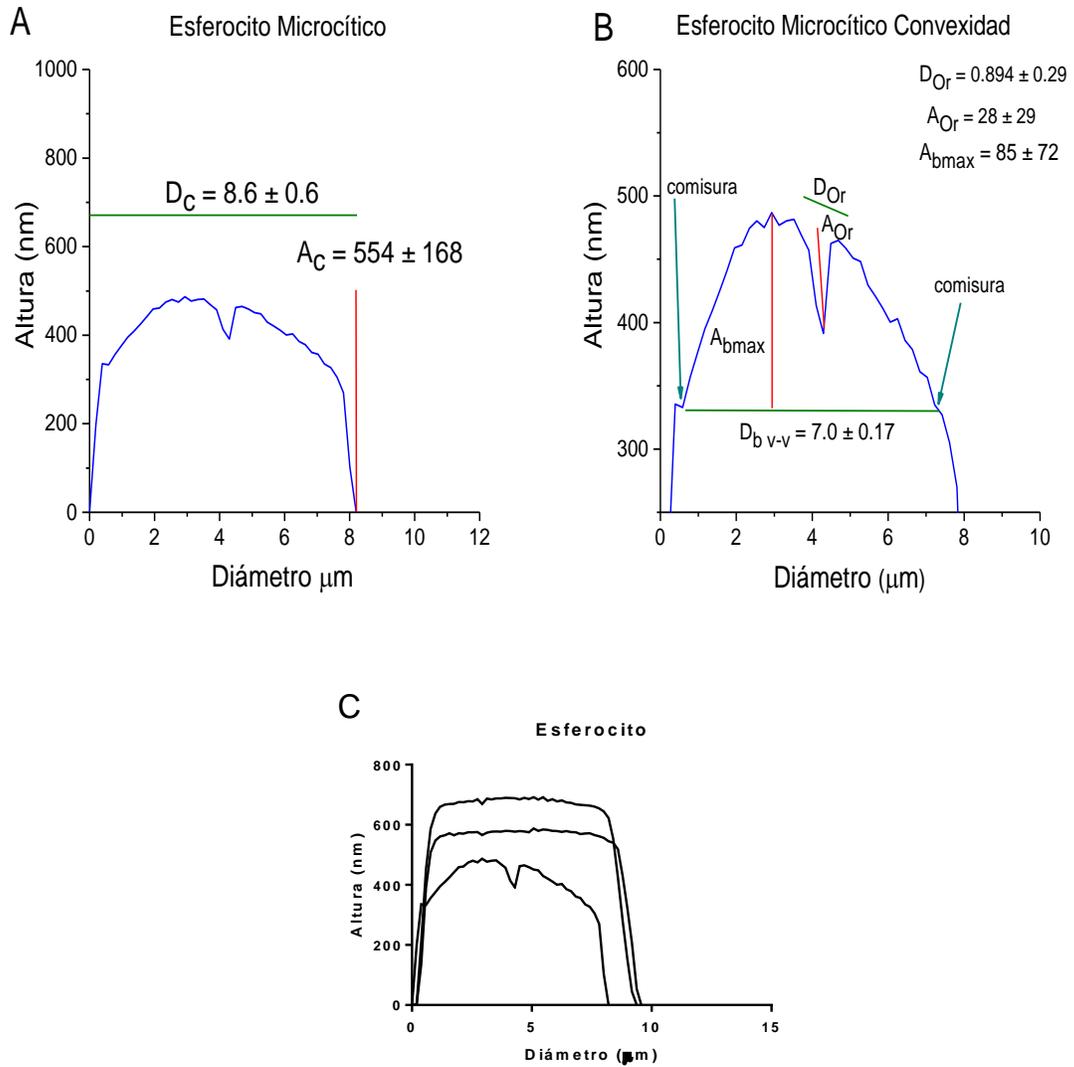


Figura 32. Perfil lineal de las células esferocíticas microcíticas. El histograma (A) muestra el comportamiento de la célula completa y (B) el de la zona convexa. En el gráfico (C) se compara las alturas y diámetros de células con esferocitosis.

Ovalocito

Los ovalocitos, como su nombre lo indica, tienen forma ovalada. En un extremo tienen una terminación en pico y al otro es redondeado, parecido a la forma en lágrima, solo que la extensión es muy corta y poco notoria. La concavidad se encuentra dividida en dos cavidades convexas unidas por un pico central. Se puede observar claramente que no ha perdido rugosidad en la zona bicóncava (figura 33). El perfil de línea obtenido de las imágenes de AFM indicó un diámetro de $9.715 \pm 0.515 \mu\text{m}$ y una altura promedio de $500.842 \pm 45.425 \text{ nm}$. Los valores promedios de los diámetros en la concavidad fue de $7.758 \pm 0.51 \mu\text{m}$ y $15.876 \pm 1.539 \text{ nm}$; así como, el diámetro en la división más pequeña es de $2.899 \pm 0.255 \mu\text{m}$ y en la más grande $4.425 \pm 1.064 \mu\text{m}$. Manejando una profundidad mínima de $10.097 \pm 4.972 \text{ nm}$ y máxima de $15.138 \pm 0.490 \text{ nm}$.

Estas células de forma ovalada, cuando se encuentran en grandes números sugieren el diagnóstico de eliptocitosis hereditaria. En pacientes con deficiencias severas de hierro se pueden encontrar células alargadas que semejan eliptocitos (Grinspan, 1985). Los ovalocitos encontrados se pueden distinguir fácilmente de los esferocitos ya que éstos nunca pierden su forma cóncava, o su membrana eritrocitaria y por lo tanto tampoco su rugosidad.

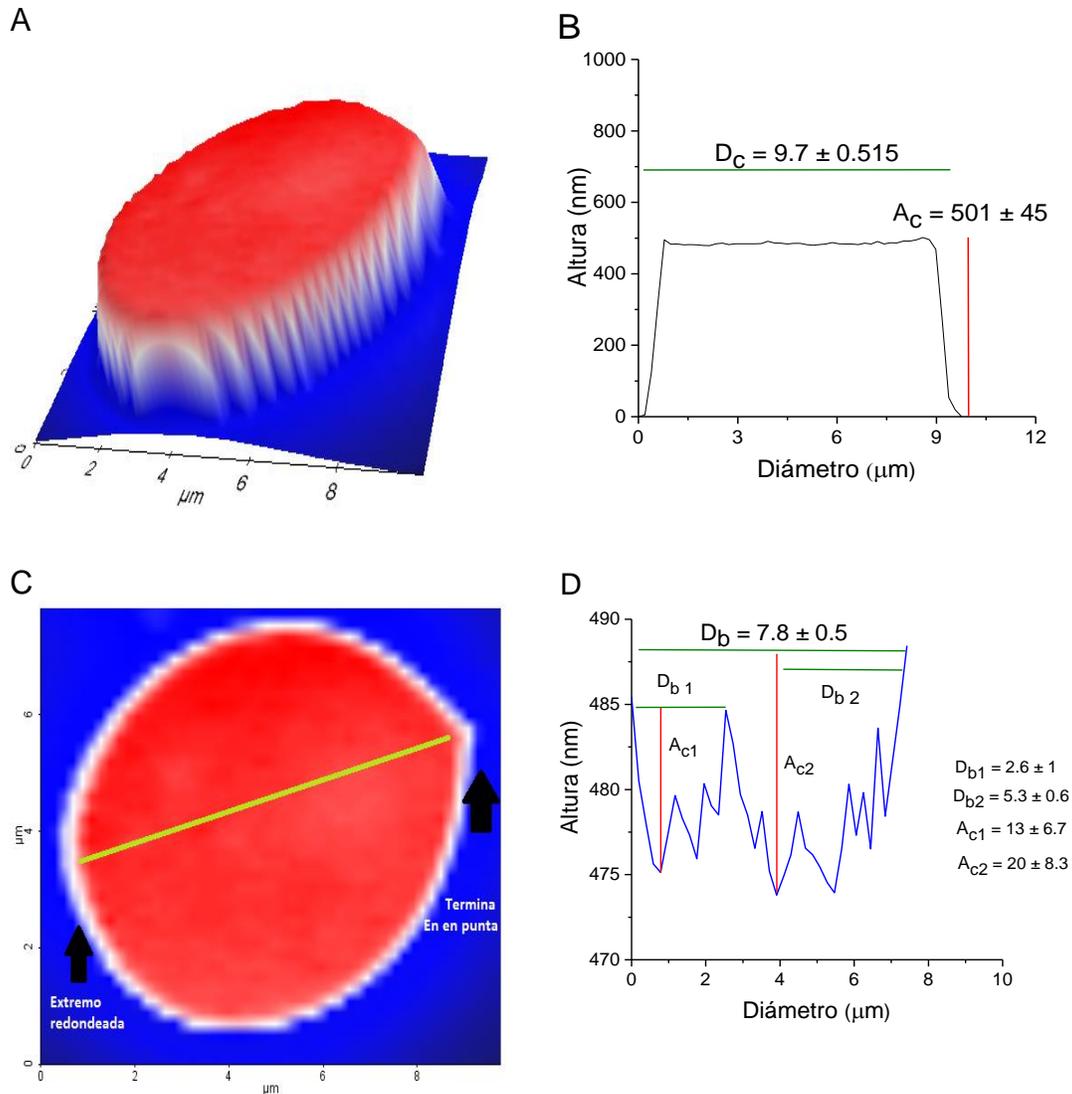


Figura 33. Perfil Lineal de Ovalocitos.
 (A) Muestra la imagen en 3D y (C) imagen en 2D. El comportamiento gráfico de altura y diámetro promedio de los ovalocitos encontrados en las muestras analizadas, se observa en (B) para la célula completa y en (D) la zona cóncava (promedio de 5 células).

La función del citoesqueleto de la membrana es mantener la forma, es decir, protege la estructura celular contra las perturbaciones de sus componentes lipídicos. Estas perturbaciones se producen cuando los lípidos entran y salen del exterior del plasma sanguíneo o se transloca a través de la bicapa.

En otro trabajo se expusieron eritrocitos a radiación con ion carbono generando la deformación morfológica en los eritrocitos; donde el efecto de la irradiación sobre los eritrocitos fue la generación de poiquilocitosis y la disminución de la elasticidad de la

membrana debido a daños en el citoesqueleto (Zhang et al., 2014). Otra de las condiciones que pueden provocar la deformación celular es cuando existen defectos sobre la síntesis de hemoglobina. Asimismo, se ha demostrado mediante la AFM que la Hb polimerizada (HbS) provoca la formación de una estructura polimérica de siete hebras lo que aumenta la rigidez del GR. Condiciones externas celular también puede afectar la función celular (Maciaszek & Lykotrafitis, 2011). Carvalho & Santos (2012) demostraron con AFM que la reducción de calcio, fármacos como la eptifibatida, y el envejecimiento celular reducen la unión del fibrinógeno a los eritrocitos (integrina).

Estudios realizados con GRs sanos expuestos a distintas concentraciones de urea donde se formaron equinocitos, se encontró que éstos contaban con una elasticidad de cizallamiento del citoesqueleto asociada a la membrana (que es desnaturalizada) y cambios en la composición de lípidos; dichas circunstancias provocaron la disminución de espículas del equinocito, demostrando que es necesaria la elasticidad de cizallamiento para estabilizar a los eritrocitos sanos contra los cambios en la composición de los lípidos y evitar la formación de un eliptocito bicóncavo (Khairy et al., 2010; Noguchi & Gompper, 2005).

Bajo el fundamento de que la hemina inhibe la asociación dímero-dímero de la espectrina y/o el complejo de anquirina, se expuso a eritrocitos a concentraciones de hemina provocando formaciones de “granos” en la superficie celular. Sus resultados indican que los complejos de proteína 4.1 descienden de su nivel original y la anquirina se quedó en la superficie (defecto topológicos de grano), por lo que suponen que esto es un proceso de “vesiculación interna”, que la espectrina es muy maleable y puede existir en un estado estirado o comprimido, por lo que la vesiculación y la formación de esferocitos están relacionadas con el acortamiento de la espectrina, que el aumento de oxidación está asociada con la vesiculación. En el modelo de formación de cavidades dentro del plano y estructuras convexas (“Vesiculación hacia fuera” esferocitosis), esto probablemente sucede debido a los lípidos y entrecruzamientos de filamentos de espectrina mostrando el perfil dado de la sección cortada, que los máximos y mínimos sobre el perfil están casi fusionados (Kozlova et al., 2014).

También muestran el proceso de desarrollo de defectos topológicos de membranas de GRs a niveles de micro y nanoescala. La formación de las estructuras de grano como en la membrana con tamaños típicos de 120-200 nm se demostró

experimentalmente. El proceso de granos era dependiente de la concentración de hemina y el tiempo de incubación. El tamaño es una de las características más importantes de nanoestructuras y determina sus propiedades. Es por eso que es muy importante analizar el tamaño y la forma de estas estructuras. La microscopía de fuerza atómica (AFM) es ampliamente utilizada para visualizar nanoestructuras en 3D (Grinspan, 1985; Nowakowski et al., 2001; Wright & Armstrong, 2006).

Rugosidad (Rrms)

Rugosidad de Células Completas. Se utilizaron imágenes de muestras micro, normo y macrocíticas escaneadas con la AFM en modo de NC-AFM (áreas de 50 X 50 μm) (tabla 3).

Tanto las células microcíticas y macrocíticas tuvieron un Rrms (nm) menor que los normocitos.

De las células microcíticas los ovalocitos tuvieron el menor valor de Rrms (nm) y los codocitos mayor, seguida por los esferocitos. Para las células codocitos y equinocitos (normocíticos) los valores de Rrms (nm) fueron muy cercanos entre sí. El valor de Rrms (nm) en las células macrocíticas con forma codocitos tienen mayor Rrms que los equinocitos.

Los codocitos mostraron más Rrms (nm) en micro y macro que en los normocitos, aunque los valores en los tamaños normales y micro fueron muy cercanos los macrocitos, si fueron mayores. Mientras que los equinocitos en condiciones macrocíticas obtuvieron menor Rrms que las de tamaño normal.

Tabla 3. Rugosidad de células completas

Tipo de muestra	Formas analizadas				
	Normocito	Codocito	Equinocito	Ovalocito	Esferocito
Microcitos	9.897 ± 13.4	13.18 ± 11.66	NP	8.838 ± 12.97	13.2 ± 15.48
Normocitos	19.26 ± 22.24	13.14 ± 18.21	13.85 ± 14.75	NP	NP
Macroscitos	11 ± 16.57	14.97 ± 15.26	12.71 ± 16.95	NP	NP

Los valores representan la diferencia en las alturas en nm.

NP, significa que ese tipo celular no se presentó en las muestras analizadas.

Rugosidad en el Área Bicóncava con el Uso de Líneas de Alturas Promedios.

La concavidad de las células normales arrojó una R_{rms} (nm) mayor que en los casos de macroscitos y microscitos; como se puede observar las células macrocíticas tienen un valor de R_{rms} (nm) mucho más pequeño que los microscitos (tabla 4).

En las muestras que presentan microscitos las células tienen un comportamiento muy variado. Los ovalocitos son los menos rugosos, seguido por los esferocitos, los normocitos, microscitos y finalmente siendo lo más rugosos los codocitos. Los normocitos con forma de equinocito tuvieron mayor rugosidad y los codocitos menor rugosidad. En las células macrocíticas el valor mayor de R_{rms} fue para los codocitos y el menor valor con los equinocitos.

Las células con forma de codocitos con tamaño normocítico tuvieron el menor valor de R_{rms} , seguido por los macrocíticos) y el de mayor valor fue el microcítico. Las células con forma de equinocitos en los tamaños macrocíticas tienen menor valor de R_{rms} que en la normocitos.

Tabla 4. Rugosidad de la zona bicóncava

Tipo de muestra	Formas analizadas				
	Normocito	Codocito	Equinocito	Ovalocito	Esferocito
Microcito	5.007 ± 5.172	11.98 ± 9.327	NP	0.8445 ± 0.6363	2.277 ± 2.538
Normocito	6.541 ± 7.266	4.038 ± 4.357	9.299 ± 5.555	NP	NP
Macroscito	3.749 ± 2.862	6.507 ± 4.583	4.454 ± 2.988	NP	NP

Los valores representan la diferencia en las alturas en nm.

NP, significa que ese tipo celular no se presentó en las muestras analizadas.

Con el cálculo de la rugosidad de las células completas se observó que tanto en la microcitosis como en la macrocitosis, la rugosidad es menor que una célula normal; incluso las células patológicas con normocitosis tienen menor rugosidad que la célula normal (figura 34). Se calculó la rugosidad de eritrocitos deformados (por métodos químicos) y normales, y obtuvieron que las células que presentaban defectos en la membrana-citoesqueleto tenían una rugosidad media menor que las sanas. Estos resultados indican que nuestras muestras identificadas como patológicas presentan alteraciones en la membrana. Los valores de la rugosidad que obtuvimos son mayores a los de Girasole, lo cual puede deberse a que ellos caracterizaron en menor área de escaneo; sin embargo, el resultado coincide (Marco Girasole et al., 2012).

Por su parte, la rugosidad en la biconcavidad celular nos ofrece información más detallada del comportamiento membranal. Comparando todas las células analizadas, logramos observar que las muestras microcíticas que tienen el valor con mayor rugosidad son los ovalocitos y de menor rugosidad los codocitos respecto a todas las células normales. Se esperaba que el menor valor de rugosidad fuera de los esferocitos pero el cambio por la pérdida de la membrana crea una cierta variedad aumentada en el valor de rugosidad al momento de promediar todas las células esferocíticas encontradas. Las células macrocíticas presentaron mayor rugosidad en la concavidad que en tamaño normal. Analizando los valores promedio de rugosidad entre codocitos, los macrocíticos tienen mayor rugosidad. Los equinocitos macrocíticos son más rugosos que los equinocitos normocíticos, y entre las células de formas normales pero distintos tamaños el macrocito tiene mayor irregularidad, seguida por el microcito y por último el normal (figura 35).

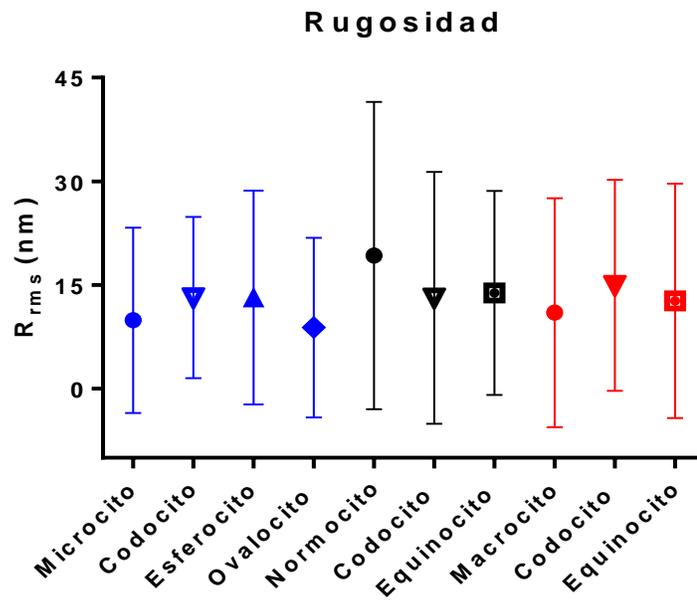


Figura 34. Rugosidad Promedio en la Célula Completa.
 Este cálculo fue obtenido con las alturas de célula completa donde se observa que las células microcíticas y macrocíticas tienen menor valor de R_{rms} (nm) normal que una célula normal. Los valores en azul representan las células en microcitos, negro normocitos y rojo macrocitos. Los valores representan la media y desviación estándar de la media. Los datos se obtuvieron del análisis de 5 células en cada morfología.

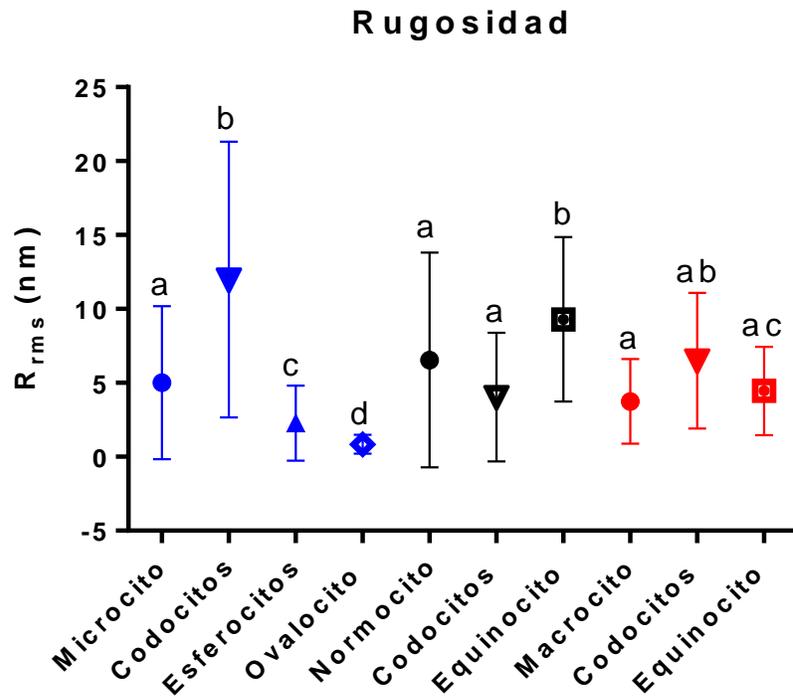


Figura 35. Rugosidad del área bicóncava.

Este cálculo fue obtenido con las alturas de la región cóncava o convexa del eritrocito con el uso de una sola línea de alturas promedio de esta área y procesados en el programa Prisma 6. El gráfico muestra el promedio \pm DS de cinco células en cada morfología, en azul microcitosis, en negro normocitosis y en rojo macrocitosis. Se realizó un anova de una vía y comparación de medianas por la prueba de Dunn's, y se observó que existe diferencias en rugosidad de las distintas formas analizadas.

CONCLUSIONES

La microscopía de fuerza atómica permite obtener imágenes topográficas de los GRs patológicos y sanos, sin necesidad de realizar tinción o algún tratamiento especial a la muestra. Los resultados obtenidos mostraron que los valores del área superficial y volumen de los glóbulos rojos obtenidos mediante el método de grano (watershed), tienen mayor relación que el área superficial obtenida por el método de superficie, por ello se proponen como una alternativa para clasificar muestras con micro y macrocitosis por microscopía de fuerza atómica. Sin embargo, todos los métodos de análisis aplicados se correlacionan con el análisis de los datos y se confirmó con el volumen corpuscular medio de las muestras.

Consideramos que el VGW tiene una aplicación directa ya que se compara en magnitud espacial (volumen) de glóbulos rojos de manera individual y el VCM considera el total de los eritrocitos presentes en la muestra. En nuestros resultados, para que una muestra sea considerada en microcitosis utilizando el VGW presentaron al menos el 49% de los GRs con un valor menor a $22 \mu\text{m}^3$, para el caso de las muestras en macrocitosis este valor fue mayor a $44 \mu\text{m}^3$ lo que representa un 56% de GR en macrocitosis.

El perfil lineal obtenido por AFM permitió encontrar diferencias morfométricas muy características de las formas individuales analizadas en condiciones micro, normo y macrocíticas. Además, valores disminuidos de área superficial y volumen mostraron anemia microcítica con poiquilocitosis ligera (abundaron formas codocitos, moderados ovalocitos y esferocitos), microcítica con poiquilocitosis marcada (esferocitosis ligera y equinocitos moderada) y microcítica con esferocitosis marcada. Las muestras macrocíticas (área superficial y volumen elevados) mostraron una poiquilocitosis moderada con presencia de codocitos y equinocitos ligeras, y normocitos marcadas. Datos que posteriormente pueden ser utilizados en el diagnóstico de anemias.

Por otra parte, la rugosidad cuadrática media en nuestro trabajo no es un indicador diferencial para el tamaño de los GR. Sin embargo, las muestras normocíticas son más rugosas y tienen mayor variación de alturas que las células con macros y microcitosis. A su vez, la rugosidad bicóncava indicó tener mayor variación entre las distintas formas de glóbulos rojos independientemente de ser micro, normo o macrocíticas.

En conjunto, el análisis de las características morfométricas de los GR mediante AFM es un área de oportunidad para el diagnóstico clínico de anemias; sin embargo, es necesario mayor cantidad de estudios y una aproximación a nivel nanoescala para detectar cambios que sean indicativos de patologías.

TRABAJOS A FUTURO

Para la continuación de este trabajo es importante una clasificación de GRs con patologías certificadas, con la finalidad de establecer parámetros específicos para cada caso. Establecer los parámetros de ASS, ASG y VGW para cada tipo de anemia. El resultado obtenido aquí no muestra la importancia de comparar la morfología de GRs sanos en relación a su concentración de hemoglobina, para esto se pretende aprovechar los valores de VGW y ASG obtenida por la AFM y establecer (con la formula de Ponder) la concentración de Hb de un solo eritrocito (Ponder, 1924).

PRODUCTOS OBTENIDOS

XVIII Reunión Universitaria de Investigación en Materiales Reconocimiento Presentación del Poster con el Título “De lo micro a lo nano: Microscopía de Fuerza Atómica; Redefiniendo los límites de la morfología Celular”. Noviembre 2013.

XVIII Reunión Universitaria de Investigación en Materiales Reconocimiento Presentación del Poster con el Título “Discriminación de eritrocitos macro y microcíticos utilizando la Microscopía de Fuerza Atómica”. Noviembre 2013.

XVIII Reunión Universitaria de Investigación en Materiales Reconocimiento Presentación del Poster con el Título “Modelos morfológicos de eritrocitos con alteraciones estructurales utilizando la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)”. Noviembre 2013.

BIBLIOGRAFÍA

- Ali, J., Ahmad, A. R., George, L. E., Der, C. S., & Aziz, S. (2013). Red Blood Cell Recognition using Geometrical Features. *IJCSI International Journal of Computer Science Issues*, 10.
- Amandeep Kaur, A. (2014a). Image Segmentation Using Watershed Transform. *International Journal of Soft Computing and Engineering (IJSCE)*, 4(1), 5 - 8.
- Amandeep Kaur, A. (2014b). Image Segmentation Using Watershed Transform. *International Journal of Soft Computing and Engineering (IJSCE)*, 4(1).
- Argente, A. H. (2005). *Semiologia Medica/ Medical Semiology: Fisiopatología, Semiología Y Propedeutica, Enseñanza Basada En El Paciente/ Physiothology, Semiology and Propaedeutic*. Editorial Medica Panamericana Sa de.Cv.
- Ariel Gómez, A. G. Á., Gergory Ibrahim Massy. (2009). Interacción punta-muestra dieléctrica en microscopía de fuerza electrostática. *Revista Facultad de Ingeniería*, 50, 10. Retrieved from
- Balcells, J., Romeral, J. L., & Martínez, J. L. R. (1997). *Autómatas programables*: Marcombo.
- Belaid, L. J., & Mourou, W. (2011). Image segmentation: a watershed transformation algorithm. *Image Analysis & Stereology*, 28(2), 93-102.
- Bennett, V. (1989). The spectrin-actin junction of erythrocyte membrane skeletons. *Biochim Biophys Acta*, 988(1), 107-121.
- Bessis, M., Brecher, G., & Gaillard, M. (2012). *Blood Smears Reinterpreted*: Springer Berlin Heidelberg.
- Beucher, S., & Meyer, F. (1992). The morphological approach to segmentation: the watershed transformation. *OPTICAL ENGINEERING-NEW YORK-MARCEL DEKKER INCORPORATED-*, 34, 433-433.
- Bhushan, B. (2013). *Introduction to Tribology* (Revised Ed. 2nd ed.). John Wiley & Sons Inc: Wiley.
- Binnig, G., Quate, C. F., & Gerber, C. (1986). Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*, 56(9), 930-933.
- Boquera, M. C. E. (2005). *Comunicaciones ópticas: conceptos esenciales y resolución de ejercicios*: Díaz de Santos.
- Butt, H.-J., Cappella, B., & Kappl, M. (2005). Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surface science reports*, 59(1), 1-152.

- C. Villacrez, V. Q., O. García, G. Bolaños, P. Arango, C. Rincón. (2011). Morphological Study Of V/VN Multilayers Using The Software AnaCe. *Revista Colombiana de Física*, 43(2). Retrieved from
- Cady, W. G. (1964). *Piezoelectricity: an introduction to the theory and applications of electromechanical phenomena in crystals* (D. Publications Ed. revised ed. Vol. 1). New York: Dover Publications.
- Callister, W. D. (2007). *Materials Science And Engineering: An Introduction*: John Wiley & Sons.
- Carr, J. H., & Rodak, B. F. (2010). *Atlas de hematología clínica / Clinical Hematology Atlas*: Editorial Medica Panamericana Sa de.Cv.
- Carvalho, F. A., & Santos, N. C. (2012). Atomic force microscopy-based force spectroscopy — biological and biomedical applications. *IUBMB Life*, 64(6), 465-472. doi:10.1002/iub.1037
- Castrillo, J. M. A., & Álvarez, E. V. (2005). *Hematología Clínica. Temas de Patología Médica*: Universidad de Oviedo, Servicio de Publicaciones.
- Corporation, P. S. (2011). XEI Powerful Image Processing Tool for SPM Data Software Manual (Version 1.8.0).
- Chen, S., Zhao, M., Wu, G., Yao, C., & Zhang, J. (2012). Recent Advances in Morphological Cell Image Analysis. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2012, 10.
- Chen, Y., & Cai, J. (2006). Membrane deformation of unfixed erythrocytes in air with time lapse investigated by tapping mode atomic force microscopy. *Micron*, 37(4), 339-346.
- Chuklanov, A. P., Ziganshina, S. A., & Bukharaev, A. A. (2006). Computer program for the grain analysis of AFM images of nanoparticles placed on a rough surface. *Surface and Interface Analysis*, 38(4), 679-681.
- D'Costa, N. P., & Hoh, J. H. (1995). Calibration of optical lever sensitivity for atomic force microscopy. *Review of Scientific Instruments*, 66(10), 5096-5097.
- Dean, L. (2005). Blood groups and red cell antigens.
- Diez-Silva, M., Dao, M., Han, J., Lim, C.-T., & Suresh, S. (2010). Shape and Biomechanical Characteristics of Human Red Blood Cells in Health and Disease. *MRS bulletin / Materials Research Society*, 35(5), 382-388. Retrieved from
- Eaton, P., & West, P. (2010). *Atomic Force Microscopy*: Oxford University Press.
- Escorza, M. A. Q., & Salinas, J. V. C. (2006). Eriptosis, la apoptosis del eritrocito. *Revista de Educación Bioquímica*, 25(3), 85-89.
- Francis, L. W., Lewis, P. D., Wright, C. J., & Conlan, R. S. (2010). Atomic force microscopy comes of age. *Biology of the Cell*, 102(2), 133-143.

- Gaona, C. A. (2003). Interpretación c etación c etación clínica de la biometría hemática línica de la biometría hemática. *Medicina Universitaria*, 5(18), 35.
- Girasole, M., Cricenti, A., Generosi, R., Congiu-Castellano, A., Boffi, F., Arcovito, A., Amiconi, G. (2000). Atomic force microscopy study of erythrocyte shape and membrane structure after treatment with a dihydropyridinic drug. *Applied Physics Letters*, 76(24), 3650-3652.
- Girasole, M., Cricenti, A., Generosi, R., Congiu-Castellano, A., Boumis, G., & Amiconi, G. (2001). Artificially induced unusual shape of erythrocytes: an atomic force microscopy study. *Journal of Microscopy*, 204(1), 46-52.
- Girasole, M., Dinarelli, S., & Boumis, G. (2012). Structure and function in native and pathological erythrocytes: A quantitative view from the nanoscale. *Micron*, 43(12), 1273-1286.
- Girasole, M., Pompeo, G., Cricenti, A., Longo, G., Boumis, G., Bellelli, A., & Amiconi, S. (2010). The how, when, and why of the aging signals appearing on the human erythrocyte membrane: an atomic force microscopy study of surface roughness. *Nanomedicine*, 6(6), 760-768.
- Gómez, R. L. M. G. (2006, DICIEMBRE 2006). La energía de nuestro entorno sustituye a las baterías convencionales. *COIIM*, 29, 5.
- González Palacios, S. E. (2012). *“EnergyMove: diseño de un dispositivo piezoeléctrico para harvesting de energía humana”*. (Tesis de Ingeniera en Electrónica y Telecomunicaciones). (Ingeniero en Electrónica y Telecomunicaciones), Universidad Técnica Particular de Loja
- Grinspan, S. (1985). El estudio del frotis de sangre periférica. *Educación médica continúa. Revista hondureña. Honduras*, 53(4).
- Haugstad, G. (2012). Overview of AFM *Atomic Force Microscopy* (pp. 1-32): John Wiley & Sons, Inc.
- Hutter, J. L., & Bechhoefer, J. (1993). Manipulation of van der Waals forces to improve image resolution in atomic-force microscopy. *Journal of Applied Physics*, 73(9), 4123-4129.
- Jaschke, M. B., Hans-Jurgen. (1995). Height calibration of optical lever atomic force microscopes by simple laser interferometry. *Review of Scientific Instruments*, 66(2).
- Kelley, W. N. (1993). *Medicina* (E. M. Panamericana Ed. 2ª ed ed.). MADRID: Médica Panamericana.
- Khairy, K., Foo, J., & Howard, J. (2010). Shapes of Red Blood Cells: Comparison of 3D Confocal Images with the Bilayer-Couple Model. *Cellular and molecular bioengineering*, 1(2-3), 173-181.

- Khulbe, K. C., Feng, C. Y., & Matsuura, T. (2007). *Synthetic Polymeric Membranes: Characterization by Atomic Force Microscopy*. Springer Berlin Heidelberg.
- Kozlova, E., Chernysh, A., Moroz, V., Gudkova, O., Sergunova, V., & Kuzovlev, A. (2014). Transformation of membrane nanosurface of red blood cells under hemin action. *Scientific Reports*, 4, 6033.
- Kurland, N. E., Drira, Z., & Yadavalli, V. K. (2012). Measurement of nanomechanical properties of biomolecules using atomic force microscopy. *Micron*, 43(2–3), 116-128.
- Kuznetsova, T. G., Starodubtseva, M. N., Yegorenkov, N. I., Chizhik, S. A., & Zhdanov, R. I. (2007). Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron*, 38(8), 824-833.
- Lamia Jaafar Belaid, W. M. (2009). IMAGE SEGMENTATION: A WATERSHED TRANSFORMATION ALGORITHM. *Image Anal Stereol*, 28, 10.
- Lamzin, I. M., & Khayrullin, R. M. (2014). The Quality Assessment of Stored Red Blood Cells Probed Using Atomic-Force Microscopy. *Anatomy Research International*, 2014, 869683.
- Lei, H., & Karniadakis, G. E. (2012). Quantifying the rheological and hemodynamic characteristics of sickle cell anemia. *Biophysical journal*, 102(2), 185-194.
- Li, M., Liu, L., Xi, N., Wang, Y., Dong, Z., Xiao, X., & Zhang, W. (2012). Atomic force microscopy imaging and mechanical properties measurement of red blood cells and aggressive cancer cells. *Science China Life Sciences*, 55(11), 968-973.
- Liu, B., & Du, Z. (2014). *Advances in Services Science and Services Information Technology (Set): Computational Mechanics*.
- Liu, J., Guo, X., Mohandas, N., Chasis, J. A., & An, X. (2010). Membrane remodeling during reticulocyte maturation. *Blood*, 115(10), 2021-2027.
- Maciaszek, J. L., & Lykotrafitis, G. (2011). Sickle cell trait human erythrocytes are significantly stiffer than normal. *Journal of biomechanics*, 44(4), 657-661.
- Manascero, A. R. (2000). *Reporte gráfico del cuadro hemático: Automatización y relación con el FSP*: Pontificia Universidad Javeriana.
- Martínez, J. C. M. (2002). *Microscopía fuerza electrostática (EFM)*. (Licenciatura), Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I).
- Mohandas, N., & Gallagher, P. G. (2008). Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*, 112(10), 3939-3948.
- Moreno, J., Fernandez, J., Ochoa, P., Ceres, R., Calderón, L., Rocon, E., & Pons, J. (2004). Aplicación de sensores piezoeléctricos cerámicos a la caracterización biomecánica. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 43(3), 668-673.
- Mukherjee, D., Saha, M., Routray, A., & Chakraborty, C. (2015). Nano-Scale Surface Characterization of Human Erythrocytes by Atomic Force Microscopy: A Critical Review.

- Murillo, L. J., & Pérez, F. J. M. (2014). *Medicina de urgencias y emergencias + acceso web: Guía diagnóstica y protocolos de actuación*: Elsevier Health Sciences Spain.
- Murray, R. M. (2008). Feedback systems: An introduction for scientists and engineers.
- Nader, J., & Karthik, L. (2004). A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences. *Mechatronics (Oxf)*, 14(8), 907-945.
- Navarro, J. S. (2010). *Abordaje de la anemia microcítica, nuevas herramientas diagnósticas*. Paper presented at the AEPap ed. Cursode Actualización Pediatría.
- Noguchi, H., & Gompper, G. (2005). Shape transitions of fluid vesicles and red blood cells in capillary flows. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(40), 14159-14164.
- Nowakowski, R., & Luckham, P. (2002). Imaging the surface details of red blood cells with atomic force microscopy. *Surface and Interface Analysis*, 33(2), 118-121.
- Nowakowski, R., Luckham, P., & Winlove, P. (2001). Imaging erythrocytes under physiological conditions by atomic force microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1514(2), 170-176.
- O'Reilly, M., McDonnell, L., & O'Mullane, J. (2001). Quantification of red blood cells using atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*, 86(1-2), 107-112.
- Ono, T., Miyashita, H., & Esashi, M. (2002). Electric-field-enhanced growth of carbon nanotubes for scanning probe microscopy. *Nanotechnology*, 13(1), 62.
- Orcajo, G. A., Cabanas, M. F., & Melero, M. G. (1998). *Técnicas para el mantenimiento y diagnóstico de máquinas eléctricas rotativas*: Marcombo.
- Ortiz, F., Torres, F., De Juan, E., & Cuenca, N. (2002). Colour Mathematical Morphology For Neural Image Analysis. *Real-Time Imaging*, 8(6), 455-465.
- P.P.Acharjya, A. S., S.Sarkar, S.Dey, S.Ghosh. (2013). A NEW APPROACH OF WATERSHED ALGORITHM USING DISTANCE TRANSFORM APPLIED TO IMAGE SEGMENTATION. *International Journal of Innovative Research in Computer and Communication Engineering*, 1(2), 5.
- Palomino, N. L. S., & Concepción, L. E. P. (2010). Watershed: un algoritmo eficiente y flexible para segmentación de imágenes de geles 2-DE. *Revista de investigación de Sistemas e Informática*, 7(2), 35-41.
- Parot, P., Dufrêne, Y. F., Hinterdorfer, P., Le Grimellec, C., Navajas, D., Pellequer, J.-L., & Scheuring, S. (2007). Past, present and future of atomic force microscopy in life sciences and medicine. *Journal of Molecular Recognition*, 20(6), 418-431. doi:10.1002/jmr.857
- Parsegian, V. A. (2005). *Van der Waals Forces: A Handbook for Biologists, Chemists, Engineers, and Physicists*: Cambridge University Press.

- Peng, Z., Li, X., Pivkin, I. V., Dao, M., Karniadakis, G. E., & Suresh, S. (2013). Lipid bilayer and cytoskeletal interactions in a red blood cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(33), 13356-13361.
- Polyakov, P., Soussen, C., Duan, J., Duval, J. F. L., Brie, D., & Francius, G. (2011). Automated Force Volume Image Processing for Biological Samples. *PLoS ONE*, 6(4), e18887.
- Ponder, E. (1924). Observations on the correlation between area and haemoglobin content of the erythrocyte. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*, 14(1), 37-47.
- Renu, S., Pati, H. P., & Mahapatra, M. (2012). *Atlas of Hematology*: Jaypee Brothers, Medical Publishers.
- Rodak, B. F. (2005). *Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas*: Médica Panamericana.
- Rosa, M. G. A. (2003). *Atlas de morfología celular, alteraciones y enfermedades relacionadas*: Pontificia Universidad Javeriana.
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2007). *Histología*: Médica Panamericana.
- Schwarz, J. A., Contescu, C. I., & Putyera, K. (2004). *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*: M. Dekker.
- Shih, F. Y., King, C. T., & Pu, C. C. (1995). Pipeline architectures for recursive morphological operations. *Image Processing, IEEE Transactions on*, 4(1), 11-18.
- Takeyasu, K. (2014). *Atomic Force Microscopy in Nanobiology* (Bio Ed. Pan Stanford Publishing ed.): Pan Stanford.
- Tang, J., Jiang, C., Xiao, X., Fang, Z., Li, L., Han, L., . . . Li, H. (2015). Changes in red blood cell membrane structure in G6PD deficiency: An atomic force microscopy study. *Clinica Chimica Acta*, 444, 264-270.
- Tang, J., Yang, G., Zhang, Q., Parhat, A., Maynor, B., Liu, J., . . . Zhou, O. (2005). Rapid and Reproducible Fabrication of Carbon Nanotube AFM Probes by Dielectrophoresis. *Nano Letters*, 5(1), 11-14.
- Technology, G. I. o. (2008). *Atomic force microscopy study of nano-confined liquids*: ProQuest.
- Teijón, J. M. (2009). *Fundamentos de bioquímica metabólica*: Editorial Tébar, S. L.
- Tipler, P. A., & Mosca, G. (2005). *Física para la ciencia y la tecnología*: Reverté.
- Turgeon, M. L. (2005). *Clinical Hematology: Theory and Procedures*: Lippincott Williams & Wilkins.
- Vahabi, S., Nazemi Salman, B., & Javanmard, A. (2013). Atomic Force Microscopy Application in Biological Research: A Review Study. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 38(2), 76-83.
- Villamor, P. G. M., & Esteban, J. M. S. (1993). *Anatomo-fisiología: I*: Ediciones Científicas y Técnicas.

- Vincent, L., & Soille, P. (1991). Watersheds in digital spaces: an efficient algorithm based on immersion simulations. *Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on*, 13(6), 583-598.
- Vives, A. A. (2008). *Piezoelectric Transducers and Applications* (A. A. Vives Ed. Second ed.).
- Walker, H. K., Hall, W. D., & Hurst, J. W. (1990). *Clinical methods. The History, Physical, and Laboratory Examinations* (3rd ed.). Emory University School of Medicine, Atlanta, Georgia: Butterworth Publishers, a division of Reed Publishing.
- Wright, C. J., & Armstrong, I. (2006). The application of atomic force microscopy force measurements to the characterisation of microbial surfaces. *Surface and Interface Analysis*, 38(11), 1419-1428.
- Wu, Y., Hu, Y., Cai, J., Ma, S., Wang, X., Chen, Y., & Pan, Y. (2009). Time-dependent surface adhesive force and morphology of RBC measured by AFM. *Micron*, 40(3), 359-364.
- Yawata, Y. (2006). *Cell Membrane: The Red Blood Cell as a Model*. John Wiley & Sons: Wiley.
- Zachee, P., Snauwaert, J., Vandenberghe, P., Hellemans, L., & Boogaerts, M. (1996). Imaging red blood cells with the atomic force microscope. *British journal of haematology*, 95(3), 472-481.
- Zhang, B., Liu, B., Zhang, H., & Wang, J. (2014). Erythrocyte Stiffness during Morphological Remodeling Induced by Carbon Ion Radiation.

APÉNDICE A MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA A PROFUNDIDAD

A1. Conceptos Básicos de Instrumentación

Para poder comprender mejor el funcionamiento del AFM es necesario entender tres conceptos básicos de su instrumentación (Eaton & West, 2010).

A1.1. Transductores Piezoeléctricos (Escáner piezoeléctrico). Algunos elementos cristalinos como el cuarzo, la turmalina y otros materiales sintéticos, poseen la propiedad de adquirir polarización en la dirección de los denominados ejes eléctricos cuando se les somete un esfuerzo y se deforman según la dirección de los llamados ejes mecánicos (deformación). Este fenómeno se debe al desplazamiento que sufre el centro de gravedad de las cargas o iones positivos y negativos generándose un efecto de dipolo eléctrico. Un circuito electrónico permite detectar por influencia la carga eléctrica y proporcionar una señal de salida proporcional a la deformación, a este fenómeno se le conoce como efecto piezoeléctrico directo (figura 36) (Balcells, Romeral, & Martínez, 1997; Callister, 2007; González Palacios, 2012; Tipler & Mosca, 2005).

A1.1.1 Formulación Matemática del Efecto Piezoeléctrico. En un primer enfoque, los experimentos realizados por los hermanos Curie demostraron que la densidad superficial de las cargas vinculadas era proporcional a la presión ejercida y podría desaparecer con ella. Esta relación puede formularse de la manera siguiente (Vives, 2008):

$$P_p = D\tau \quad (3)$$

Donde P_p es el vector de polarización piezoeléctrica, cuya magnitud es igual a la densidad de superficie de carga vinculada por el efecto piezoeléctrico en la superficie que ha sido considerada, d es el coeficiente piezoeléctrico de deformación y T es el estrés al cual el material piezoeléctrico es sujeto.

Los hermanos Curie verificaron el efecto piezoeléctrico inverso y demostraron que la relación entre la deformación producida y la magnitud del campo eléctrico aplicado en el efecto inverso (figura 37), fue igual a la relación entre la polarización producida y la magnitud de estrés aplicada en el efecto directo. Consistentemente, el efecto piezoeléctrico inverso puede ser formulado en una manera simple, como primer enfoque:

$$S_P = dE \quad (4)$$

Donde S_P es la deformación producida por el efecto piezoeléctrico y E es la magnitud del campo eléctrico aplicado.

Los efectos piezoeléctricos directo e inverso pueden ser formulados alternativamente, considerando las propiedades elásticas del material, como sigue:

$$P_P = dT = dcS = eS \quad (5)$$

$$T_P = cS_P = cdE = eE \quad (6)$$

Donde c es la constante elástica, que relaciona el estrés generado por la deformación aplicada. $T = cS$, esta obedece al coeficiente de acoplamiento el cual relaciona la deformación producida por la aplicación de un estrés, $T = cS$, y eE la constante de estrés piezoeléctrico. Note que la polarización, el estrés, y la deformación causadas por el efecto piezoeléctrico tienen que ser especificados con la P subscripta, mientras estos son externamente aplicados no serán subscriptos.

El material piezoeléctrico presenta unas ecuaciones constitutivas, en las que se deben considerar los efectos de acoplamiento debidos a las variaciones en la deformación y el JH campo eléctrico en las tres direcciones ortogonales. La notación de tensores que se adopta y los ejes de referencia son los reflejados en la figura 38.

Definiendo la dirección de polarización de la cerámica como el eje 2 se tiene una relación entre tensión mecánica experimentada por el material, el campo eléctrico aplicado, y el desplazamiento eléctrico resultante, dado por:

$$D_i = \varepsilon_i E_i + d_{ij} T_j \quad (7)$$

Donde d_{ij} es el tensor de constantes piezoeléctricas de carga, habitualmente denominadas simplemente constantes piezoeléctricas, D_i es el vector de desplazamiento

eléctrico, ε_i es el tensor permeabilidad eléctrica y T_j es el tensor de esfuerzos mecánicos. Por conversión, el primer subíndice de las constantes piezoeléctricas indica la dirección del campo eléctrico y el segundo la dirección del esfuerzo aplicado. Una cerámica piezoeléctrica tiene sólo un tipo de matriz de constantes piezoeléctricas, sea cual sea la simetría de los monocristales constituyentes. Como todo material policristalino, la cerámica piezoeléctrica es inicialmente isotrópica, pero esta isotropía es destruida en la dirección del campo de polarización, manteniéndose en el plano perpendicular a éste. Esta isotropía planar de la cerámica piezoeléctrica se expresa en sus constantes piezoeléctricas por las igualdades:

$$d_{32} = d_{31} \quad (8)$$

Esta ecuación significa que un desplazamiento eléctrico paralelo al eje de polarización 3 (Z) interactúa de la misma manera con las tensiones mecánicas axiales a lo largo de cualquiera de los ejes 1 (X) y 2 (Y).

$$d_{24} = d_{15} \quad (9)$$

Esta relación establece un desplazamiento eléctrico paralelo al eje interacciona en la misma manera con un esfuerzo de cortadura en el plano que un desplazamiento a lo largo del eje con un esfuerzo de corte en el plano. Se define entonces un tensor piezoeléctrico para una cerámica piezoeléctrica polarizada en el eje con la siguiente matriz:

$$\begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & d_{15} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & d_{15} & 0 & 0 \\ d_{31} & d_{31} & d_{33} & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (10)$$

Para la configuración de valores ε_2 y ε_1 coinciden para la simetría considerada (cuando la cerámica piezoeléctrica está polarizada según la dirección). Por lo tanto, se pueden reemplazar en la ecuación general 11:

$$D_1 = \varepsilon_1 E_1 + d_{15} T_5 \quad (11)$$

$$D_2 = \varepsilon_1 E_2 + d_{15} T_4$$

$$D_3 = \varepsilon_3 E_3 + d_{31}(T_1 + T_2) + d_{33} T_3$$

Los parámetros piezoeléctricos de interés al considerar los efectos electromecánicos de los materiales piezoeléctricos son constantes piezoeléctricas de carga (d_{31} y d_{33}), las constantes piezoeléctricas de voltaje (g_{31} y g_{33}), y los factores de acoplamiento electromecánico (k_{31} , k_{33} , k_p y k_t). Las expresiones anteriores definen las ecuaciones constitutivas de la cerámica piezoeléctrica. Cuando sobre la cerámica se disponen electrodos con una configuración particular, se están imponiendo superficies equipotenciales que dan a lugar modificaciones en el desplazamiento eléctrico, D_i , puesto en manifiesto bajo la aplicación de esfuerzos mecánicos. Bajo estas condiciones de estudio analítico de las ecuaciones constitutivas carece de sentido y se impone el empleo de métodos numéricos de análisis para evaluar el efecto de los esfuerzos mecánicos aplicados sobre el desplazamiento eléctrico desarrollado. A partir de una cerámica piezoeléctrica polarizada según el eje 3 se estudia los efectos de los electrodos en diferentes configuraciones sobre el elemento, analizando los efectos de acoplamiento y la posibilidad de obtener una medida de las componentes en las tres direcciones de desplazamiento haciendo uso de un solo elemento mediante una medición multiplexada entre electrodos. Si se tienen los electrodos como en el elemento mostrado en la figura 39, se obtiene la componente D_3 y desplazamiento eléctrico (carga eléctrica entre electrodos perpendiculares al eje 3) bajo la aplicación de cargas mecánicas normales en las dirección 3. Esta configuración es teóricamente insensible a tensiones de corte según las direcciones 4 y 5. De forma similar, con la misma configuración, la componente D_2 del desplazamiento eléctrico es proporcional a la carga mecánica de corte según la dirección 4. De nuevo, teóricamente este desplazamiento eléctrico es independiente de la carga mecánica norma en la dirección 3 (Moreno et al., 2004). Uno de los diseños generadores piezoeléctricos más populares, es el conocido como de “estructura de Cantiléver” (figura 40), cuando esta estructura es excitada por una vibración mecánica, la deformación curva de la barra y origina cambios en los valores de tensión y compresión de las placas, entonces la estructura genera un voltaje de corriente alterna. En esta estructura, el piezoeléctrico recupera su estado original cuando cese la fuerza aplicada sobre él (Cady, 1964; Gómez, 2006; González Palacios, 2012). En la figura 41 se muestra las Geometrías típicas para piezoeléctricos usados en AFM así como sus movimientos ecuaciones.

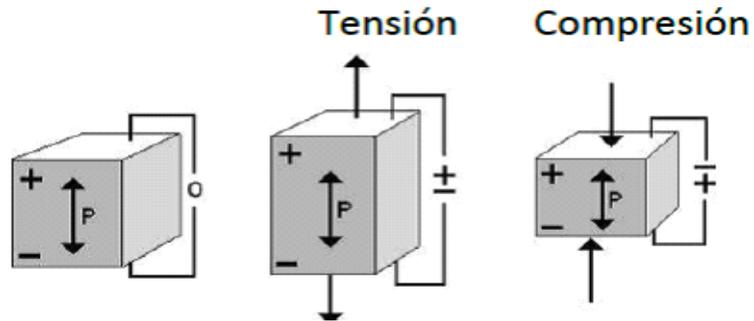


Figura 36. Efecto piezoeléctrico directo.

Cuando los cristales piezoeléctricos son deformados por la aplicación de una tensión externa, en la superficie del cristal aparecen cargas eléctricas, cuya polaridad depende de la dirección de la tensión.

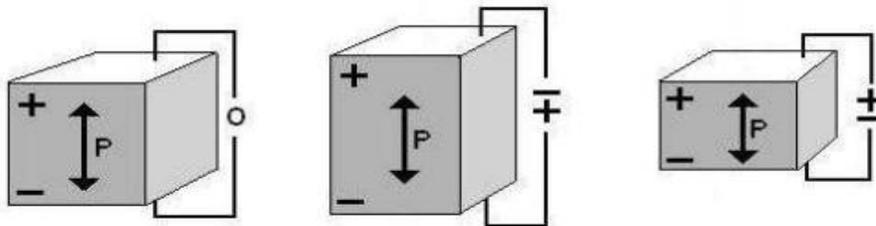


Figura 37. Piezoeléctrico inverso.

Cuando el cristal piezoeléctrico se encuentra bajo influencia de un capo eléctrico, o, cuando cargas eléctricas externas se aplican a las caras del cristal, las dimensiones del cristal varían.

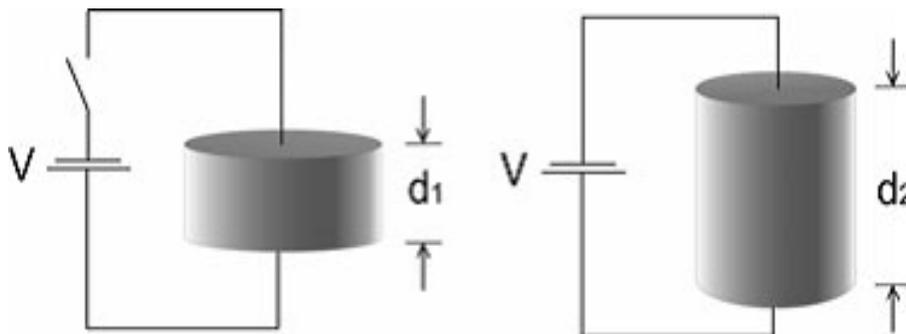


Figura 38. Piezoeléctrico en disco.

Un disco piezoeléctrico puede expandirse radialmente ($d_2 > d_1$) cuando se le aplica un potencial de voltaje a los electrodos. El disco cambiará de forma tal que el volumen se conserva.

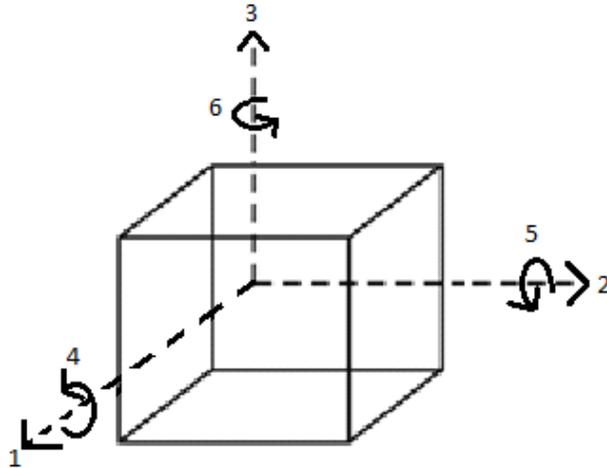


Figura 39. Direcciones piezoeléctrico.
 Convención para la expresión de las ecuaciones constitutivas del medio piezoeléctrico, en las que deben considerarse los efectos de acoplamiento debidos a las variaciones en la deformación y el campo eléctrico en las tres direcciones ortogonales.

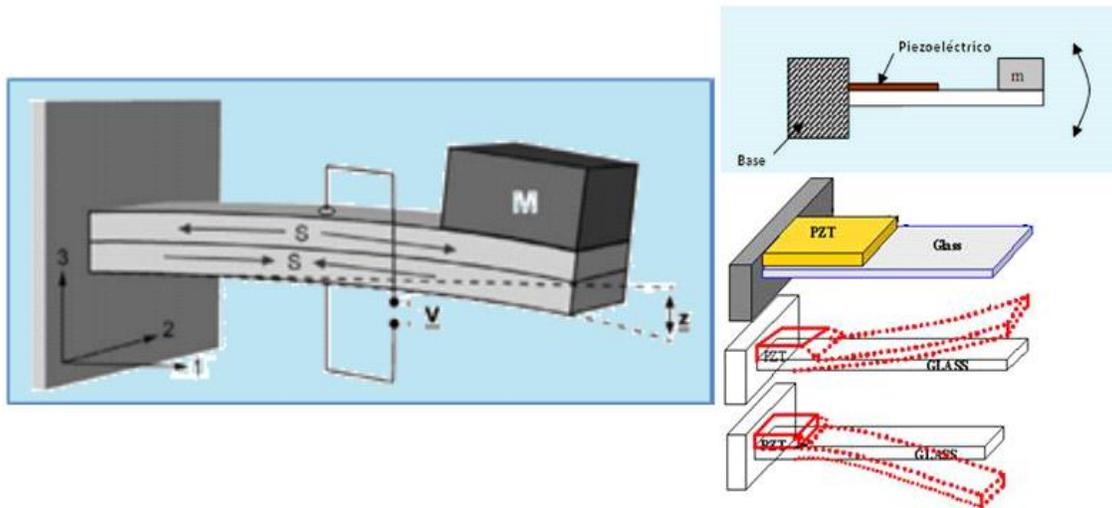


Figura 40. Piezoeléctrico Cantiléver.
 (a) Principio de funcionamiento de un generador piezoeléctrico con estructura de Cantiléver, fijo en un extremo y curvado en el otro, (b) Generador pie y (c) Fuente de energía mecánica.

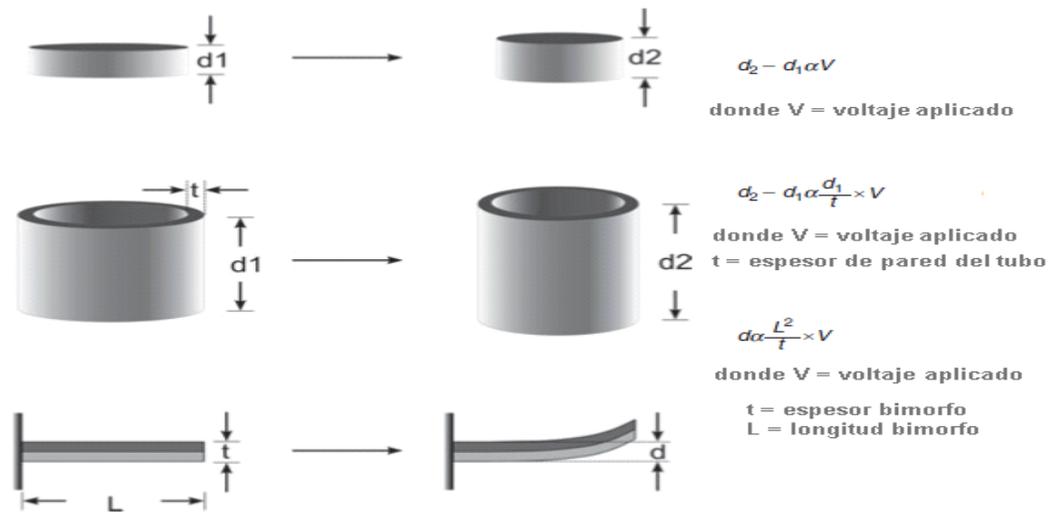


Figura 41. Geometrías típicas para piezoeléctricos usados en AFM (disco, tubo y bimorfo), sus movimientos y ecuaciones correspondientes.

Los materiales piezoeléctricos pueden ser fabricados en varias formas tales que tienen más o menos movimiento. En esta imagen se ilustra un disco que se hace más largo y más estrecho cuando se aplica un voltaje (los cambios geométricos de la cerámica piezoeléctrica geometría tal como el volumen es conservado durante la extensión. Otra configuración es en tubo, con electrodos en el interior y exterior (esta configuración ofrece una gran cantidad de movimientos y es muy rígido). La configuración bimorfo, construido a partir de losas delgadas de piezomaterial que están polarizadas en direcciones opuestas. Cuando se aplica un voltaje la cerámica se expande en una forma parabólica (Eaton & West, 2010).

A1.2. Transductores de Fuerza. Transductores de fuerza piezoeléctricos miden la fuerza aplicada directamente, suministrando una carga eléctrica proporcional a la deformación a la que están sometidos (Orcajo, Cabanas, & Melero, 1998). El sensor de fuerza en un AFM debe ser capaz de medir fuerzas muy bajas. Esto para que una punta muy afilada pueda ser utilizada, se requiere aplicar una fuerza baja de modo que la presión (fuerza/área) pueda ser lo suficientemente baja para que la sonda no se rompa (Eaton & West, 2010).

A1.3. Control Feedback (Control de Retroalimentación). El término feedback se utiliza para referirse a una situación en la que dos (o más) sistemas dinámicos están conectados entre sí de tal manera que cada sistema influye en la otra y sus dinámicas son por lo tanto fuertemente acopladas. En el que el primer sistema influye en el segundo y el segundo sistema influye en el primero, lo que lleva un argumento circular. Por sistema

dinámico, nos referimos a un sistema cuyo comportamiento cambia con el tiempo o inducida, a menudo en respuesta a la estimulación externa o forzada. Un AFM puede operar en modos distintos, la electrónica de retroalimentación toma una entrada desde el sensor de fuerza y compara la señal a un valor ajustado; la señal del control de retroalimentación. La salida del controlador de retroalimentación utilizado en AFMs se llama un controlador Proporcional-Integral-Derivado (PID). La ecuación que rige la forma en que esto funciona es la siguiente:

$$Z_v = P \times V_{err} + I \times \int Z_{err} dt + D \times \frac{dZ_{err}}{dt} \quad (12)$$

El controlador (PID) toma la señal de error y la procesa de la siguiente manera: Al seleccionar la P apropiada, I y D en términos de la ecuación 12, la punta trayecto la superficie, ya que se escanea, manteniendo Z_{err} mínima. El término integral facilita el movimiento de la punta sobre las características superficiales grandes y el P y términos D permite a la punta seguir, las características de alta frecuencia en una superficie más pequeña. Las dos señales del circuito de retroalimentación que normalmente se digitaliza para crear imágenes de AFM son señales de error, pero lo más importante, es que es utilizado por el operador del instrumento para optimizar la exploración de los parámetros, incluyendo, I y los valores de PD. Cuando los parámetros PID se optimizan, la imagen de la señal de error será mínimo (Eaton & West, 2010). En el modo tapping el cantiléver se encuentra vibrando y la amplitud de vibración es controlada por feedback. En el modo contacto el cantiléver está en contacto con la muestra y su curvatura está controlada por feedback. En ambos casos, el control es accionado por un elemento piezoeléctrico que controla la posición vertical de la base extensible. El sistema de control tiene una influencia directa en la calidad de imagen y velocidad de exploración. La punta se puede mover vertical y horizontalmente utilizando un escáner piezoeléctrico. La inclinación del cantiléver depende de la topografía de la superficie y la posición del cantiléver basado en que es controlado por el elemento piezoeléctrico. La inclinación se mide mediante la detección de la deflexión del haz de láser utilizando un fotodiodo. La señal del fotodiodo se amplifica y se envía a un controlador que acciona el amplificador para la deflexión vertical del voladizo. Mediante el control del elemento piezoeléctrico de manera que la deflexión del voladizo sea constante, la señal de conducción de la deflexión vertical del elemento piezoeléctrico es una medida de las fuerzas atómicas entre la punta en voladizo

y los átomos de la muestra. Una imagen de la superficie se obtiene escaneando el voladizo a lo largo de la muestra (figura 42) (Eaton & West, 2010).

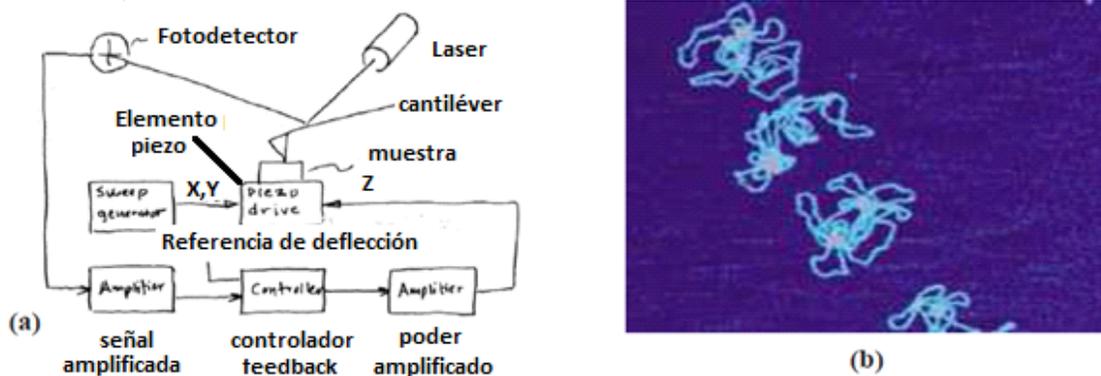


Figura 42. Un diagrama esquemático de un AFM.

(a) El que consiste en una unidad piezo que escanea la muestra bajo la punta del AFM, un láser se refleja sobre el cantiléver y se proyecta hacia un controlador de feedback para medir la detección. En (b) ADN caracterizado con AFM (Murray, 2008).

A2. Componentes del Microscopio de Fuerza Atómica.

En la actualidad se ha sometido cambios de ingeniería altamente sofisticada en cada uno de sus componentes. Los principales componentes de un AFM son la platina, la electrónica del control y un ordenador. En la platina del microscopio contiene el escáner (el mecanismo para mover la punta del AFM respecto a la muestra), un soporte de la muestra y sensor de fuerza, para mantener y controlar la muestra. La electrónica de control sirve como interfaz tanto a la platina del microscopio y la computadora, se encarga de generar las señales utilizadas para conducir el escáner y cualquier otro componente motorizado en la platina del microscopio. También digitalizan las señales precedentes del modo del AFM que se pueden visualizar y registrar por el ordenador. El software en el ordenar es utilizado por el operador para adquirir y visualizar las imágenes de la AFM. El usuario opera el programa de software, y los parámetros de adquisición pertinentes se pasa a la caja electrónica de control (figura 43).



Figura 43. Partes de AFM XE-Bio.

a) el XE-Bio Sistema SPM montada en un microscopio óptico invertido, c) el XE-Bio Control electrónico, d) una computadora y b) el monitor.

A2.1. Cantilever y Punta. El termino cantiléver incluye el chip de silicio, un cantilever que cuelga desde el chip, y una punta en él. En la figura 44 (a) y (c) se muestra una vista general y los nombres de las partes del voladizo utilizando en el SPM. El chip, voladizo, y la punta están hechos de silicón (Si) o nitruro de silicón (Si_3N_4), y se confecciona macro-mecanizado. Debido a que un cantilever tiene dimensiones muy pequeñas (10 μm de ancho, 100 μm de longitud, y varios espesores en μm o dimensiones como en la figura 44b) se dificulta al momento del proceso de unir al SPM. Para que sea más fácil de manipular, el SPM utiliza una cantidad relativamente grande de chips de tamaños de varios milímetros. El cantilever es la parte de detección de las propiedades de la superficie de la muestra por ejemplo: La distribución topográfica, la solidez física, propiedades eléctricas, magnéticas, químicas, propiedades elásticas, etc. mediante la detección del grado de deflexión debida a la interacción con la superficie de la muestra, es un componente muy importante que determina la resolución de la muestra. Cuando se ve desde la parte superior, las estructuras del cantilever se divide en dos partes: Los que tienen forma rectangular y aquellos con forma triangular. Cada diseño tiene una constante de fuerza diferente dependiendo de la anchura, la profundidad, el grosor y la composición del material. Entre ellos, el cantilever de silicón es más fuerte que la de silicio.

El cantilever (donde se localiza la punta) debe cumplir con propiedades específicas para lograr resolución atómica; debe cumplir con las siguientes propiedades:

- Elasticidad debe ser de material resistente pero flexible
- Cumplir con la ley de Hook. Establece que para cualquier deformación que implique un desplazamiento de magnitud Z , existe una fuerza de restitución dada por:

$$F_R = K\Delta Z \quad (13)$$

Donde la K es la constante de resorte de restitución, para un cantilever como el usado, está relacionado con su longitud, el módulo de Young E y su momento de inercia; por medio de:

$$K = \frac{3EI}{L^3} \quad (14)$$

Así, para una resolución atómica, las flexiones del cantilever serán de algunos Ångstroms, por lo que se puede determinar que K debe ser de entre 10^{-2} a 10^2 Newton/metro (Martínez, 2002).

Uno de los mayores problemas que se presentan cuando se modela la interacción electrostática en un AFM es tener en cuenta geometrías reales de la punta de prueba y la muestra ya que generalmente los modelos asumen geometrías simplificadas, el uso de puntas de la AFM con nanotubos de carbono para muestras biológicas proporciona una gran ventaja en término de obtener una mejor resolución (Ariel Gómez, 2009) ver figura 44 d y e.

El cantilever para modo NC-AFM tiene una frecuencia relativamente grande ya que el modo de NC-AFM utiliza el método de vibración del cantilever que permite medir el gradiente de la fuerza por el cambio de amplitud y de fase debido a la interacción entre la punta y la superficie de la muestra (figura 44 f).

El tamaño del punto y forma del haz de láser en el fotodiodo de división influyen en la sensibilidad esto se ilustra en la figura 45. Un cambio dado en el ángulo conduce a un cambio en la posición del punto por una distancia fotodetector sensitivo de posición PSPD (por sus siglas en inglés Position Sensitive Photo Detector). En algunos casos la interferencia puede causar una distorsión de las curvas de fuerza, que es visible con una

señal periódica en el régimen de NC-AFM. La luz reflejada desde la parte posterior del cantilever y la luz reflejada por la muestra interfiere y da una señal adicional en el PSPD. En particular para las muestras altamente reflectantes este efecto puede afectar gravemente a las curvas de fuerza. Esto puede ser evitado mediante el uso de luz de láser de menor coherencia. Diodos láser infrarrojos, por ejemplo son menos coherente que diodos que trabajan con la luz visible. A veces ayuda realinear el láser de modo que más luz sea reflejada desde el cantilever en lugar de la muestra (Butt, Cappella, & Kappl, 2005; D'Costa & Hoh, 1995; Jaschke, 1995).

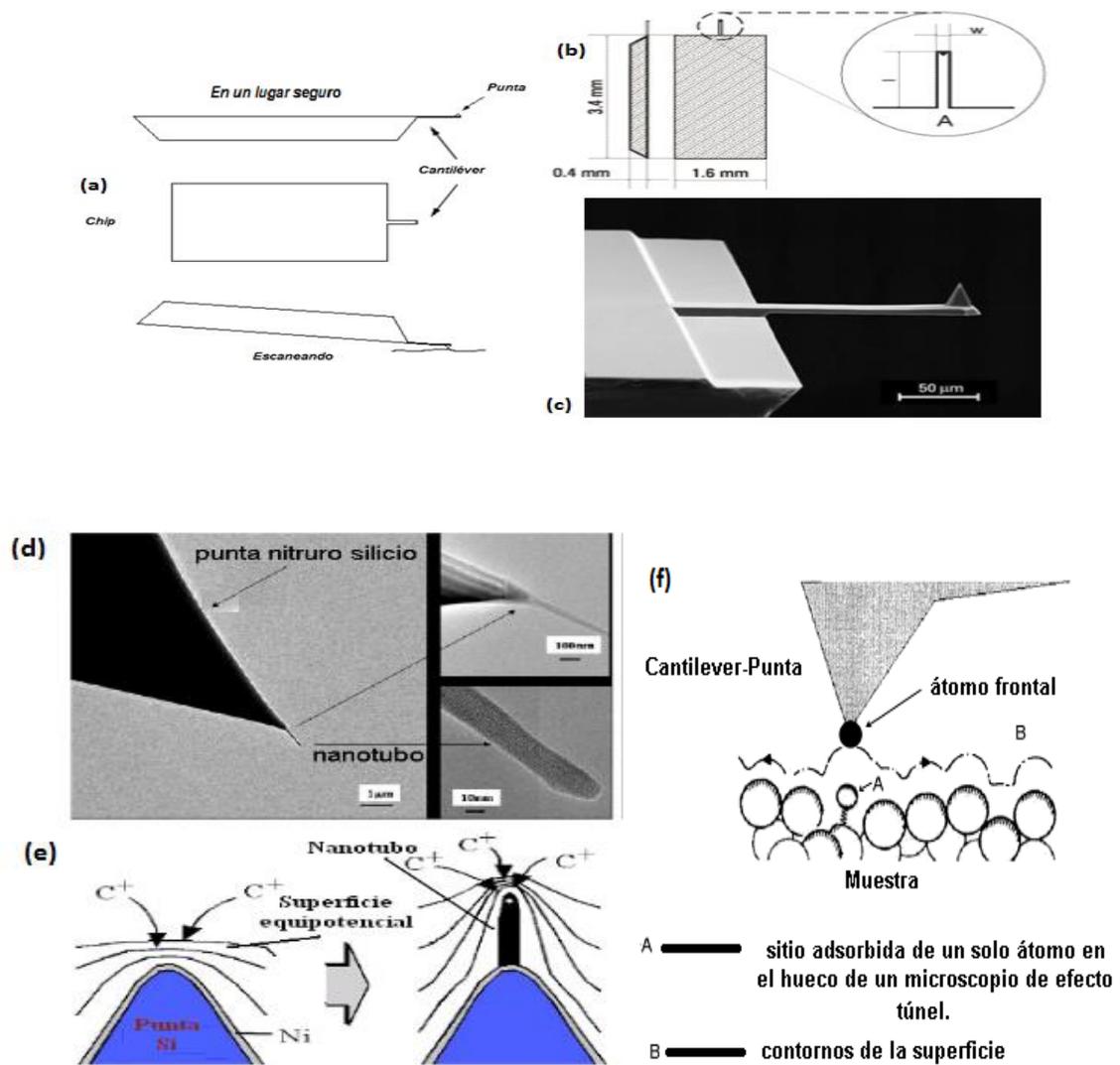


Figura 44. Chip, cantilever y punta.

(a) El chip, el cantilever y la punta son hechos de Silicón (Si) o nitruro de Silicón (Si_3N_4). (b) Dimensiones de un chip (c) Imagen de un cantilever de silicón. (d) Diagrama esquemático del mecanismo de campo eléctrico para el crecimiento de nanotubo en punta de silicio (Ono, Miyashita, & Esashi, 2002). Imagen TEM de un nanotubo unido a la punta de nitruro de silicio, obtenida de (Jie Tang et al., 2005). (f) Cantilever y punta en modo NC-AFM barriendo una superficie mediante la interacción átomo-átomo (Khulbe, Feng, & Matsuura, 2007).

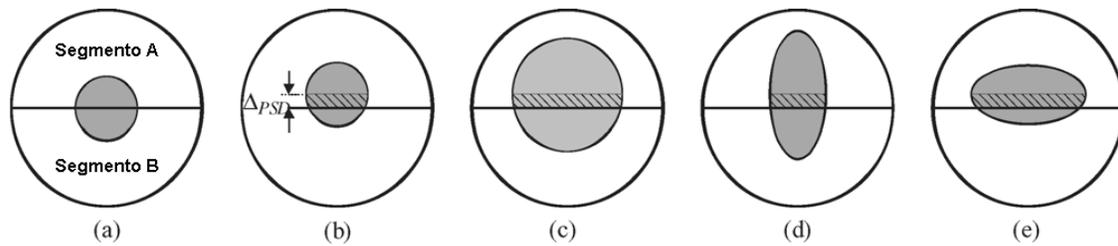


Figura 45. Fotodetector PSD.

Un cambio dado en el ángulo conduce a un cambio de posición del punto por una distancia PSPD. Para un pequeño punto simétrico, la rotación que conduce a un cambio significativo en la señal (b). Para un punto más grande es relacionado con la zona gris, es menor (C). También la forma de la mancha influye la sensibilidad. Si el punto se distorsiona la misma desviación puede producir (d) más pequeña a una sensibilidad inferior o superior, respectivamente. Uno debería incluso tener en cuenta que la forma del punto podría cambiar cuando las fuerzas altas cambian la forma del cantilever.

A2.2 Escáner Piezoeléctrico. El escáner piezoeléctrico es capaz de moverse en tres dimensiones con un nivel de precisión de Ångstrom. Cuando la superficie y la punta se encuentran muy cercanos, la interacción entre ellos causa deflexión en la punta ya sea hacia la superficie (por fuerzas atractivas), o si se aleja de la superficie (debido a fuerzas repulsivas). Esta deflexión de la punta es grabada como el cambio de posición de láser sobre el detector. El piezo responde a estos cambios por incremento o decremento de alturas sobre la muestra manteniendo una distancia constante entre la punta y la superficie. Las imágenes pueden ser recolectadas ya sea como la deflexión sobre el detector (imagen por deflexión), o distancias vertical del piezo (Imagen de altura).

La resolución vertical de imágenes de AFM es detectada por la interacción entre la punta y la superficie. La resolución lateral está determinada por el tamaño de la punta (Schwarz, Contescu, & Putyera, 2004). Los materiales piezoeléctricos son transductores electromecánicos que convierten el potencial eléctrico en movimiento mecánico.

Los materiales piezoeléctricos pueden ser cristalinos, amorfos o incluso poliméricos, aunque los materiales utilizados para AFM son generalmente materiales cerámicos sintéticos. Cuando se aplica un potencial a través de dos lados opuestos del dispositivo piezoeléctrico, cambia la geometría. La magnitud del cambio dimensional depende del material, la geometría del dispositivo, y la magnitud de la tensión aplicada (Callister, 2007).

Los piezoeléctricos de cerámica deben estar configurados de modo que puedan mover la punta en los ejes X, Y y Z. Hay configuraciones estándar que se utilizan en instrumentos de la AFM. La figura 46 muestra piezoeléctricos de cerámica en trípode, tubo y las flexuras. Cada uno de estos diseños puede estar configurado para movimientos que correspondan a su necesidad de uso. Algunas desventajas de escáner en tubo, debido a su geometría están sujetos a una gran cantidad de no linealidad (Eaton & West, 2010).

$$\Delta x = \Delta y \alpha \frac{L^2}{t} \times V \quad (15)$$

$$\Delta z = \alpha \frac{L}{t} \times V$$

Donde V es igual al voltaje aplicado al piezo y Δx , Δy y Δz son movimientos en X, Y y Z

$$\Delta x \alpha \frac{L_2}{L_1} \times V \quad (16)$$

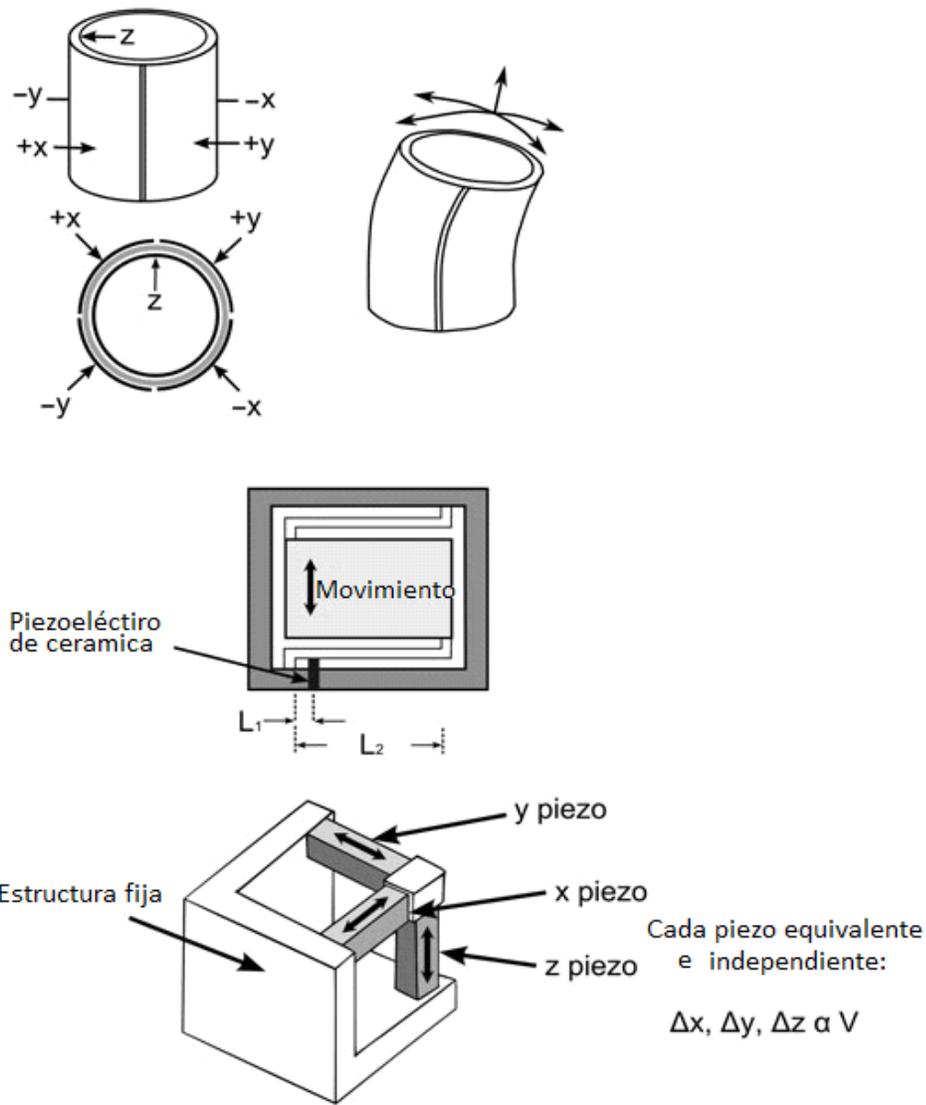


Figura 46. Configuración de un escáner común de AFM.

(Descripción de arriba hacia abajo) Un tubo de escáner está configurado para sus movimientos en los ejes X, Y y Z. Cuatro electrodos externos son usadas para los movimientos en los ejes X-Y, y los electrodos internos son usados para los movimientos sobre el eje Z. En medio: Un escáner flexionado operando por empuje sobre un ángulo con un piezoeléctrico el cual hace el estado de movimiento. Esto es un ganancia en el movimiento dado por la relación de $\frac{L_2}{L_1}$. Una flexión unidimensional es mostrada con mucha claridad, la flexión normal de escáneres son configurados para escanear en los ejes X-Y. En la parte baja: El escáner tridimensional simple, el escáner tripode.

A2. 3. Láser. Con el láser la luz coherente es generada por las transiciones de electrones iniciadas por un estímulo externo: de hecho “láser” es el acrónimo de amplificación de luz por emisión estimulada de radiación. Aunque hay varias variedades diferentes de láser, los principios de funcionamiento se explican utilizando el láser de rubí de estado sólido. Rubí es simplemente un monocristal (Zafiro) a la que se ha añadido en el orden de 0.05% de iones. Estos iones imparten al rubí su color rojo característicos; más importante, proporcionan estados electrónicos que son esenciales para que el láser funcione.

El láser de rubí en la forma de una varilla cuyos extremos son planos, paralelos y muy pulidos. Amortiguadores extremos son plateados de tal manera que uno está totalmente reflectante y la otra se transmite parcialmente. El rubí se ilumina con la luz de una lámpara del flash de xenón. Antes de esta exposición, prácticamente todos los iones están en sus estados fundamentales; es decir, los electrones llenan los niveles de energía más bajos, tal como se representa esquemáticamente en la figura 47.

Sin embargo, los fotones de longitud de onda de la lámpara de xenón excitan electrones de los iones en estados más altos. Estos electrones pueden decaer. Algunos caen de nuevo directamente: emisiones de fotones asociados no son parte del haz de láser. La emisión de fotones espontánea inicial por algunos de estos electrones es el estímulo que desencadena una avalancha de emisiones de los electrones restante en adelante y hacia atrás a lo largo de la longitud de la varilla, y aumenta su intensidad a medida que más emisiones son estimuladas. En última instancia, una alta intensidad, haz coherente y altamente colimado de luz láser de corta duración se transmite a través del extremo parcialmente plateado de la varilla. Este haz de luz roja monocromática tiene una longitud de onda de $0.6943 \mu\text{m}$ (Callister, 2007).

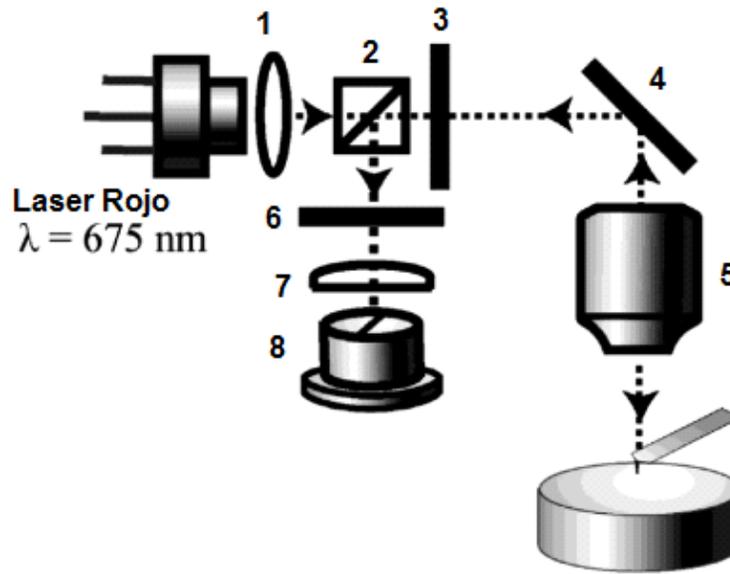


Figura 47. Esquematación de un sistema usado en un instrumento de AFM de alta velocidad. La baja polarización lineal del diodo del láser rojo (675 nm) es colimado por espejos colimadores (1), pasando a atravesando la polarización disidente (2), y polarizada circula por la placa a de onda. A continuación el láser entra el lente objetivo (5) después de ser reflejada por el espejo dicroico (4). El rayo de láser reflejado por el pequeño cantilever es guiado dentro del fotodetector dividido (8) atraviesa la palca a de onda (3), divisor de polarización (2) filtro banda de paso (6) y un plano esférico- lentes convexas (7) (Takeyasu, 2014).

A2.4. Fotodetector. Un fotodetector es un dispositivo capaz de convertir el flujo de fotones en una “magnitud medible”. De acuerdo a esta amplia definición, las películas fotográficas o las células de retina son ejemplos de fotodetectores. En el ámbito de los sistemas electrónicos, dicha “magnitud medible” consiste en una corriente o en una tensión. Dependiendo del mecanismo subyacente a su funcionamiento, se clasifican en dos grupos: a) Detectores térmicos y b) Detectores fotoeléctricos. De este últimos la absorción de fotones resulta en una transición de los electrones presentes en el material hacia niveles de energía superior, donde son susceptible de ser transportados por un campo eléctrica generando una corriente, un ejemplo de estos son los fotodiodos (Boquera, 2005). En la figura 48 y figura 49 se muestra el funcionamiento en un AFM. El fotodetector utilizado en la palanca óptica de AFMs por lo general se compone de cuatro segmentos (figura 49).

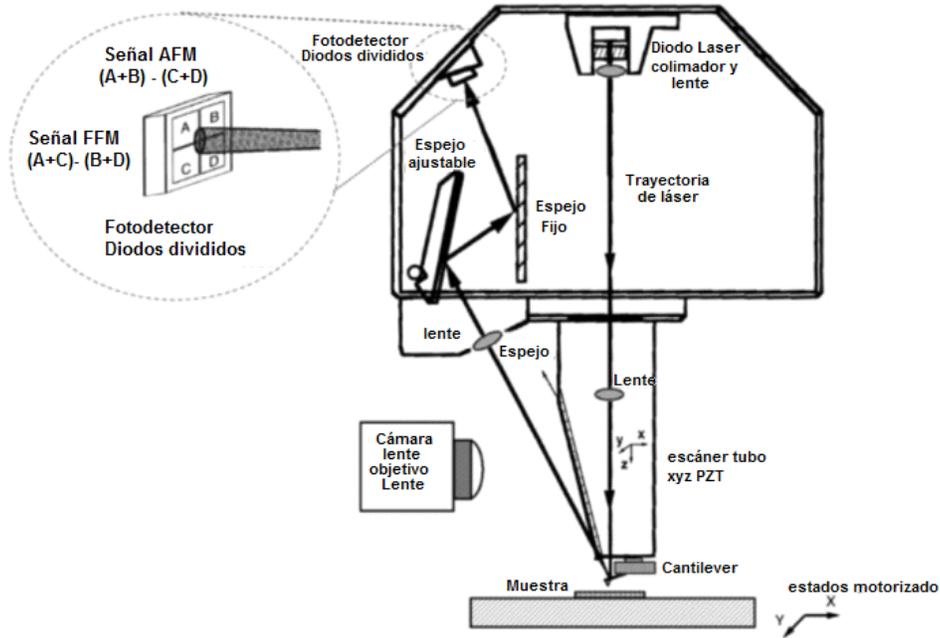


Figura 48. Esquematación de la señal al fotodetector en un AFM. La AFM se maneja con un sistema de espejos reflectores de láser y cantilever el cual dirigen la luz hacia el fotodetector dividido en 4 fotodiodos para tomar su señal y trasladarla en la imagen caracterizada (Bhushan, 2013).

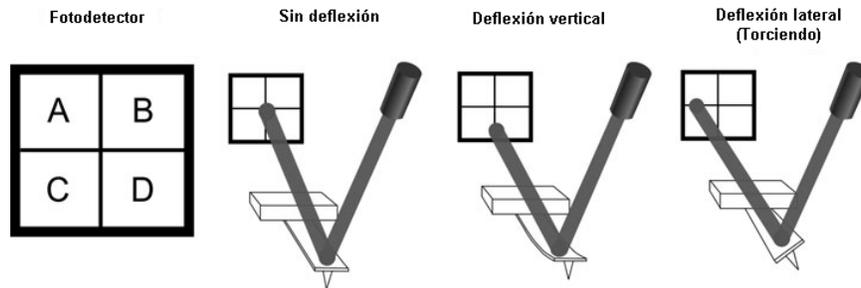


Figura 49. Detección de láser en los cuadrantes de un fotodetector de AFM. La diferencia de señal entre los dos primeros segmentos superiores y los dos inferiores, es decir $(A+B) - (C+D)$ proporciona la desviación vertical (mediciones en voltios o amperes), y la diferencia entre los dos segmentos de la derecha y los dos de la izquierda, es decir $(B+D)-(A+C)$ dan la deflexión lateral superficial (Corporation, 2011).

A3. Modos de Operación

La AFM trabaja con diferentes modos de operación para la caracterización de superficies, pero solo nos enfocaremos a tres de ellos en este trabajo (Contacto, NC-AFM y CI-AFM). En este trabajo solo hicimos uso del modo NC-AFM.

A3.1. Modo de Contacto. En el modo de contacto los de la punta en forma de cono o pirámide del cantilever, que tiene una pequeña constante de resorte de aproximadamente 0.01 N/m , realiza un primer contacto suave, la interacción entre átomos de la punta y la superficie de la muestra proporcionando una distancia entre ellos que cada vez se hace más corta, esto da un efecto de interacción repulsiva entre átomos debido a la repulsión electrostática, y cuando la distancia se hace relativamente más grande, las fuerzas interatómicas se convierte en fuerzas atractivas de las fuerzas de Van der Waals. Esta fuerza interatómica entre los átomos puede doblar o desviar el cantilever, y la cantidad de deflexión causará un cambio en el ángulo de reflexión del haz de láser que se rebotó en la superficie superior del cantilever. Este cambio de trayectoria del láser a su vez es detectado por el PSPD, permitiendo así al ordenador para generar un mapa de la topografía de la superficie. La punta del cantilever utilizada en este modo tiene un espesor de aproximadamente $1 \mu\text{m}$ para lograr una pequeña constante de resorte. Esto es porque un voladizo con una pequeña constante de resorte hace una desviación relativamente grande a una pequeña fuerza, y por lo tanto puede proporcionar una muy buena imagen de la estructura superficial. La AFM es capaz de detectar incluso la más mínima cantidad de deflexión medida por el cantilever. Por lo tanto, cuando el cantilever escanea un área convexa de una muestra, se desviará hacia arriba y cuando escanea un área cóncava, se desviará hacia abajo. Esta desviación del cantilever se utiliza como entrada de bucle de realimentación que se envía a un accionado (piezo Z). Con la finalidad de producir una imagen topográfica de la superficie, el piezo Z mantendrá la misma deflexión en el cantilever manteniendo una distancia constante entre la punta y la superficie. La cantidad que el piezo Z se mueve para mantener la deflexión de punto de referencia para realizar la topografía de la muestra; esta señal, trazada frente a la distancia, forma la imagen de altura o topografía en este modo. Hay una tercera señal que normalmente está disponible en el modo de contado de la AFM. Esto es típicamente utilizado debido a la sensibilidad de materia. El origen de las señales de deflexión vertical

y lateral en una palanca óptica común de la AFM se muestra en la figura 49 ya antes mencionada (Callister, 2007; Corporation, 2011; Eaton & West, 2010; Khulbe et al., 2007).

A3.2. Modo de No Contacto. Hay dos fuerzas principales, la fuerza de repulsión electroestática y fuerzas de atracción, existentes entre átomos a corta distancia de separación. Las fuerzas de repulsión eléctricos (FRE) entre núcleos de iones y las fuerzas estáticas elécticas atractivas (FRA) entre los electros de valencia y núcleos de iones. Cuando la distancia entre la punta del cantilever y los átomos de la muestra es relativamente grande, la FRE se vuelve dominante. Núcleos de iones se convierten en dipolos eléctricos debido a los electrones de valencia de los otros átomos, y la fuerza inducida por la interacción dipolo- dipolo es la fuerza de Van der Waals. En este modo las topografías de superficie están dadas mediante la utilización de estas fuerzas atómica atractiva en distancias relativamente grande entre la punta y la superficie de la muestra. Por otro lado, un cantilever para este modo tiene una mayor espesor de aproximadamente 4 μm , en comparación al modo de C-AFM. Tiene una constante de resorte de 40 N/m, que es muy “rígido”, y una frecuencia de resonancia relativamente alta, y mide el gradiente de fuerza por el cambio de amplitud y de fase por la interacción entre la punta y la muestra, lo que da la topografía de la muestra (ver figura 50 y figura 51).

A3.3. Modo Intermitente o Tapping. La técnica de contacto intermitente (CI-AFM) o “tapping mode” ha sido clave del avance en la AFM. En este modo el cantilever oscila sobre la muestra, con una variación de amplitud cercana a la frecuencia de resonancia natural, usando un actuador piezoeléctrico. La variación de amplitud de oscilación de la punta, debida a la amortiguación sobre la superficie es lo que se utiliza como señal y control. El sistema piezoeléctrico aplica una fuerza en la base del cantilever y provoca que la punta vibre con unas amplitudes que habitualmente oscilan en un rango de 20-100 nm cuando la punta no está en contacto con la superficie. La vibración de la punta se mueve sobre la muestras hasta que comienza a rozar su superficie de forma ligera. Durante el barrido de la muestra la punta toca ligeramente la superficie de forma intermitente y se levanta con frecuencias de alrededor de 50-500 Kciclos/s. Debido a la perdida de energía causada por el contacto intermitente de la punta sobre la superficie, los cambios en la amplitud de vibración van acorde con la superficie de la superficie topográfica de la muestra. Mediante el uso de un cantilever altamente rígido y

monitoreando los efectos dinámicos de la fuerza de atracción (es decir, el cambio en la oscilación) en este régimen, es posible mantener el cantilever muy cercana a la superficie sin salirse del régimen de repulsión. Es posible observar los cambios en la amplitud de oscilación y la fase en este régimen. Estos efectos son causados por un cambio en la frecuencia de resonancia en el voladizo que es a su vez causada por la fuerza de superficie (Normalmente fuerzas atractivas de Van der Waals) que actúan sobre la punta. La frecuencia de resonancia lejos de la superficie, $\omega_0 = c\sqrt{k}$ donde c es la función de la masa del cantilever, y k es la constante de resorte. Pero una fuerza adicional f de la superficie implica que la nueva frecuencia de resonancia ω'_0 esta dada por:

$$\omega'_0 = c\sqrt{k - f'} \quad (17)$$

Donde f' es la derivada de la fuerza normal a la superficie.

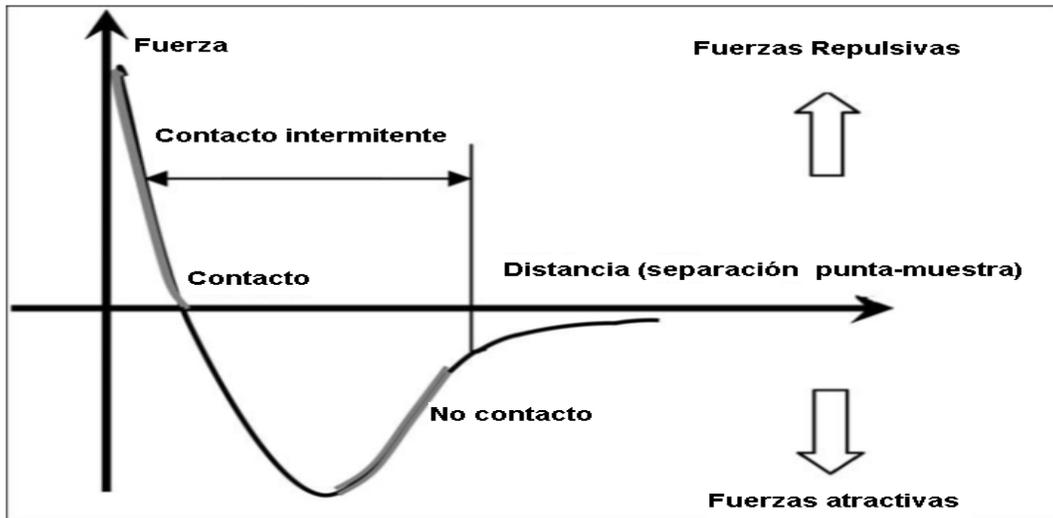


Figura 50. Curvas de fuerzas de desplazamiento.

Explica las fuerzas de interacción entre la punta y la superficie de la muestra en los tres modos de operación. Cuando la distancia entre los átomos (punta-muestra) es muy grande existe una fuerza de atracción muy débil. Conforme la distancia entre estos átomos va disminuyendo la fuerza de atracción va incrementando hasta que los átomos se encuentren tan cerca a las nubes de electrones comienza a repelerse entre sí electrostáticamente. Al llegar a este punto las fuerzas de atracción se van debilitando e incrementando la fuerza de repulsión conforme va disminuyendo la distancia atómica (punta-muestra). La fuerza de atracción es igual a cero cuando alcanza un par de Ångströms (Å) y se convierten totalmente repulsivas cuando los átomos estén en contacto (Nader & Karthik, 2004).

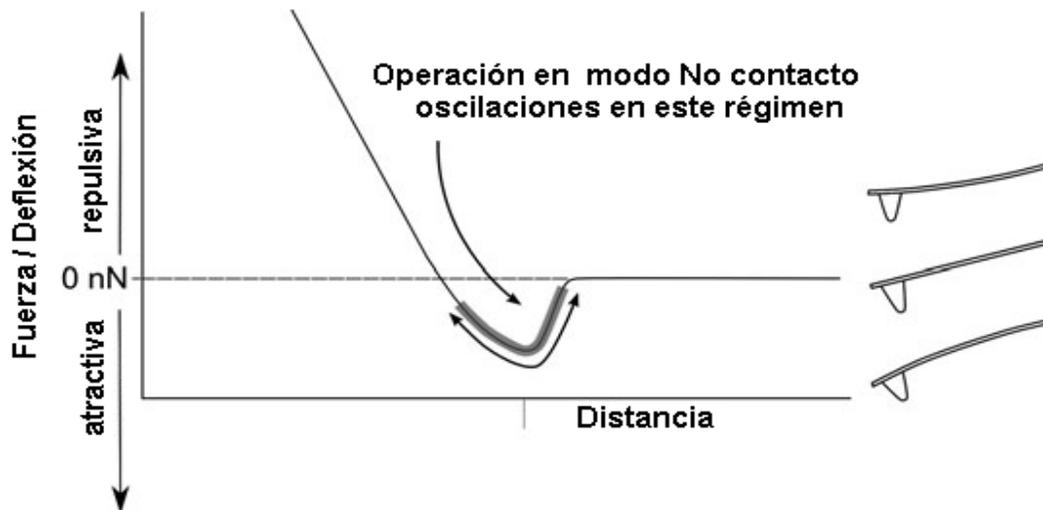


Figura 51. Operación en modo de NC-AFM. Se muestra el comportamiento de las fuerzas de atracción y repulsión de este modo desde el inicio hasta el barrido de la superficie a caracterizar.

A4. Ventajas y Desventajas de la Microscopía de Fuerza Atómica

Comparado con otras microscopías la AFM ha presentado pros y contras.

Herramientas como Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) o el Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) han sido comparadas con la AFM donde se han mostrado sus pros y contras (Eaton & West, 2010).

Ventajas que brinda la AFM sobre estos microscopios es la resolución, que es mejor que un SEM pero bastante similar a la del TEM. El procesamiento mínimo de la muestra en la AFM hace que sea mucho más fácil de operar ya que en SEM o TEM se requiere de un tratamiento previo de revestimiento para ser sometido al vacío. La sensibilidad alta de la AFM, por lo que mientras más pequeño, más sensible, logrando con esto la integración de la AFM con otras técnicas.

Desventajas en la AFM es que la grabación de imágenes es generalmente más lento que un SEM, por lo que requiere un gran número de funciones en una muestra. También pueden presentarse errores de medición o ruidos en las imágenes debido a factores mismos de la AFM. Algunos de estos son la punta, es importante establecer el tipo de punta que se utilizara en determinada muestra. El usuario debe de estar muy atento a las condiciones en las que se encuentra la punta para ver si es necesario un

cambio. Otro aspecto importante es la corrección del comportamiento no ideal de cerámicas piezoeléctricas. En general el Usuario debe conocer y estar pendiente de la forma y condiciones de uso de la AFM.

APÉNDICE B CONCEPTOS FÍSICOS Y QUÍMICOS

B1. Ley de Hook

Un objeto está conectado a un resorte cuya constante de resorte se puede cambiar junto con la posición del objeto. La figura 52 muestra la fuerza del resorte sobre el objeto, así como la posición del objeto y la velocidad como una función de tiempo. El signo negativo indica que la fuerza del resorte es una fuerza de recuperación, es decir, la fuerza siempre actúa en la dirección opuesta a la dirección en que el sistema se desplaza. Asumiendo que los valores positivos de x son los mismo que los valores positivos de la fuerza. El origen tiene que ser colocado en la posición donde el sistema de resorte estaría en equilibrio estático para la ecuación 16 para ser válida.

$$F_s = -Kx \quad (18)$$

Este es el lugar donde

$$F_s = -K(x - x_0) \quad (19)$$

Donde x_0 es la posición de equilibrio en relación con el origen (figura 52). Resortes se supone normalmente estar sin masa por lo que su inercia se puede despreciar. Esto también significa que las fuerzas ejercidas por ambos extremos del resorte sean igual pero en direcciones opuestas (Khulbe et al., 2007).

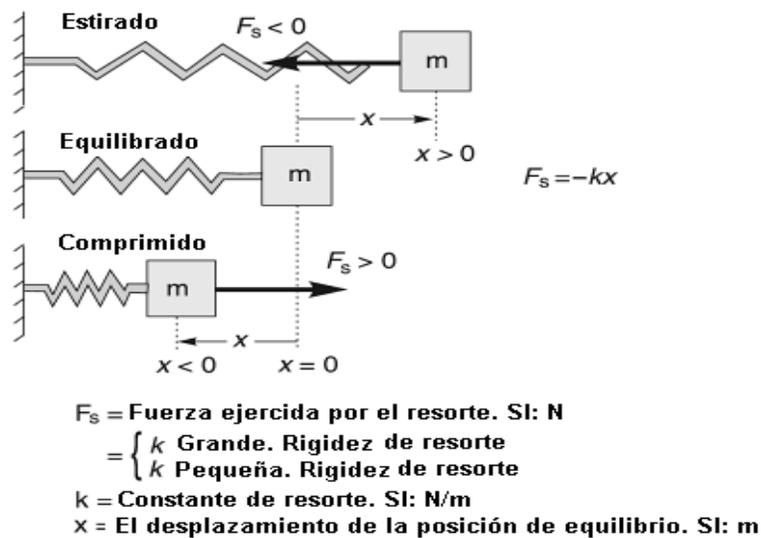


Figura 52. Ley de Hook.
Comportamiento de un resorte y sus ecuaciones durante tres facetas (estirado, en equilibrio y comprimido).

B2. Fuerzas de Van der Waals (vdW)

Las fuerzas atractivas o repulsivas de van der Waals entre entidades moleculares (o entre grupos dentro de la misma entidad molecular) además de las otras formaciones de enlaces o de la interacción electrostática de iones o grupos iónicos con alguna otra o con moléculas neutras. Estos términos incluyen: dipolos-dipolos, dipolo-dipolo inducido y fuerzas de London (dipolos instantáneos inducidos-dipolo inducido). El término es algunas veces usadas para las fuerzas totales atractivas no específicas o fuerzas repulsivas intramoleculares. La presencia de interacciones de largo alcance, tales como las fuerzas de van der Waals (vdW), conduce a un escenario de formación de imágenes muy diferentes en la que el radio de la punta macroscópica controla la resolución de imagen. El potencial de vdW entre dos moléculas, son el resultado de las interacciones dipolo inducido-dipolo inducido, que tienen una forma familiar. Un orden para calcular la fuerza de la punta esférica de radio R y una superficie plana, una podría usar una aproximación continua e integrar sobre el volumen de la punta y superficie. El resultado es que, para distancias pequeñas, el potencial es aproximadamente para:

$$W(D) = \frac{AR}{6D}, D \ll R, \quad (20)$$

Donde D es la separación entre la esfera y la superficie, y $A \equiv \pi^2 C p_1 p_2$ entonces es llamado la constante Hamaker, donde p_1 y p_2 son la distancia de los dos sólidos

La resolución de un AFM operado en modo de contacto se establece por el área de contacto entre la punta y la muestra. Las fuerzas de atractivas de vdW provocan una automática inestabilidad mecánica (snpas) de la punta al contacto con la muestra, principalmente para la deformación elástica y un área de contacto limitada.

Para la mejora en la resolución del AFM cuando operan las fuerzas atractivas de vdW, existen dos estrategias: Disminuir el radio R (se hace con la forma de la punta) o disminuyendo la constante Hamaker (reduciendo grandes rangos de fuerza). Los valores relativamente altos del índice de refracción para nitritos de silicón podrían conducir hacia una gran fuerza de vdW en cualquier medio líquido elegido (Hutter & Bechhoefer, 1993; Parsegian, 2005).

APÉNDICE C GLÓBULOS ESTRUCTURA Y MÁS

C1. Función

La sangre transporta oxígeno y nutrientes a las células vivas y se lleva sus productos de desecho. El 40% de la sangre está formada de GRs y plaquetas. Cada segundo, 2-3 millones de glóbulos rojos se producen en la médula ósea y liberados en la circulación, son el tipo más común de células que se encuentran en la sangre, con cada milímetro cúbico de sangre que contiene 4 a 6 millones de células. Los glóbulos rojos son los suficientemente pequeños para pasar a través de los vasos sanguíneos más pequeños. Circulan por todo el cuerpo para un máximo de 120 días, momento en el cual los glóbulos rojos viejos o dañados se retiran de la circulación mediante macrófagos en el bazo y el hígado (Dean, 2005).

C2. Morfología y Tamaño

La transición de reticulocitos a eritrocitos se acompaña de extensos cambios en la estructura y propiedades de la membrana plasmática. Estos cambios incluyen un aumento en la resistencia al cizallamiento, la pérdida de área superficial y la adquisición de una forma bicóncava (J. Liu, Guo, Mohandas, Chasis, & An, 2010). Un eritrocito normal tiene un diámetro promedio de $7.5 \mu\text{m}$ con una variación usual de 6.8 a $8.7 \mu\text{m}$ y un grosor de $2.2 \mu\text{m}$ en su borde y un espesor de $0.8 \mu\text{m}$ en su centro (figura 6) (Diez-Silva et al., 2010; Ross & Pawlina, 2007).

C3. Membrana

La membrana de los glóbulos rojos es una estructura, que comprende un citoesqueleto proteico lactina y una bicapa lipídica. Contiene dos grupos de proteínas muy importantes desde el punto de vista funcional. Las proteínas integrales que a su vez se agrupan en dos familias principales (glucoforinas, encargada de la adhesión celular a la red de proteínas del citoesqueleto y proteína de banda 3, el cual fija la hemoglobina y actúa como un sitio de anclaje adicional para las proteínas del citoesqueleto), los dominios extracelulares de estas expresan antígenos de grupo sanguíneo. Las proteínas periféricas de la membrana que se encuentran en la superficie de la membrana celular y se organiza en un red bidimensional de modelo hexagonal que forma una lámina sobre la superficie de la cara interna de la membrana. El mayor de los componentes del citoesqueleto de la membrana son α y β espectrina, predominantemente en la forma de tetrámeros, anquirina (interacciona con la proteína banda 4.2 y la proteína integral banda 3), actina en la forma de pequeñas proteínas banda 4.2 y p55. La capacidad de los glóbulos rojos normales para cambiar rápidamente su forma en respuesta a tensiones de cizallamiento de fluido se rige por la viscosidad citoplasmática, que está determinada por la concentración de hemoglobina intracelular (Bennett, 1989; Mohandas & Gallagher, 2008; Ross & Pawlina, 2007).

C4. Patologías

C4.1. Tamaño Patológico. Los términos micro, normo y macrocitos son los que describen las condiciones de tamaño de los eritrocitos y están ligadas a las condiciones química y fisiológicas. La macrocitos es el resultado de algún defecto de maduración nuclear (macroscitos verdadera) o estimulación de la eritropoyesis. La macroscitos verdadera representa un defecto en la maduración nuclear asociada con una deficiencia de vitamina B₁₂ o ácido fólico (anemia megaloblástica). La macroscitos por estimulación eritropoyetica, estimula la síntesis de hemoglobina en el desarrollo celular. La microscitos está asociada con descenso en la síntesis de hemoglobina. Este decremento puede ser producido por la deficiencia de hierro, daño en la síntesis de globulinas, o anormalidad mitocondrial afectando la síntesis del grupo hemo de la molécula de hemoglobina, síndrome de mala absorción y una variación del tipo de hemoglobina, las hemoglobinopatías. Un término que indica la presencia de células de diferentes tamaños (micro, macro y normocitos) es aniscitos. Las anemias es un síndrome, lo que significa que tiene múltiples causas. La anemia normocítica normocrómica con Volumen

Corpuscular Medio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Medio (HCM) y Concentración de Hemoglobina Corpuscular Medio (CHCM) puede presentar una población bidimensional de microcitos y macrocitos que originan un rango medio normal, por lo que es necesario realizar un extendido de la muestra, las causas puede ser hemólisis, hemorragias agudas, tumores malignos, esplenomegalia, agentes tóxicos, enfermedades crónicas, infecciones, artritis reumatoidea y enfermedades renales y hepáticas.

La anemia microcítica hipocrómica se manifiesta por el VCM y CHCM disminuidos, estas anemias por lo general son consecuencia de una anomalía en la síntesis de Hemoglobina (Hb) (ferropenia, deficiencia de la síntesis del Hemo “anemia sideroblástica”, deficiencia de la síntesis de globina “talasemia” y enfermedades crónicas), por un nivel de hierro insuficiente para mantener la eritropoyesis normal y se caracteriza por resultados anormales en los estudios de hierro. Las anemias macrocíticas normocrómicas el VCM, CHCM aumentan, esta pueden ser megaloblástica o no. Las anemias megaloblástica se caracterizan por falta de vitamina B₁₂ (anemia perniciosa) o de folato (alcoholismo, deficiencia nutricional), esta anemia presenta macrocitos ovalados o en forma de lágrimas o eritrocitos inmaduros grandes en medula ósea. La anemia no megaloblástica las formas celulares son redondeos o nucleados (presentes en pacientes hepatopatías crónicas, anemia hemolítica crónica con recuento elevado de reticulocitos, anemia mielodisplásica refractaria al tratamiento) (Villamor & Esteban, 1993).

La molécula de hemoglobina es un complejo proteico compuesto por un grupo hemo y dos cadenas proteicas de globinas muy similares. Hay seis tipos de hemoglobinas en los humanos que se modifican durante la evolución de feto a adulto. La hemoglobina fetal (HbF) es la que se presenta en mayor cantidad en el feto. Tiene mayor afinidad por el oxígeno que las formas del adulto por lo que mejora la eficiencia del transporte de oxígeno en el feto. La cantidad de HbF desciende progresivamente desde el nacimiento hasta los 6-12 meses de vida, para finalmente ser sustituida por la hemoglobina A ($\alpha_2\beta_2$) y la A2 ($\alpha_2\delta_2$) (Navarro, 2010).

C4.2. Morfología Patológica. La forma normal de un eritrocito maduro es redonda, apariencia bicóncava sobre un extendido de sangre periférica. La variación de muchas formas distintas de los eritrocitos se llama poiquilocitosis (Argente, 2005; Kelley, 1993; Turgeon, 2005).

C4.2.1. Esferocitos. Son células que pierden su forma bicóncava normal, usualmente mide menos de 6 μm y tiene un intenso color rojo pardo cuando se tiñe. Ocurre cuando la relación entre el área superficial y el volumen contenido celular de un eritrocito decrece debido a la pérdida de la membrana celular. Esta pérdida de la membrana celular crea una inestabilidad y desarrolla una deformabilidad del eritrocito formándose una célula esferocítica. Esto conduce a la prematura destrucción celular. La esferocitosis puede estar asociada por defecto de la membrana celular o por un traumatismo físico directo tal como el calor o agentes químicos. Los trastornos clínicos a los cuales está asociada son la anemia hemolítica, como una reacción por transfusión de sangre (en recién nacidos y en personas), anemia esferocítica congénita, coagulación intravascular diseminada (CID).

C4.2.2. Eliptocitos. Son generalmente más estrechos y más elegidos que los megalocitos. Estas células tienen forma de vara, puro, o salchicha. Estas células representan un defecto en la membrana por radicales libres y sufre una pérdida de la integridad. Está asociada a un desorden clínico incluyendo eliptocitosis hereditaria, anemias asociadas con daño de hemoglobina (Hb), anemias hemolíticas (ocasionalmente), anemia por deficiencia de hierro, anemia perniciosa, rasgos de células falciformes y talasemia.

C4.2.3. Codocitos (Células Diana). Son eritrocitos que parecieran un tiro al blanco. Son como un ojo de toro, un anillo rojo central está rodeado de un anillo claro seguido de otro anillo rojo exterior. Las células son más delgadas de lo normal, lo cual se puede relacionar a una relación excesiva de lípidos en la membrana celular. Disminuye el volumen intracelular en relación a la superficie de la membrana, como es en el caso de la talasemia, también es posible encontrar células más delgadas. En algunos casos, tal como hemoglobinas anormales, el defecto está relacionado con la distribución anormal de hemoglobina. En ciertos defectos enzimáticos, de colesterol y fosfatidilcolina la forma anormal interna del eritrocito es más pronunciada y se ve reflejada en su membrana. Clínicamente los codocitos son encontrados en las hemoglobinopatías anemias hemolíticas, daño hepáticos con o sin ictericia, y anemia por deficiencia de hierro.

C4.2.4. Equinocitos. Presentan espículas con proyecciones cortas que se ven en la superficie externa del hematíe. Pueden ser de tipo I o crenado, en donde las espículas adquieren disposición irregular en el campo, o de tipo II cuando se produce la pérdida de

ellas. Está mal formación puede deberse a la deficiencia de piruvato cinasa, uremia, por almacenamiento, contacto con vidrio o pH elevado, en muestras de atletas después de esfuerzo físicos agotadores y en pacientes con hipomagnesemia e hipofosfatimina. Debe de tenerse cuidado de no confundirse con los acantocitos.

APÉNDICE D FUNDAMENTOS METODOLÓGICOS UTILIZADOS

D1. Biometría Hemática (BH)

La biometría hemática es primordial para el diagnóstico y manejo de las enfermedades hematológicas. La BH también denominada citometría hemática o hemograma es un examen de laboratorio que examina las células que componen la sangre, ofrece información general de la sangre y sus componentes, puede demostrar alteraciones o enfermedades hematológicas o bien una alteración indirecta o reflejo de una enfermedad de algún otro órgano (Gaona, 2003).

D1.1. Hemoglobina (Hb). La hemoglobina es medida directamente como cianometahemoglobina (Manascero, 2000; Navarro, 2010).

D1.2. Hematocrito (Hto). Depende del número y tamaño de los glóbulos rojos, por lo tanto es el resultado de la relación directa entre número de glóbulos rojos y el VCM.

$$\text{Hto} = \frac{\text{Número de GRs} * \text{VCM}}{10} * \% \quad (21)$$

D1.3 Hemoglobina Corpuscular Media (HCM). La HCM es la cantidad de hemoglobina presente en cada eritrocito. El resultado se expresa en picogramos (pg = 10^{-12} gramos). El peso medio de la hemoglobina en la célula se obtiene dividiendo la hemoglobina entre el número de eritrocitos (Villamor & Esteban, 1993):

$$\text{HCM} = \frac{\text{Hb} \left(\frac{\text{g}}{\text{dl}} \right) \times 10}{\text{Eritrocitos} \left(\frac{\text{millones}}{\text{mm}^3} \right)} \quad (22)$$

D1.4 Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM). La concentración de hemoglobina corpuscular media expresa la proporción de cada eritrocito

que está ocupado por la hemoglobina. El resultado, por tanto, se expresa en porcentaje y el cálculo se realiza de la siguiente manera (Villamor & Esteban, 1993);

$$\text{CHCM} = \frac{\text{Hb}}{\text{Hematócrito}} \times 100 \quad (23)$$

D1.5 Volumen Corpuscular Medio (VCM). Por el método de impedancia electrónica se mide los glóbulos rojos (GR), que consiste en generar un campo electrónico alrededor de una abertura microscópica por las que pasan las células sanguíneas. Las células oponen una resistencia en el campo electrónico a medida que pasa por la abertura microscópica calibrada. Esta acción, a su vez, da lugar a un impulso electrónico, que se amplifica, se mide y se calcula matemáticamente para crear un valor numérico. El VCM es un promedio tomado de los datos de distribución de tamaño (Rodak, 2005). Se calcula directamente del histograma de GR completo (figura 53).

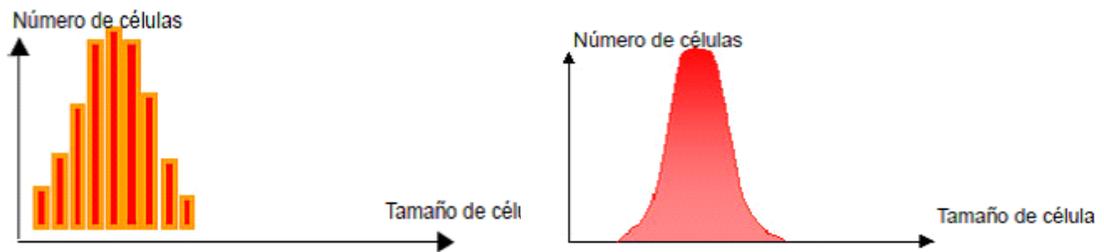


Figura 53. El histograma ERI. Se trata de un cálculo matemático y de distribución electrónica de los valores de ERI colocados en 256 canales cuyo tamaño volumétrico oscila entre 30fl y 300fl.

D1.6. Categorías para la Determinación y Clasificación de Anemias. La clasificación de anemia relaciona los valores cuantitativos de las concentraciones de Hb, VCM, Hto, HCM, CHCM, junto con el análisis del frotis de sangre periférica (FSP). Para evaluar nuestras muestras usamos el criterio de Manascero, con esto logramos clasificar el tipo e intensidad de anemia (tabla 4) (Manascero, 2000).

Tabla 5. Clásificación de la intensidad de anemias por valores hematológicos y FSP
Células poiquilocíticas y su relación con el VCM

Forma anormal	Normal	Ligera (+)	Moderada (++)	Marcada (+++)	Relación con el VCM
Esferócito	0	(1-5)	(6-15)	Mayor de 15	No afecta
Codocitos	1	(2-5)	(6-15)	Mayor de 16	Disminuye
Equinocitos	1	(2-5)	(6-15)	Mayor de 17	No afecta
Ovalocitos	1		(6-15)	Mayor de 18	Aumenta

Intensidad de Micro y Macroцитosis				
	Normal	Ligera (+)	Moderada (++)	Marcada (+++)
	(0-5)	(6-15)	(16-30)	Mayor de 30
Micro VCM (μm^3)	81-99	80-70	69-60	Menor de 60
Macro VCM (μm^3)	80-99	100-108	109-120	Mayor de 120

Hipocromía				
	Normal	Ligera (+)	Moderada (++)	Marcada (+++)
	(0-5)	(6-15)	(16-30)	Mayor de 30
HCM (pg)	(29-33)	(27-28.9)	(24-26.9)	Menor de 24

Poiquilocitosis				
	Normal	Ligera (+)	Moderada (++)	Marcada (+++)
	(0-5)	(6-15)	(16-30)	Mayor de 30

D2. Método de Grano Mediante Detección de “Cuencas” o “Watershed”

En AFM el método de grano se puede realizar análisis de grano en la imagen cargada en el programa XEI. El sistema detecta automáticamente los granos en la imagen, marcándolos con colores diferentes y números, calcula importantes parámetros del pérfil de superficie de cada grano detectado y los muestra en una tabla adyacente, también muestra la distribución de parámetros de superficie entre los granos detectados con histogramas. La transformación watershed es una herramienta poderosa para el propósito de segmentación de imagen ya que no es limitada por imágenes compuestas por distintas formas.

D2.1 La Implementación de Métodos para “Watershed”. Estas son tres: Transformación de acercamiento por distancia (Distance Transform Approach), Método de gradiente (Gradient method) y Marca controlada de aproximación (Marker Controlled Approach) (Amandeep Kaur, 2014a) .

D2.2 Ventajas. Como gradiente topológico ofrece un análisis global de la imagen, los contornos casi no deseados debido al ruido añadido a una imagen determinada puede reducirse significativamente, el problemas de sobre segmentación se puede atenuar y los resultados de segmentación se puede realizar utilizando el enfoque gradiente topológico. Otra ventaja es que se divide el proceso de segmentación en dos etapas separadas (detectando los principales bordes de la imagen procesada y luego calcular las Cuenca del gradiente detectado). Esta metodología tiene muchas ventajas, particularmente en aplicaciones de la vida real (Belaid & Mourou, 2011).

D2.3 Filtros. Para el ajuste de parámetros de la detección de granos de “Cuenca” se debe filtrar la imagen antes de correr la medición, ya que la rugosidad de la superficie y la sensibilidad de detección del método afectan en el número de granos detectados, y la filtración permite alisar la superficie analizada para un mejor reconocimiento de granos. El nivel de filtro se aplica para alisar la imagen antes de correr la detección de granos, eliminando granos creados por el ruido. Mientras mayor es el nivel de filtro más alisada será la superficie. Por lo tanto el nivel de filtro actúa para controlar la sensibilidad de la detección de grano.

Observando imágenes de la AFM podemos encontrar con gran facilidad los cambios de los bordes de alturas superficial de forma muy obvia sin embargo esta información no es correcta. Para esto se utiliza un filtro LoG (algoritmo de cuencas con Laplaciano de Gauss) para filtrar las imágenes. Al utilizar el método de cuencas está transformando sobre el gradiente de imagen por lo que obtendrá presentara ruido en la imagen y el gradiente conducirá a una sobre segmentación. El método para controlar una sobre segmentación se basa en un marcador. El marcador pertenece al componente unido a la misma imagen. Podemos dividir la imagen mediante un conjunto de marcadores internos (incluido dentro de cada objeto insertado) y externos (incluido en el ajuste).

Después de apoyarnos en el marcador interno y externo, podemos utilizarlos para modificar la imagen después de la filtración se aplica el método MMT (siglas en inglés Measurement & Management Technologies) el cual modifica las escalas de grises de la imagen, con esto se puede obtener un mejor efecto de segmentación evitando la sobre segmentación (Corporation, 2011; B. Liu & Du, 2014; P.P.Acharjya, 2013).