

# EFECTOS FÍSICOS INDUCIDOS EN CULTIVOS *IN VITRO* EXPUESTOS A CAMPOS ACÚSTICOS

## INDUCED EFFECTS *IN VITRO* CELL CULTURE EXPOSED TO ACOUSTIC FIELD

A. VARGAS<sup>a,b</sup>, I. C. NAVARRETE<sup>a,b</sup>, I. GONZÁLEZ<sup>c</sup> Y M. CAMACHO<sup>a,d†</sup>

a) Centro Internacional de Física (CIF), Laboratorio de Biofísica, Bogotá, Colombia.

b) Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Manuela Beltrán, Bogotá, Colombia.

c) Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Instituto de Tecnologías Físicas y de la Información, Madrid, España.

d) Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia; mmcachon@unal.edu.co<sup>†</sup>

† autor para la correspondencia

Recibido 5/7/2016; Aceptado 12/10/2016

El uso de ultrasonidos en aplicaciones médicas como cirugía ultrasonica, imágenes diagnósticas y en la actualidad, aplicaciones de manipulación y separación celular, han fomentado el estudio de los efectos físicos y biológicos asociados con la exposición de poblaciones celulares a campos acústicos. El interés por determinar estos efectos radica en el hecho de que este conocimiento permite optimizar el uso de ultrasonidos e identificar nuevas aplicaciones. Entonces, para mejorar su aplicación en cultivos *in vitro*, a continuación se describen los efectos generados sobre células sometidas a un tratamiento ultrasónico.

The uses of ultrasounds in medical applications like ultrasonic surgery, diagnosis, and nowadays in cellular separations and manipulations, has foment the study about physical and biological effects, related to exposure of cells at an acoustic field. The interest in determining these effects could help to optimize the ultrasound uses, and identify new applications. In order to improve the uses in applications where *in vitro* cell cultures are used, this manuscript review the effects generated in cells when are exposed to ultrasonic fields.

PACS: Biological effects of acoustic and ultrasonic energy, 87.50.Y; Sound waves, 47.35.Rs; Cell processes, 87.17.-d

### I. INTRODUCCIÓN

Con los avances recientes en nanotecnología y microfabricación durante los últimos años se ha revivido el interés por el desarrollo de nuevos métodos de medición de elasticidad celular, en los que se aprovecha la formación de campos acústicos estacionarios al interior de un microcanal lo que permite, sin contacto directo sobre células en suspensión, medir su compresibilidad o módulo de elasticidad volumétrico [1–3]. Además, del desarrollo en la medición de propiedades físicas, estos avances han mejorado técnicas de separación y manipulación celular, basadas en dispositivos que trabajan con fluidos a escala micrométrica o microfluidos, ofreciendo una oportunidad de explotar variedad de principios y respuestas que se presentan a estas escalas y que son diferentes a los observados a escala macroscópica [4]. Por ejemplo, el comportamiento laminar del flujo en el cual predominan fuerzas de carácter viscoso lo que conlleva alta capacidad de control en dispositivos microfluídicos [5].

Debido a las características de los flujos a escala micrométrica es posible clasificar las tecnologías basadas en la manipulación de células con microfluidos en dos grupos: (i) sistemas pasivos donde la manipulación se logra con la ayuda de fuerzas inerciales, filtros y mecanismos de adhesión o (ii) sistemas activos en los que se usa un campo de fuerza externo, como el gravitacional, magnético, eléctrico o acústico, para manipular la muestra [4].

En particular, las herramientas en microfabricación han

ayudado en la evolución de sistemas activos basados en las técnicas de separación Field Flow Fractionation (FFF) o de Campo-Flujo, al disminuir las dimensiones en los dispositivos de separación hasta escala micrométrica [6, 7]. Las FFF, propuestas por Giddings durante la década de los 60 [8] y desarrolladas durante los años 80 y 90 [9], emplean canales rectangulares delgados de tipo Hele-Shaw por los cuales fluye axialmente una muestra suspendida en un líquido vector, cuyos elementos constitutivos pueden ser separados por la acción de diferentes tipos de campos de fuerza [10].

Actualmente, junto con la miniaturización de los dispositivos en las FFF, se ha generado un interés creciente por acoplar a los microcanales de separación campos acústicos ultrasónicos, lo cual ha permitido la separación de partículas [11, 12], y el enriquecimiento de poblaciones celulares presentes en diferentes mezclas [13, 14].

El creciente interés por campos acústicos ultrasónicos en microdispositivos se debe, a que, en presencia de este campo las células experimentan fuerzas de carácter mecánico asociadas con su densidad, volumen y compresibilidad, lo cual hace atractivo su uso, porque a diferencia del método de ensamble magnético en el que se etiquetan las células con sondas magnéticas, o la dielectroforesis donde normalmente se emplea un medio conductor, que puede afectar crecimiento y fisiología celular [15, 16], en este caso no es necesario marcaje ni medio particular para lograr separar o manipular las células.

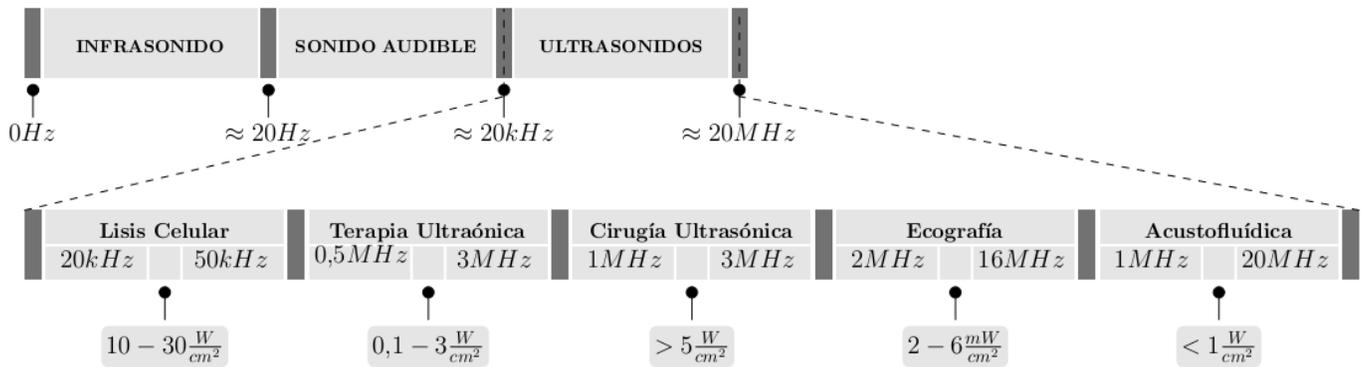


Figura 1. Escala de frecuencia y potencias para ultrasonidos usados en diferentes aplicaciones.

Además, este tipo de campos permite controlar células para investigar interacciones célula-célula, y célula-ambiente [16,17]. Más aún, en estas aplicaciones se emplean frecuencias del orden de los ultrasonidos, rango en el cual el impacto en viabilidad, función y expresión génica celulares se presume bajo para intensidades  $< 1 \text{ W/cm}^2$ , que están en el orden de las usadas comúnmente en diagnóstico por imágenes ultrasónicas [18,19].

Aunque se afirma que la exposición de células a campos acústicos no causa daño considerable en las poblaciones celulares, se han realizado estudios *in vitro*, en los que se han establecido efectos generados en diferentes poblaciones expuestas a éstos.

Por ejemplo, Bocchi y colaboradores evaluaron el impacto en morfología y conectividad de células del sistema nervioso central (neuronas y microglia), observando que la complejidad de la red neuronal aumentaba después de su exposición a ultrasonidos [20]. Por otro lado, Hultstrom *et al.* midieron la tasa de proliferación de células adherentes como función del tiempo de exposición, determinando para células COS7 sometidas a ultrasonidos de amplitud igual a 0,85 MPa y con frecuencia de 3 MHz, que su tiempo de duplicación celular se mantenía entre 24 h a 48 h, comparado con células control [21].

También, se ha encontrado que el campo acústico genera cambios en el potencial de membrana en cultivos de la línea K562 de leucemia mieloide crónica expuestos a ultrasonidos de diferente intensidad con una frecuencia de 1,1 MHz [22]. Por último, Radel *et al.*, evaluaron levaduras en suspensión expuestas a ondas ultrasónicas estacionarias de 2 MHz como una función del tiempo de exposición, encontrando que su viabilidad disminuía significativamente por la presencia de etanol en el medio [23].

Adicionalmente a estos estudios que muestran el impacto de campos acústicos, del rango de los ultrasonidos, en células mamíferas o levaduras, también se han realizado investigaciones en células de plantas, en particular, Bohm y colaboradores encontraron que al incrementar la densidad de energía de  $0 \text{ J/m}^3$  a  $70 \text{ J/m}^3$  y el tiempo de exposición a un campo acústico estacionario de 2,42 MHz, la viabilidad de un cultivo de *Petunia hybridase* reducía 35 % [24].

Por otro lado, el uso de ultrasonidos en biorreactores ha evidenciado que la exposición de células a un campo acústico puede incrementar la productividad en un proceso biológico [25], por ejemplo, Schlafer *et al.*, reportaron que la producción de etanol por *S. cerevisiae* aumenta a más del doble cuando las células son expuestas intermitentemente a ultrasonidos con frecuencia de 25 KHz y potencia de entrada de  $300 \text{ W/m}^3$ , efecto que se anula por la exposición continua de las células al campo [26].

Estos trabajos evidencian los efectos que tiene un campo acústico ultrasónico, particularmente, cuando éste es usado en aplicaciones de separación [14,19], manipulación celular [16,17,27], desarrollo de biorreactores [25,28] o construcción de biofiltros de bacterias y levaduras [29,30], que han permitido establecer para ciertas poblaciones celulares la relación entre su viabilidad y parámetros como intensidad, frecuencia, tiempo de exposición y tipo de onda.

Entonces, con el objetivo de definir los efectos físicos que genera un campo acústico, en el rango de los ultrasonidos en una suspensión de células, a continuación se describen éstos asociados con la frecuencia, el tipo de onda y la fuerza de radiación acústica. Posteriormente, se exponen resultados experimentales relacionados con la medición de viabilidad celular en cultivos *in vitro* de diferentes líneas celulares expuestas a estos campos y por último, se asocian estos cambios en viabilidad con efectos generados a nivel molecular y estructural.

## II. EFECTO DE LA FRECUENCIA Y ENERGÍA

Las ondas sonoras se clasifican según su frecuencia en infrasonidos, con frecuencias entre 0 Hz y 20 Hz, sonidos audibles, para rangos de 16 Hz hasta 20 kHz y ultrasonidos, que son ondas sonoras con frecuencias mayores a 20 kHz [33]. Durante muchos años las ondas sonoras en el rango de los ultrasonidos han sido ampliamente usadas en diferentes aplicaciones médicas e industriales tales como: limpieza de superficies [34], cirugía ultrasónica e imágenes diagnósticas [35] y recientemente en el desarrollo de técnicas de separación o manipulación celular en dispositivos microfluídicos, conocidas con el término de acustoflúidica [36].

La frecuencia y potencia usadas en cada una de éstas, figura 1, depende del efecto físico que se desee generar o aprovechar. Por ejemplo, en el caso de lisis celular y cirugía ultrasónica el efecto de cavitación, el cual ocurre con mayor regularidad al emplear frecuencias  $< 1 \text{ MHz}$  [18], es deseable, ya que permite, en la lisis, romper la membrana celular y, en cirugía, destruir cálculos o inducir necrosis en terapias contra cáncer sin dañar tejidos cercanos [18].

Sin embargo, en aplicaciones como imágenes diagnósticas y manipulación celular, la cavitación es un efecto no deseado, puesto que en estos casos se busca, después de exponer la muestra a ultrasonidos, mantener la viabilidad del tejido o células expuestas, que es afectada por la formación y colapso de burbujas. Estos fenómenos causan incrementos considerables en la temperatura del fluido,  $> 4000 \text{ }^\circ\text{C}$ , y, además, generan cambios en la presión del líquido, los cuales puede alcanzar hasta  $1000 \text{ atm}$ , afectando la integridad celular debido a que ocurren extremadamente rápido. Por ejemplo, la temperatura en las cercanías de una burbuja en formación o en colapso tiene un aumento mayor a  $110 \text{ }^\circ\text{C/s}$  [25].

Otro efecto físico asociado con la frecuencia y potencia de la onda es el calentamiento generado cuando el ultrasonido es absorbido por el material del dispositivo acústico, lo que disipa la energía mecánica de la onda y la convierte en calor [18].

Es importante resaltar que esta disipación de energía, depende de: (i) El tipo de material con el cual está construido el dispositivo que para los resonadores empleados en manipulación celular son de baja pérdida tales como silicio, vidrio y acero, (ii) Las características físicas del fluido usado, como su viscosidad, en donde por lo general, los medios empleados en suspensiones celulares están hechos a base de agua y (iii) La frecuencia, que genera poca absorción de energía entre  $1 - 10 \text{ MHz}$  [18].

Los efectos biológicos, inducidos por calentamiento de la muestra pueden variar dependiendo del tipo celular, la tasa de calentamiento y el tiempo de exposición. Además, temperaturas letales para un organismo pueden ser tolerables para células en cultivo *in vitro* [18].

Por último se debe resaltar que el aumento o disminución de la temperatura en un cultivo *in vitro* puede generar efectos en las células que llevan a respuestas a nivel molecular. Esta situación se evidencia, al disminuir la temperatura, en el estancamiento de la tasa de crecimiento generado por la detención del ciclo celular y, al aumentar la temperatura, por la expresión de proteínas de choque térmico y la denaturación y agregación de proteínas [18].

### III. EFECTO DE LA FRECUENCIA Y LA ENERGÍA

Para definir los efectos generados por el tipo de onda sobre una suspensión de células cuando se exponen a un campo acústico en el rango de los ultrasonidos es necesario recordar que un movimiento oscilatorio de pequeña amplitud en un fluido compresible es denominado onda sonora. Cuando

estas ondas se propagan en un fluido se produce en todos sus puntos compresiones y rarefacciones [31], que están asociadas con diferencias en la presión del líquido, formando lo que se conoce como un campo escalar de presiones o campo acústico. Dependiendo si la onda sonora que se propaga en el fluido es viajera, onda que se mueve libremente en el espacio, o estacionaria, el campo acústico tiene forma diferente, figura 2.

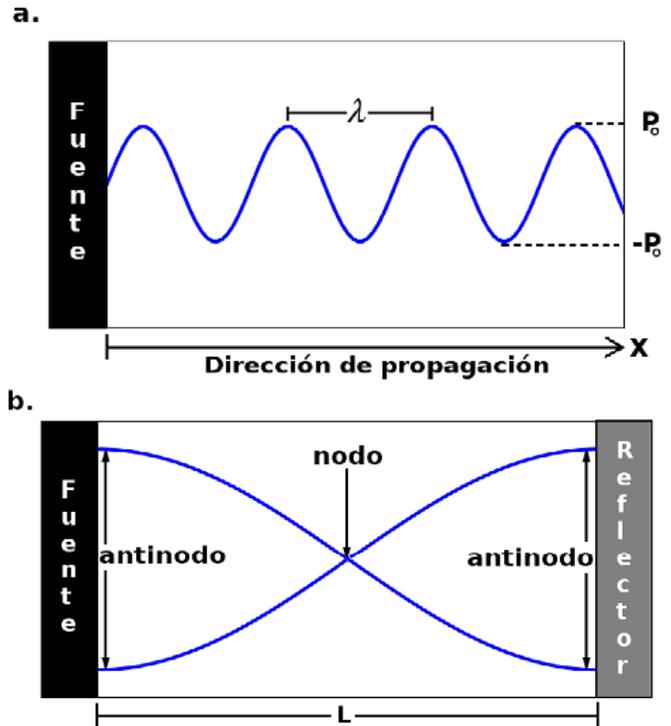


Figura 2. Campo de presión de ondas sonoras estacionarias y viajeras. a. Campo acústico de una onda viajera que se propaga en dirección  $x$ . b. Campo acústico de una onda estacionaria confinada en una región de longitud  $L$ .

En el caso de una onda sonora viajera propagándose en dirección  $x$  positiva, figura 2a, el campo de presiones está dado por la función [31]

$$p(x; t) = p_0 \sin(kx - \omega t), \quad (1)$$

donde  $p_0$  es la amplitud máxima de presión la cual es constante para una onda que se propaga sin pérdida de energía, figura 2a,  $k$  es el número de onda, el cual se relaciona con la longitud de onda  $\lambda$  mediante la ecuación  $k = 2\pi/\lambda$  y  $\omega$  es la frecuencia angular. Por otro lado, en el caso de ondas sonoras estacionarias, las cuales se emplean comúnmente en procesos de separación y manipulación celular, el campo de presión está dado por la ecuación [31]

$$p(x; t) = [p_0 \cos kx] \cos \omega t, \quad (2)$$

en donde el término entre corchetes corresponde a la amplitud de presión de la onda estacionaria, que en este caso depende de la posición  $x$ . Debido a esta dependencia espacial de la amplitud se establece en la región de confinamiento  $L$  de la onda, figura 2b, zonas de amplitud de presión cero, nodos, y zonas de amplitud de presión máxima, antinodos. La cantidad de nodos y antinodos generados depende de la

frecuencia natural o de resonancia elegida, la cual está dada por la relación

$$f_n = \frac{nv}{2L}, \quad (3)$$

donde  $n = 1, 2, 3, \dots$  y  $v$  es la velocidad de propagación de la onda en el medio. En la figura 2b se presenta el patrón obtenido para el caso de  $n = 1$ . El hecho de que las ondas sonoras estacionarias tengan una amplitud de presión variable, mientras que las ondas viajeras no, implica que células expuestas a estos dos tipos de onda pueden responder de manera diferente. En una onda estacionaria ultrasónica, las células migran hacia posiciones en las que experimentan poca presión y estrés mecánico. En cambio, células expuestas a un campo de onda viajera, permanecerán uniformemente distribuidas en el fluido experimentando mayor presión [25].

Estos efectos han sido evidenciados mediante estudios de viabilidad celular, en los cuales se concluye que las ondas estacionarias son menos deletéreas para las células que las ondas viajeras [23], sugiriendo su uso en aplicaciones relacionadas con manipulación de muestras frágiles, como células animales, o incluso en el desarrollo de métodos que permiten concentrar y recolectar biomoléculas tales como ácidos nucleicos y proteínas [32].

#### IV. EFECTO DE LA FUERZA ACÚSTICA

Al exponer una suspensión de células a una onda estacionaria ultrasónica al interior de un dispositivo microfluídico, las células experimentan dos fuerzas de carácter mecánico asociadas con el campo de presión generado al interior del dispositivo. La primera es una fuerza conocida como fuerza primaria de radiación acústica ( $F_{prm}$ ) y la segunda es llamada fuerza de radiación acústica secundaria o fuerza de Bjerkness ( $F_{sec}$ ), figura 3c y 3d.

La fuerza primaria de radiación acústica es una fuerza hidrodinámica de primer orden, generada por la interacción no lineal entre la onda incidente y la onda de dispersión producida por cada célula en suspensión. Esta fuerza tiene dos componentes, una componente axial en la dirección de propagación de la onda acústica y una componente lateral que actúa en la dirección de los planos nodales o antinodales, en los cuales la componente axial es cero, figura 3a.

La componente axial de la fuerza primaria de radiación acústica, figura 3a, está dada por la expresión [37]

$$F_{prm_x} = \frac{\pi p_0^2 V_c \beta_m}{2\lambda} \phi(\beta, \rho) \sin kx. \quad (4)$$

Donde  $p_0$  es la amplitud máxima de presión,  $V_c$  es el volumen de la célula,  $\beta_m$  es la compresibilidad del medio y  $\phi$  un parámetro adimensional conocido como factor de contraste acústico, el cual está dado por la relación

$$\phi(\beta, \rho) = \frac{5\rho_c - 2\rho_m}{2\rho_c + \rho_m} - \frac{\beta_c}{\beta_m}. \quad (5)$$

Siendo  $\beta_c$  la compresibilidad de la célula y  $\rho_c$ ,  $\rho_m$  las densidades de la célula y el fluido respectivamente. Como

se observa en la ecuación 5 el factor de contraste acústico está definido a partir de la relación entre densidades y compresibilidades de células y fluido, por tal razón, es importante resaltar que su valor puede ser positivo o negativo, dependiendo de la densidad y compresibilidad asociados con las poblaciones celulares. Esto permite establecer la dirección de la componente axial de  $F_{prm}$  que puede ser hacia los nodos si  $\phi > 0$ , células blancas figura 3c, o hacia los antinodos si  $\phi < 0$ , células rosadas figura 3c, [38]. Además se debe notar en la ecuación 4, que la componente  $F_{prm_x}$  es estable en el tiempo y proporcional al volumen de la célula y la frecuencia.

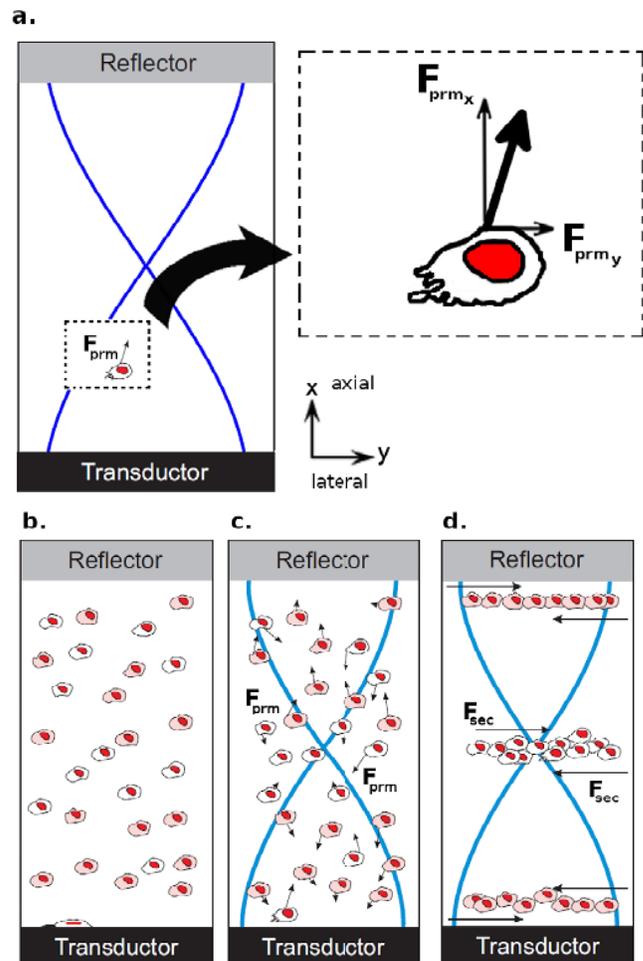


Figura 3. Efecto generado sobre una suspensión de células por la acción de una onda sonora estacionaria en el rango de los ultrasonidos. a. Componentes axial y lateral de la fuerza primaria de radiación acústica ( $F_{prm}$ ). b. Células sin exposición al campo acústico. c. Acción de la fuerza primaria de radiación acústica sobre una suspensión de células. d. Acción de la componente lateral de la fuerza primaria y de las fuerzas de Bjerkness ( $F_{sec}$ ).

Por otro lado, la componente lateral de la fuerza primaria de radiación acústica  $F_{prm_y}$ , se ha estimado que es dos órdenes de magnitud más pequeña que la componente axial y también depende de las características físicas de células y medio [39]. Esta componente, junto con la fuerza de radiación acústica secundaria, es responsable de iniciar y mantener la formación de agregados en los planos nodales o antinodales de la onda, figura 3d [40].

Por último, las fuerzas de Bjerkness están dadas entre células y se generan por interacción de las ondas dispersadas por cada célula cuando una población en suspensión es expuesta a un campo de onda estacionaria [40]. Esta fuerza, al igual que  $F_{prm}$ , depende de propiedades físicas de células y fluido y es dada, cuando la longitud de onda  $\lambda$  es más grande que el radio  $r$  de la célula y que la distancia  $d$  entre las células, por la relación [40]

$$F_{sec}(x) = 4\pi r^6 \left[ \frac{(\rho_p - \rho_m)^2 (3 \cos^2 \theta - 1)}{6 \rho_m d^4} v^2(x) - \frac{\omega^2 \rho_m (\beta_p - \beta_m)^2}{9 d^2} p^2(x) \right]. \quad (6)$$

Donde  $\theta$  es el ángulo entre la línea que une los centros de dos células y la dirección de propagación de la onda incidente,  $v(x)$  la velocidad de las células y  $p(x)$  la amplitud de presión de la onda acústica.

A diferencia de la fuerza primaria de radiación acústica,  $F_{sec}$  es proporcional al radio de la célula elevado a una potencia 6 e inversamente proporcional a la distancia de separación entre células, como aparece en la ecuación 6. Esta dependencia de  $F_{sec}$  con la distancia de separación implica que para distancias de  $10 \mu m$  la fuerza secundaria es tres órdenes de magnitud menor que  $F_{prm}$ . Este hecho fue evidenciado por Haar y Wyard en 1978 al determinar que glóbulos rojos en suspensión expuestos a una onda estacionaria de 3 MHz con una potencia de  $1 W/cm^2$  experimentaban una  $F_{prm}$  de  $2 \times 10^{12} N$ , mientras que, en contacto o separados por una distancia de  $10 \mu m$  se generaba entre ellos una  $F_{sec}$  de  $2 \times 10^9 N$  y  $2 \times 10^{14} N$ , respectivamente [41].

Otro aspecto importante a resaltar de las fuerzas de Bjerkness es que cuando las células se ubican en los planos nodales,  $p(x) \rightarrow 0$  ecuación 6,  $F_{sec}$  puede ser atractiva o repulsiva [40], lo cual, ocurre si la línea que une los centros de dos células es paralela a la dirección de propagación de la onda,  $\theta = 0$  en la ecuación 6, (fuerza repulsiva), o si esta línea es perpendicular a la dirección de propagación,  $\theta = 90$  en la ecuación 6 (fuerza atractiva) [41].

## V. EFECTOS A NIVEL CELULAR

Los campos acústicos en el rango de los ultrasonidos han sido ampliamente usados en el mundo durante más de medio siglo como herramienta para generar imágenes diagnósticas, sin evidenciarse durante este tiempo efectos adversos aparentes en humanos asociados con su uso rutinario [18].

Sin embargo, aunque en las aplicaciones actuales de manipulación y separación celular, se afirma que no generan daño o efectos adversos debido a que tienen las mismas características de los ultrasonidos empleados en diagnóstico médico, es importante, como asegura Martin Wiklund, notar que los bioefectos generados en el cuerpo humano pueden ser diferentes comparados con los observados en un cultivo celular *in vitro* expuesto al mismo tipo de campo, efectos que, además, pueden variar entre diferentes líneas

celulares. Esto hace de la viabilidad un parámetro difícil de modelar y predecir, que en principio debe ser investigado experimentalmente para cada tipo celular [18].

Por esta razón y para evidenciar el tipo de efectos que se pueden generar en las células de un cultivo *in vitro*, al ser expuestas a un campo acústico en el rango de los ultrasonidos, a continuación se describen resultados experimentales encontrados en estudios de viabilidad de diferentes modelos celulares.

### V.1. Glóbulos Rojos:

Yasuda *et al.*, sugieren que para determinar el efecto causado por la exposición de glóbulos rojos a campos acústicos ultrasónicos es necesario estimar la concentración de iones potasio ( $K^+$ ), hierro ( $Fe$ ) y de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) liberados por la célula al medio [42], que dan cuenta de alteraciones diferenciales de permeabilidad.

Con este objetivo estos autores prepararon una muestra con 5 ml de sangre tomada de *Cavia porcellus*, a la cual se le agregó 1 % W/V de heparina, solución que posteriormente fue centrifugada a 600 g a  $4^{\circ} C$  por 10 min con el propósito de separar eritrocitos. Después de separados, fueron lavados tres veces con solución fisiológica (0,9 % NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH = 7,4) y por último se recuperaron y resuspendieron en solución salina a un hematocrito de 3,3 % [42].

Posteriormente se introdujeron 300  $\mu l$  de la muestra en un dispositivo acústico para exponer estas células a una onda ultrasónica con una frecuencia de 500 kHz, la cual fue elegida con la intención de establecer al interior del dispositivo  $\lambda/2$  y así tener un nodo de presión en la mitad de su espesor. Se observó que los glóbulos rojos migraban hacia el nodo de presión de la onda, cambiando su distribución espacial con el tiempo, al usar una onda acústica estacionaria de amplitud igual a  $180 V_{pp}$  con una densidad de energía acústica de  $12,8 mJ/m^3$ , [42].

Después de irradiar la muestra con la energía acústica, se removieron los eritrocitos del dispositivo para medir el porcentaje de liberación de iones  $K^+$ ,  $Fe$  y la enzima LDH. La medición se hizo al comparar el porcentaje de liberación de éstos, en la muestra recuperada, con el porcentaje de liberación obtenido en células no expuestas a ultrasonidos o lisadas por su exposición a energía acústica. El procedimiento anterior fue realizado para cuatro muestras expuestas durante diferentes tiempos y energía acústica.

Para eritrocitos sometidos a  $12,8 mJ/m^3$  durante 2,5 min, Yasuda *et al.*, encontraron que el porcentaje de liberación de iones y enzima es menor al observado en la muestra lisada, pero mayor al de eritrocitos no expuestos a ultrasonidos, incremento que puede ser causado por la presión ejercida por el campo acústico.

Por otro lado para una muestra expuesta a  $3,2 mJ/m^3$  por un período de 10 min, estos autores determinaron que el

porcentaje de liberación de iones y enzima es mayor que el registrado con eritrocitos no expuestos a ultrasonidos, diferencia que puede ser explicada por el cambio en la temperatura de la muestra, inducido por los ultrasonidos.

Por último, en el caso de una muestra sometida  $12,8 \text{ mJ}/\text{m}^3$  durante  $2,5 \text{ min}$  pero con presencia de cavitación, se observó que el porcentaje de liberación de iones y enzima es comparable al obtenido en la muestra lisada, indicando que las condiciones inducidas por la cavitación rompen la membrana celular.

Estos resultados sugieren que la fuerza de radiación acústica es eficaz para concentrar eritrocitos sin daño notable en condiciones libres del efecto de cavitación [42].

## V.2. Células del Sistema Nervioso:

Bocchi *et al.*, aseguran que los ultrasonidos empleados actualmente en diagnóstico médico pueden generar efectos positivos en diferenciación celular, morfología y conectividad de células en el sistema nervioso central (SNC) que ha sido alterado por enfermedades neurodegenerativas [20].

Para evaluar los efectos del campo acústico en la morfología e interacción entre neuronas y células microgliales, estos autores realizaron valoración por microscopía de contraste de fases de muestras sometidas a ultrasonidos; adicionalmente construyeron un algoritmo en Matlab que permitió desarrollar un método automatizado para el análisis de las imágenes obtenidas [20].

En este estudio se usaron las líneas celulares SH-SY5Y de neurona humana y BV 2 de microglia de ratón, las cuales fueron mantenidas en DMEM/Hams F12 y RPMI 1640, respectivamente, suplementados con 10% de suero fetal bovino (SFB) y  $2 \text{ mM}$  de L-glutamina a  $37^\circ \text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ .

Para las pruebas acústicas se usaron cinco cajas de Petri por cada línea celular, las cuales fueron mantenidas en medio sin SFB 24 horas antes del tratamiento que fue retirado completamente y la parte posterior del fondo de la caja cubierta con gel transmisor; luego cada caja fue tratada por tres minutos con ultrasonidos de  $12 \text{ MHz}$ . El tiempo de exposición y frecuencia se eligieron por su similitud con los valores usados convencionalmente en tratamientos ultrasónicos de diagnóstico. Las muestras que se usaron como control fueron sometidas al mismo procedimiento, sin ser expuestas a ultrasonidos, manteniéndose fuera de la incubadora, sin medio y boca abajo durante el tiempo de exposición de las otras muestras [20].

Antes de hacer el análisis morfológico Bocchi *et al.*, determinaron, por densidad óptica, si el campo acústico usado afectaba la proliferación de las líneas celulares SH-SY5Y y BV 2, encontrando que decrece significativamente después del tratamiento con ultrasonidos comparada con la de células control [20].

Al valorar por microscopía las redes generadas por neuronas sometidas al tratamiento ultrasónico, se encontró incremento

en el número y longitud de las prolongaciones, efecto que generó redes más complejas e intrincadas comparadas con las formadas por células no expuestas. Por otro lado, en la línea celular BV 2 donde la forma se asocia con su función se encuentran células redondeadas cuya función es remover desechos del medio, ameboides que se comportan como un macrófago activo y por último células con prolongaciones muy alargadas que son inactivas. Se observó, después de su exposición a ultrasonidos, que se presentaba disminución significativa en el número de células de forma redonda, mientras que el número de células con prolongaciones largas del cuerpo celular aumentó [20].

Adicionalmente el algoritmo diseñado permitió establecer la morfología de estas poblaciones celulares que se caracterizan por generar redes complejas, evidenciando, con este sistema, que número y longitud de las elongaciones en neuronas y células microgliales incrementó después del tratamiento con ultrasonidos [20].

## V.3. Levaduras:

Radel *et al.*, a partir de la suposición que las tecnologías de inmovilización, como las técnicas de manipulación celular con campos acústicos en el rango de los ultrasonidos, incrementan la tolerancia a estrés ambiental generado en levaduras durante la fabricación de cerveza, investigaron el efecto en la viabilidad de estas células al ser expuestas a ondas estacionarias de  $2,2 \text{ MHz}$  con una potencia de  $14 \text{ W}$  [23].

Para esto, se cultivó la cepa NCYC 1006 de *S. cerevisiae* a  $30^\circ \text{C}$  durante  $24 \text{ h}$  con una concentración de  $3,4 \times 10^7 \text{ cel/ml}$ , cultivo que posteriormente fue centrifugado a  $3800 \text{ rpm}$  por  $10 \text{ min}$  y resuspendido en  $100 \text{ ml}$  de solución salina ( $0,9 \text{ g NaCl}$  en  $100 \text{ ml H}_2\text{O}$ ).

En la determinación, Radel *et al.*, emplearon medio sin o con etanol a una concentración de 12% (Vol/Vol). Este último fue usado con el propósito de estudiar el efecto de productos de la fermentación en la viabilidad de las levaduras. Luego, se tomaron  $64 \text{ ml}$  de cada medio y se sometieron a un campo acústico estacionario al introducir este volumen de solución en una cámara de sonicación. Después de realizado el tratamiento ultrasónico, se recuperaron las levaduras y se midió el porcentaje de muerte celular por tinción con azul de metileno y se analizaron cambios morfológicos mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) [23].

De los experimentos realizados se encontró, en el caso del medio sin etanol, primero que al someter las levaduras al tratamiento ultrasónico estas se ubicaban en diferentes niveles asociados con los planos nodales de la onda estacionaria, efecto generado por la acción de la componente axial de la fuerza primaria de radiación acústica, 4, y segundo que las células se agregaban en distintas regiones de los planos nodales, debido al efecto de la componente lateral de la fuerza primaria de radiación acústica y a la acción de las fuerzas de Bjerkness, 6. Zonas estas donde se establece que la amplitud de presión es baja, 2 [23].

Sin embargo, por microscopía electrónica se evidenciaron

alteraciones en la integridad de vacuolas al interior de las levaduras, mientras que su núcleo y membrana celular no eran aparentemente afectados, daño que según Radel y colaboradores no es significativo pero que comprometería parcialmente el proceso de división celular [23].

Por otro lado en presencia de etanol a una concentración de 12% (Vol/Vol), se observó que la viabilidad celular disminuía [23]. La presencia de etanol en el medio podría estar ubicando las levaduras en regiones internodales, con lo cual las células son expuestas a amplitudes de presión más elevadas, ecuación 2.

Para terminar es importante resaltar que según Radel *et al.*, los resultados encontrados están de acuerdo con evidencia previa que sugiere que el daño causado a las células está directamente relacionado con el efecto de la presión sobre estas [23].

#### V.4. Células Vegetales:

Bohm *et al.*, afirman que hay poca atención en el estudio de estos efectos en plantas, investigaciones que son importantes en aplicaciones biotecnológicas tales como sistemas ultrasónicos de filtración o agitación, porque al considerar la viabilidad de estas células como una función del tipo de onda (viajera o estacionaria), de la frecuencia, el tiempo de exposición al campo y de la densidad de energía, se puede manipular los ultrasonidos con mayor eficiencia en estas aplicaciones [24].

Entonces, para evaluar el efecto en la viabilidad celular generado por ondas ultrasónicas, estos autores usaron cultivos *in vitro* de *Petunia hybrida* que fueron mantenidos durante 7 días en medio líquido UM a  $24 \pm 2^0$  C. Si bien las células en cultivo tenían un diámetro entre  $60 - 80 \mu m$ , como resultado de la división celular tendían a formar colonias de aproximadamente 10 células que fueron filtradas para reducir efectos de apantallamiento y permitir el conteo celular por microscopía [24].

El tratamiento ultrasónico de los cultivos de *P. hybridase* llevó a cabo en dos cámaras diferentes, dependiendo si la onda ultrasónica a usar era estacionaria o viajera, en donde se introducía una suspensión de células con una concentración  $1,2 \times 10^4$  cel/ml que era expuesta a frecuencias entre  $2 - 2,5$  MHz durante un tiempo máximo de 40 min. Después los cultivos fueron recuperados para medir captación de diacetato de fluoresceína (FDA), identificando, además, que parámetros como densidad de energía acústica, tipo de onda y días de cultivo afectaban la viabilidad celular [24].

Para evidenciar el efecto de la energía acústica Bohm *et al.*, expusieron células de *P. hybrida* a una onda estacionaria de 2,43 MHz y posteriormente variaron la densidad de energía desde  $0$  J/m<sup>3</sup> hasta  $70$  J/m<sup>3</sup>, observando que la viabilidad cambia poco cuando las células son expuestas a una energía de  $25$  J/m<sup>3</sup>. Sin embargo, para energías más altas tales como  $44$  J/m<sup>3</sup> y  $70$  J/m<sup>3</sup> la viabilidad decrece a 60% y 20% respectivamente después de 40 min de exposición, cambios que pueden estar asociados con el aumento de la presión.

Al determinar el efecto en la viabilidad generado por el tipo de campo acústico, estos autores expusieron células a ondas estacionarias y viajeras con densidad de energía de  $8,5$  J/m<sup>3</sup> y una frecuencia de  $2,15$  MHz, lo cual generó amplitudes de presión máximas de  $0,28$  MPa en las ondas estacionarias y  $0,2$  MPa en las viajeras, exponiendo las células al mismo valor de energía independiente del tipo de onda. Al comparar los resultados obtenidos usando los dos tipos de ondas con el control, Bohm *et al.*, observaron una rápida disminución en la viabilidad cuando exponían células al campo de una onda viajera, mientras que permanece constante para ondas estacionarias [24].

Este resultado se explica por el hecho de que en un campo de onda viajera las células tienden a distribuirse homogéneamente en todo el fluido, siendo expuestas a diferentes amplitudes de presión y de desplazamiento. Por otro lado, en un campo de onda estacionario las células tienden a moverse, por la acción de la fuerza primaria de radiación acústica, hacia los nodos de la onda dependiendo de su densidad y compresibilidad, posición en la que permanecen durante su exposición al campo acústico estacionario siendo así sometidas a una menor presión (figura 4d). Los resultados encontrados por estos autores evidencian que al incrementar la densidad de energía y el tiempo de exposición a un campo acústico estacionario se disminuye la viabilidad de las células en un cultivo de *P. hybrida* y que adicionalmente el daño puede aumentar dependiendo del tipo de onda aplicada.

## VI. EFECTOS A NIVEL MOLECULAR Y ESTRUCTURAL

Cuando se emplea un campo acústico, dependiendo de su frecuencia, tipo de onda o célula y del tiempo de exposición, éste puede generar efectos mecánicos que obligan a cambiar la forma celular. Lo anterior conlleva alteraciones moleculares y estructurales que se traducen en variaciones de elasticidad, tamaño y forma, las cuales, desencadenan desde el interior de la célula una respuesta mecánica que involucra cambios en la regulación de presión y volumen [43], al igual que cambios conformacionales y mecánicos en citoesqueleto.

Para entender por qué se generan estos cambios a nivel molecular y estructural en células de cultivos *in vitro*, expuestas a campos como el acústico donde habrían interacciones de carácter mecánico, es necesario desarrollar modelos físicos que permitan explicar estos efectos. En la actualidad hay muchas aproximaciones y modelos mecánicos para células mamíferas, pero en general se pueden reducir a dos. Uno en la que la célula es vista como un medio continuo, modelos viscoelástico y bifásico, y otro en la que la célula sería un material micro y nano estructurado, modelos citoesqueléticos, para células adherentes, y de redes de espectrina para eritrocitos [44].

### VI.1. Modelo Viscoelástico:

Al modelar la célula como un medio continuo, se considera a ésta como un objeto que tiene las mismas propiedades físicas

en todo su espesor, es decir, si es dividida en elementos infinitesimales, cada uno de los cuales tendría las mismas propiedades que el sistema en su totalidad. Por lo tanto, las propiedades locales y globales de la célula son homogéneas, y el comportamiento mecánico estaría gobernado por procesos que se pueden expresar con las ecuaciones de la mecánica en términos de balance de masa, momentum lineal, momentum angular y energía [45].

A pesar de la complejidad de la célula como sistema físico, del poco entendimiento de la dinámica celular y la reacción física de las células a su ambiente [46], a nivel mecánico existe una variedad de técnicas experimentales que han mostrado la reacción de las células a una fuerza mecánica [47, 59], evidenciándose por una parte su carácter elástico dada su capacidad de reaccionar a una fuerza mecánica deformándose en proporción con el esfuerzo pero volviendo a su forma original una vez la fuerza es removida y, su carácter viscoso debido a que ante un aumento en el esfuerzo es posible que la célula se deforme permanentemente, de manera que la célula puede tratarse como un material viscoelástico [49].

Desde el punto de vista de la mecánica la reacción de una célula, material viscoelástico, a una fuerza es abordable desde la tercera ley de Newton, pares de acción-reacción (figura 4), y mediante la ley de Hooke [50], que puede sintetizarse en la forma

$$\sigma = E\varepsilon. \quad (7)$$

Donde  $\sigma$  es la fuerza por unidad de área o esfuerzo,  $\varepsilon$  es la deformación, que se entiende como la medida cuantitativa del cambio de forma del material y  $E$  el módulo de elasticidad asociado con las propiedades elásticas del material.

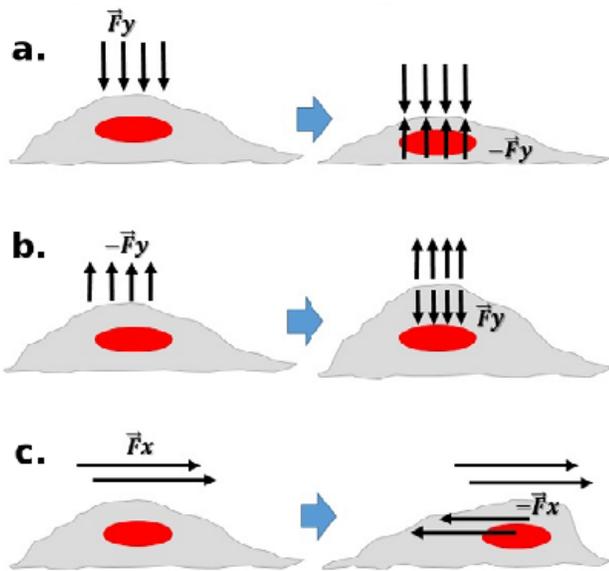


Figura 4. Modelo viscoelástico para la célula. a. Deformación por compresión b. Deformación por tensión. c. Deformación por cizallamiento.

Así, dependiendo de la dirección y magnitud de la fuerza aplicada (acción), se generaría una deformación (reacción) en

la célula, la cual puede estar asociada con una compresión, si la fuerza se aplica perpendicularmente a la superficie de la célula en dirección a su interior (figura 4a), con una tensión, cuando la fuerza se aplica perpendicularmente a la superficie de la célula en dirección hacia su exterior (figura 4b), o con un cizallamiento, si la fuerza se aplica paralelamente a la superficie de la célula (figura 4c).

Estas descripciones son útiles al ofrecer una relación entre la deformabilidad mecánica y el potencial metastásico en células cancerígenas, donde la elasticidad es un fenotipo que puede estar asociado con la sobreexpresión de genes involucrados en motilidad, lo que puede ser útil para fines terapéuticos [51]. Sin embargo, si se quiere entender la reacción interna de la célula a un campo de fuerzas, como el acústico, es necesario realizar una descripción de la mecánica de los componentes internos de ésta.

#### Modelo Citoesquelético:

Albrecht-Buehler en 1987 reportó que el primer componente que soporta la acción de fuerzas mecánicas se encuentra bajo la membrana celular y es el citoesqueleto [52], el cual está formado por una red de biopolímeros cruzados y superpuestos que generan una malla o red, donde el comportamiento mecánico de ésta estructura en conjunto depende del comportamiento mecánico de sus constituyentes individuales: microfilamentos de actina [53], microtúbulos [54] y filamentos intermedios [55], elementos que están unidos por nodos proteicos de filamina y actina [56], donde dependiendo del espacio entre bandas y la distancia entre nodos se construirá un armazón, que le permite a la célula tolerar deformaciones, transmitir esfuerzos y dirigir cambios de forma [57].

Así existen modelos donde se afirma que al imponer un esfuerzo sobre una célula, éste se distribuirá homogéneamente y será soportado solamente por la corteza celular, logrando descripciones mecánicas de las viscosidades y tensiones corticales en granulocitos sanguíneos [58], citoplasma de neutrófilos [59], y membrana de células endoteliales y leucocitos [60], sin una relación marcada con cambios en su estructura interna.

Según lo afirmado por Ingber y Folkman en 1989, si se quiere explicar cómo la célula regula su comportamiento ante un estímulo mecánico es útil alejarse del supuesto de ésta y su citoesqueleto como materiales continuos, para postular modelos que incluyan la microestructura intracelular, relacionando su comportamiento mecánico con cambios químicos que afectan el comportamiento molecular [61], y así modelarla matemáticamente, basándose en un principio arquitectónico propuesto por Fuller en 1961 llamado integridad tensional [62].

Este principio permite generar un modelo en el que un sistema cualquiera puede describirse a partir de tensiones y compresiones, donde barras rígidas son las responsables de generar compresiones y cuerdas elásticas de generar tensiones. En el caso de la célula, según Ingber y Donald, bajo el modelo de tensegridad las estructuras que asumen las fuerzas de tensión son microfilamentos y filamentos

intermedios, siendo las fuerzas de tensión balanceadas por elementos estructurales interconectados que resisten compresión, papel que cumplen microtúbulos y matriz extracelular [63].

En investigaciones recientes para explicar la mecánica de adhesión y la respuesta celular ante la aplicación de una fuerza externa Walcott *et al.* emplean un modelo de citoesqueleto que incorpora dentro de su desarrollo elementos propios de la estructura celular, incluyendo interacción entre microfilamentos de actina por proteínas de ligación y complejos de adhesión mediante sistemas masaresorte, logrando la solución de una ecuación diferencial, que hace posible un análisis de distribución de probabilidad de enlaces, rupturas y tasas de giro de proteínas en función de un tiempo característico, que depende de la longitud de filamentos de actina, de la fricción interna y de la magnitud de la fuerza aplicada en la célula [64].

A nivel de aplicación, entender la dinámica del citoesqueleto ante cambios mecánicos impuestos en el ambiente es de importancia a nivel celular. Por ejemplo en los estudios de Engler *et al.*, se realiza un seguimiento de la viabilidad de células madre, variando parámetros del ambiente mecánico, como el módulo elástico del sustrato en el que las células se encuentran adheridas [65].

En este estudio se muestra que la diferenciación de estas células depende de la rigidez que sensan del sustrato en el que se encuentran, donde las adheridas a superficies rígidas (20–45 kPa) se transforman en osteocitos, las que se adhieren en superficies suaves se transforman en células cerebrales primarias (0,1 – 1 kPa), y las adheridas en superficies intermedias se transforman en miocitos (8 – 10 kPa), lo que indica que señales mecánicas tienen significado fisiológico y determinan el destino de diferenciación celular [65]. En otras palabras, la célula tiene mecanismos que le permiten sentir fuerzas mecánicas, como las asociadas al campo acústico, y generar respuestas acorde con la magnitud de éstas.

## VII. CONCLUSIONES

En la aplicación de ultrasonidos para el desarrollo de nuevas tecnologías de manipulación y separación celular, es importante identificar los efectos físicos y biológicos causados por el campo acústico sobre las células, con el objetivo de optimizar su uso en estas aplicaciones. Entre los efectos físicos observados, al exponer células de un cultivo *in vitro* a un campo acústico, según se mencionó, se encuentran (i) la cavitación asociada con el cambio de temperatura y presión del medio, (ii) el aumento de temperatura del medio debido a la disipación de energía de la onda y (iii) los efectos asociados con las fuerzas  $F_{prm}$  y  $F_{sec}$  que pueden ser afectados por productos obtenidos en procesos biológicos, los cuales cambian las propiedades físicas del medio de cultivo, como su densidad y compresibilidad, generando cambios en la intensidad de las fuerzas, sometiendo a las células a diferentes valores de presión alterando su viabilidad.

La acción e intensidad de estos efectos físicos se relaciona con el tiempo de exposición al campo y las características de

la onda usada, tipo de onda, frecuencia y amplitud, efectos que pueden ser adversos o positivos dependiendo de la línea celular.

Por otro lado los efectos físicos pueden generar efectos biológicos que se evidencian a nivel molecular, por ejemplo, el cambio en la temperatura del medio puede afectar procesos de transcripción y traducción en la célula, efecto que se evidencia con la disminución en la proliferación celular y el cambio en la morfología de las células asociada con sus estados funcionales.

## VIII. AGRADECIMIENTOS

Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación Colciencias por su apoyo con los proyectos Uso de levitación acústica para separación y clasificación de células infectadas con *Leishmania* Plasmodium, ECOS NORD Francia convocatoria No. 533 de 2011 y Sistemas de separación y clasificación celular en corto tiempo, con bajo costo y alta eficiencia: uso de levitación acústica y fuerzas hidrodinámicas, convocatoria 569 de 2012, código 222856933541.

## REFERENCIAS

- [1] Hartono, D., Liu, Y., Tan, P. L., Then, X. Y., Yung, L. L., and Lim, K. On-chip measurements of cell compressibility via acoustic radiation. *Lab Chip*, 11(23), 4072, 2011.
- [2] Barnkob R., Augustsson P., Magnusson C., Lilja H., Laurell T. and Bruus H. Measuring density and compressibility of white blood cells and prostate cancer cells by microchannel acoustophoresis. 5th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences October 2-6, 2011, Seattle, Washington, USA.
- [3] Weiser M. A. H and Apfel R. Extension of acoustic levitation to include the study of micronsize particles in a more compressible host liquid. *J. Acoust. Soc. Am.* 71(5), May 1982.
- [4] Shields, C. Wyatt, Catherine D. Reyes, and Gabriel P. Lpez. Microfluidic Cell Sorting: A Review of the Advances in the Separation of Cells from Debulking to Rare Cell Isolation. *Lab on a chip* 15.5 (2015): 12301249. PMC. Web. 25 Apr. 2016
- [5] Barnkob R. and Bruss H. Acoustofluidics in microsystems: investigation of resonances. Department of Micro and Nano-technology, Technical University of Denmark, 2009, Master Thesis, June.
- [6] Narayanan N., Saldanha A. and Gale B. K. A microfabricated electrical SPLITT system. *Lab Chip*, 6, 105-114. (2006).
- [7] Thayne L. E. Microfabricated Acoustic and Thermal Field-9 Flow Fractionation Systems. Georgia Institute of Technology, 2005, Doctor Thesis, May.
- [8] Chianéa, T. Sedimentation field-flow-fractionation: Emergence of a new cell separation methodology. *Talanta*, 51(5), 835-847.(2000).

- [9] Wahlund KG and Nilsson L. Flow FFFBasics and key applications. In: Williams SKR, Caldwell KD (eds) Field-flow fractionation in biopolymer analysis. (Springer, Vienna (2012)).
- [10] Reschiglian, P., Zattoni, A., Roda, B., Michelini, E., and Roda, A. Field-flow fractionation and biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 23(9), 475-483. (2005).
- [11] Liu, Y., and Lim, K. Particle separation in microfluidics using a switching ultrasonic field. *Lab on a Chip*, 11(18), 3167. (2011).
- [12] Gupta, S., Feke, D. L., and Manas-Zloczower, I. Fractionation of mixed particulate solids according to compressibility using ultrasonic standing wave fields. *Chemical Engineering Science*, 50(20), 3275-3284. (1995).
- [13] Kumar, M., Feke, D. L., and Belovich, J. M. Fractionation of cell mixtures using acoustic and laminar flow fields. *Biotechnol. Bioeng. Biotechnology and Bioengineering*, 89(2), 129-137. (2004)
- [14] Petersson, F., Nilsson, A., Holm, C., Jansson, H., and Laurell, T. Continuous separation of lipid particles from erythrocytes by means of laminar flow and acoustic standing wave forces. *Lab Chip*, 5(1), 20-22. (2005).
- [15] Bruss Henrik. Acoustofluidics 1: Governing equations in microfluidics. *Lab Chip*, 11, 3742. (2011).
- [16] Guo F., Li P., French J., Mao Z., Zhao H., Li S., Nama N., Fick J., Benkovic S. and Huang T. J. Controlling cell-cell interactions using surface acoustic waves. *PNAS*. Vol. 112, no. 1, 4348, January. (2015).
- [17] Ding X., Lin S., Kiraly B., Yue H., Li S., Chiang Ikao., Shi J., Benkovic S. J. and Huang T. J. On-chip manipulation of single microparticles, cells, and organisms using surface acoustic waves. *PNAS*. Vol. 109, no. 28, 1110511109, (2012).
- [18] Wiklund, Martin. Acoustofluidics 12: Biocompatibility and cell viability in microfluidic acoustic resonators. *Lab on a Chip*, April, 2012.
- [19] Li, Peng, Mao, Zhangming, Peng, Zhangli, Zhou, Lanlan, Chen, Yuchao, Huang, PoHsun, Truica, Cristina I., Drabick, Joseph J., El-Deiry, Wafik S., Dao, Ming, Suresh, Subra, and Huang, Tony. Acoustic separation of circulating tumor cells. *PNAS*, 112 (16) Jun, 2015.
- [20] Bocchi, Leonardo, Branca, Jacopo J.V., Pacini, Stefania, Cosentino, Angela, Morucci, Gabriele, and Ruggiero, Marco. Effect of ultrasounds on neurons and microglia: Cell viability and automatic analysis of cell morphology. *Biomedical Signal Processing and Control*, 22, 4453. (2015).
- [21] Hultstrom, J. H., Manneberg, O. M., Dopf, K. D., Hertz, H. M. H., Brismar, H. B., and Wiklund, M. W. Proliferation and viability of adherent cells manipulated by standing wave ultrasound in a micro fluidic chip. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 33(13). (2007).
- [22] Wang, Pan, Li, Yixiang, Wang, Xiaobing, Guo, Ling, MS, Xiaomin Su, and Liu, Quanhong. Membrane Damage Effect of Continuous Wave Ultrasound on K562 Human Leukemia Cells. *J Ultrasound Med*, 31(12), 1977-1986. (2012).
- [23] Radel, S., McLoughlin, A.J., Gherardini, L., Doblho Dier, O., and Benes, E. Viability of yeast cells in well controlled propagating and standing ultrasonic plane waves. *Ultrasonics*, 38, 633-637. 2000.
- [24] Bohm, H., Anthony, P., Davey, M.R., Briarty, L.G., Power, J.B., Lowe, K.C., Benes, E., and Grschl, M. Viability of plant cell suspensions exposed to homogeneous ultrasonic fields of different energy density and wave type. *Ultrasonics*, 38. (2000).
- [25] Chisti Y. Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity. *TRENDS in Biotechnology*. Vol.21 No.2 (2003).
- [26] Schlafer O., Sievers M., Klotzbucher H., and Onyeché T. I. Improvement of biological activity by low energy ultrasound assisted bioreactors. *Ultrasonics*, 38, 711-716. (2000).
- [27] Guo F., Mao Z., Chen Y., Xie Z., Lata J. P., Li P., Ren L., Liu J., Yang J., Dao M., Suresh S. and Huang T. J. Three-dimensional manipulation of single cells using surface acoustic waves. *PNAS*, 113, 6, 9, 2016.
- [28] Li S., Glynne-Jones P., Andriotis O. G., Ching K. Y., Jonnaladagda, Oreffo R. O. C., Hill M. and Tare R. S. Application of an acoustofluidic perfusion bioreactor for cartilage tissue engineering. *Lab Chip*, 14, 4475-4485. (2014).
- [29] Hawkes, J.J., Limaye, M.S., and Coakley, W.T. Filtration of bacteria and yeast by ultrasound-enhanced sedimentation. *Journal of Applied Microbiology*, 82, 39-47. (1997).
- [30] Sadikova D. G. and Pashovkin T. N. Cell Concentration and Separation in the Field of a Standing Ultrasonic Wave for Medicine and Biotechnology. *Open Journal of Biophysics*, 2013, 3, 70-75.
- [31] Landau L. D. and Lifshitz E. M. *Mecánica de fluidos Vol 6 curso de física teórica*. (Editorial Reverté, S. A. España 1985).
- [32] Yasuda K., Kiyama M. and Umemura S. Deoxyribonucleic acid concentration using acoustic radiation force. *J. Acoust. Soc. Am.* 99 (2), February, 1996.
- [33] Repacholi M. H., Grandolfo M. and Rindi A. *Ultrasound: medical applications, biological effects, and hazard potential*. (Plenum Press-New York and London. 1985).
- [34] Azar L. *Cavitation in Ultrasonic Cleaning and Cell Disruption. Controlled Environments*. February, 2009. [www.cemag.us](http://www.cemag.us).
- [35] Hill C. R., Bamber J. C. and ter Haar G. R. *Physical Principles of Medical Ultrasonics Second Edition*. (John Wiley & Sons, Ltd. 2004).
- [36] Laurell T. and Lenshof A. *Microscale Acoustofluidics*. The Royal Society of Chemistry. 2015.
- [37] Gor'kov, L. P. On the Forces Acting on a Small Particle in an Acoustical Field in an Ideal Fluid. *Soviet Physics Doklady*, Vol. 6, p.773. (1962).
- [38] Ding X., Peng Z., Lin S., Sz-Chin, Geri M., Li S., Li P., Chen Y., Dao M., Suresh S. and Huang T. J. Cell separation using tilted-angle standing surface acoustic waves. Supporting Information. *PNAS Early Edition*.

- [39] Perales F. and González I. On the Force Acting in Micro-manipulation of Particles at Low Frequencies. IEEE Ultrasonics Symposium. 2005.
- [40] Laurell T., Petersson F. and Nilsson A. Chip integrated strategies for acoustic separation and manipulation of cells and particles. Chem. Soc. Rev., 2007, 36, 492506.
- [41] Haar G. T. and Wyard S. J. Blood Cell Banding in Ultrasonic Standing Wave Fields: A Physical Analysis. Ultrasound in Med. & Biol., Vol. 4, pp. 111-12. (1978).
- [42] Yasuda, Kenji, Haupt, Stephan Shuichi and Umemura, Shinichiro. Using acoustic radiation force as a concentration method for erythrocytes. J. Acoust. Soc. Am, 102(12). 1997.
- [43] Jiang Hongyuan, Sean X. Sun, Cellular Pressure and Volume Regulation and Implications for Cell Mechanics Biophysical Journal Volume 105, Issue 3, 6 2013.
- [44] Lim C.T, Zhou E.H and Quek S.T. Mechanical models for living cells, review, Journal of Biomechanics 39 (2006) 195216.
- [45] Stamenović Dimitrije and Wang Ning. Stress Transmission within the Cell, Compr Physiol. 1(1), 499524, 2011.
- [46] Wolgemuth Charles W. Trend: Does cell biology need physicists?, Physics, American Physical Society, 2011. doi: 10.1103/Physics.4.4.
- [47] Sato M., Theret D.P., Wheeler L.T., Ohshima N. and Nerem R.M. Application of the micropipette technique to the measurement of cultured porcine aortic endothelial cell viscoelastic properties. Journal of Biomechanical Engineering 112, 263-268, 1990.
- [48] Dong C. and Skalak R. Leukocyte deformability: finite element modeling of large viscoelastic deformation. Journal of Theoretical Biology 158 (2), 173193, 1992.
- [49] Kasza Karen E, Rowat Amy C, Jiayu Liu, Angelini T. E., Brangwynne C. P., Koenderink G. H. and Weitz D. A. The cell as a material, Current Opinion in Cell Biology, 19:101107, 2007.
- [50] Heidemann Steven and Wirtz Denis. Towards a regional approach to cell mechanics, trends in Cell Biology Vol.14 No.4 2004.
- [51] Zhang Weiji, Kaid Kazuharu, Choi Dong Soon, Iwamoto Takayuki, Nguyen Yen H., Wong Helen and Landis Melissa. Microfluidics separation reveals the stem-celllike deformability of tumor-initiating cells, Ueno Naoto T., Chang Jenny, Qina Lidong, PNAS, vol. 109, no. 46 — 1871 (2012).
- [52] Albrecht-Buehler, G. Role of cortical tension in fibroblast shape and movement, Cell Motil. Cytoskeleton 7, 54-67, 1987
- [53] Gardel M.L., Nakamura F., Hartwig J.H., Crocker J.C., Stossel T.P. and Weitz D.A. Prestressed F-actin networks cross-linked by hinged filamins replicate mechanical properties of cells, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103 (2006) 17621767.
- [54] Gittes F, Mickey B., Nettleton J. and Howard J. Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape, J. Cell Biol. 120 (1993) 923934.
- [55] Koster S., Weitz D.A., Goldman R.D., Aebi U. and Herrmann H. Intermediate filament mechanics *in vitro* and in the cell: from coiled coils to filaments, fibers and networks, Curr. Opin. Cell Biol. 32C (2015) 8291.
- [56] Janmey Paul A. and Weitz David. Dealing with mechanics: mechanisms of force transduction in cells, trends in Biochemical Sciences Vol.29 No.7 July 2004.
- [57] Fletcher Daniel A, Mullins Dyché. Cell mechanics and the cytoskeleton, Nature Vol 463, 28 (2010).
- [58] Evans E. and Yeung A. Apparent viscosity and cortical tension of blood granulocytes determined by micropipet aspiration. Biophys. J. 56, 151-160, 1989.
- [59] Dong C., Skalak, R. and Sung K. L. Cytoplasmic rheology of passive neutrophils. Biorheology 28, 557-567, 1991.
- [60] Schonbein Schmid, G. W., Kosawada, T., Skalak, T. and Chien, S. Membrane model of endothelial cell and leukocytes. A proposal for the origin of cortical stress. ASME J. Biomech. Eng. 117, 171-178, 1995.
- [61] Ingber, D.E. and Folkman, J. Tension and compression as basic determinants of cell form and function: utilization of a cellular tensegrity mechanism. In Cell Shape: Determinants, Regulation and Regulatory Role (ed. Stein, W. and Bronner, F.), (Academic Press: Orlando, 1989).
- [62] Fuller B. Tensegrity. Portfolio Artnews Annual 4, 112-127, 1961.
- [63] Ingber and Donald E. Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology Journal of Cell Science 116 (7), 2003.
- [64] Walcott Sam A, Suna X. Mechanical model of actin stress fiber formation and substrate elasticity sensing in adherent cells. PNAS, vol. 107 , no. 17, 77577762, (2010).
- [65] Engler J. Adam, Sen Shamik, Sweeney Lee and Discher E. Dennis, Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification, Cell 126, 677689, (2006).