



INAOE

**Efecto de la terapia fotodinámica
antimicrobiana en las propiedades
viscoelásticas de *Candida tropicalis***

por

Ing. Doralycia Carranza Zuñiga

Tesis sometida como requisito parcial para la
obtención del grado de

**Maestro en ciencias en la especialidad de
óptica**

en el

**Instituto Nacional de Astrofísica Óptica y
Electrónica**

Agosto 2023

Tonantzintla, Puebla

Supervisada por:

Dr. Rubén Ramos García, INAOE

Dra. Teresita Spezzia Mazzocco, INAOE

© INAOE 2023

Derechos Reservados

El autor otorga al INAOE el permiso para reproducir y
distribuir copias de esta tesis en su totalidad o en partes
mencionando la fuente.



Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que contribuyeron a esta tesis.

A mi familia, por ser mi fuente constante de inspiración y apoyo. Gracias por creer en mí y alentarme a superar cada obstáculo.

Al Dr. Rubén Ramos García, cuya orientación experta y sabios consejos guiaron esta investigación desde sus primeras etapas. En especial a la Dra. Teresita Spezzia Mazzocco por apoyarme durante la realización de este trabajo de investigación. Su disposición para escuchar incluso las inquietudes más pequeñas sobre los experimentos, así como sus asesorías y múltiples revisiones de la tesis, fueron invaluable.

Al Comité de Tesis, en especial al Dr. Julio Ramírez San Juan por su exhaustiva evaluación y valiosos comentarios. Al Dr. Francisco J. Renero Carrillo y al Dr. Ulises Ruiz Corona por sus contribuciones.

Al Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica y el CONAHCYT por los distintos apoyos otorgados que facilitaron mi estancia en el instituto y sin los cuales, me hubiese resultado complicado realizar este posgrado.

A Juan Vázquez Lozano por su paciencia, consejos y apoyo incondicional. A Joaquín Ascencio por compartir conmigo sus conocimientos y pasión por la investigación.

A mis amigos y compañeros de grupo de Biofotónica por sus ideas, su compañía y consejos además de hacer los momentos difíciles más llevaderos, en especial a Mayra Salazar por su invaluable ayuda y orientación en el laboratorio de Terapia Fotodinámica. Mis logros son, en gran parte, un reflejo de su generosidad y apoyo.

Resumen

Las pinzas ópticas han demostrado ser una herramienta versátil y prometedora en diversos campos de investigación, brindando nuevas posibilidades para el estudio y la manipulación de objetos a escala microscópica.

El presente trabajo se enfocó en la utilización de pinzas ópticas y la terapia fotodinámica antimicrobiana utilizando azul de metileno como fotosensibilizante con una concentración de 10 μM y una dosis de 60 J/cm^2 en células fúngicas, centrándose en levaduras de *C. tropicalis*.

Se demostró de manera exitosa la viabilidad y utilidad de las pinzas ópticas en la manipulación y monitoreo de organelos dentro de las células fúngicas. Además, se evidenció una relación entre el aumento en la rigidez celular y los cambios en la viscosidad intracelular después de la aplicación del tratamiento. Se realizó el seguimiento del tratamiento mediante el análisis de secuencias de imágenes, donde se observó un cambio morfológico significativo, lo cual brinda una nueva herramienta para la caracterización celular.

Por último, se incluyó la implementación de la terapia *in situ*, donde inicialmente se observó un incremento en la rigidez celular y posteriormente un cambio en la morfología intracelular. Para minimizar el daño causado por la exposición prolongada al láser de detección se llevaron a cabo mediciones cortos por intervalos de tiempo.

Se respaldó la viabilidad y utilidad de las pinzas ópticas en la manipulación y monitoreo celular, y brindan información importante sobre las propiedades viscoelásticas de la *C. tropicalis* y los procesos de muerte celular inducidos por la TFDA.

Abstract

Optical tweezers have demonstrated remarkable versatility and promise across various realms of research, ushering in fresh avenues for microscopic-scale study and object manipulation.

The present study distinctly delved into the realm of optical tweezers and their constructive interaction with antimicrobial photodynamic therapy (APDT), employing methylene blue as a photosensitizer at a concentration of 10 μM and a dose of 60 J/cm^2 in fungal cells, focusing on yeasts of *C. tropicalis*.

The practicality and efficacy of optical tweezers in manipulating and closely monitoring organelles within fungal cells were undeniably displayed. In addition, a relationship between the increase in cell rigidity and changes in intracellular viscosity after the application of the treatment was shown. This ongoing treatment process was meticulously monitored through a comprehensive image sequence analysis, culminating in the revelation of a profound morphological transformation that not only enriched cellular characterization but also provided a groundbreaking tool for advanced cell studies.

Moreover, the implementation of *in situ* therapy was thoughtfully integrated into the study, revealing an initial elevation in cell rigidity, followed by subsequent nuanced modifications in intracellular morphology. To mitigate any potential repercussions of prolonged laser exposure, concise measurements were judiciously undertaken at regular intervals.

The viability and utility of optical tweezers in cellular manipulation and monitoring were substantiated, offering valuable insights into the viscoelastic characteristics of *C. tropicalis* and the processes of cell death induced by APDT.

Índice general

Agradecimientos	i
Resumen	ii
Abstract	iii
Índice general	1
Lista de figuras	3
1.Introducción.....	9
1.1 Antecedentes	9
Justificación	11
Problema general	12
Objetivo general	12
Objetivos específicos	12
Guía del documento	13
2. Marco Teórico	15
2.1 Terapia fotodinámica.....	15
2.1.1 Fotosensibilizador.....	16
2.1.2 Funcionamiento de la TFD	16
2.1.3 Ventajas de la TFD.....	17
2.2 Descripción del género <i>Candida</i>	18
2.2.1 <i>Candida</i>	18
2.2.2 Especies de <i>Candida</i>	19
2.2.3 Switching fenotípico	20
2.2.4 Candidiasis en México	21
2.2.5 <i>C. tropicalis</i> en México	23
2.3 Pinzas ópticas.....	24
2.3.1 Historia y aplicaciones	24
2.3.2 Pinzas ópticas utilizadas en células fúngicas.....	27
2.4 Física de las pinzas ópticas	28
2.4.1 Fuerzas de atrapamiento	28
2.4.2 Régimen de rayos ópticos	30
2.4.3 Régimen de Rayleigh.....	32
2.4.4 Régimen generalizado de Lorenz-Mie (RGLM).....	36

2.5 Fuerzas en la trampa óptica: estimación experimental	38
2.6 Métodos de calibración	41
2.6.1 Calibración pasiva	45
3. Metodología	47
3.1 Material biológico.....	47
3.1.1 Medio de cultivo y soluciones	47
3.2 TFDA convencional.....	50
3.3 Análisis en pinzas ópticas	52
3.3.1 Para TFDA convencional:	56
3.3.2 TFDA <i>in situ</i> :	59
4. Resultados	61
4.1 TFDA convencional.....	61
4.2 Muestreo control utilizando PO.....	63
4.3 Medición de las propiedades mecánicas de <i>C. tropicalis</i> después de ser sometidas a la TFDA con diodos LED.....	66
5. Discusión.	75
6. Conclusiones	79
7. Trabajo futuro	80
8. Bibliografía	81
9. Apéndice.....	86
Protocolo: Inactivación fotodinámica con PO	86

Lista de figuras

Figura 2. 1. Diagrama de Jablonski. Esquema donde se ven involucrados diferentes procesos dentro de la TFD. (Aires, 2022). _____ 17

Figura 2. 2. Morfología de especies de candida. a) *C. tropicalis* observada bajo el microscopio a 40X. b) Colonias de *C. tropicalis* creciendo sobre medio de cultivo SDA. _____ **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 2. 3. Imagen de levaduras de *C. albicans* (a) y *C. tropicalis* (b) bajo el microscopio a un aumento 40x _____ 19

Figura 2. 4. Morfologías celulares del aislado clínico *C. tropicalis*. Se observan células blancas (a) y células opacas (b) tomado de (Proo., 2017). **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 2. 5. Distribución de frecuencia de especies de *Candida* causantes de candidiasis invasora en México (del Rocío Reyes-Montes, 2017). _____ 21

Figura 2. 6. Manifestaciones clínicas de la candidiasis superficial en pacientes de México, tomado de (del Rocío Reyes-Montes, 2017). _____ **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 2. 7. Diagrama de las fuerzas involucrado en las pinzas ópticas en donde la partícula (azul) se comporta como un oscilador armónico. _____ 28

Figura 2. 8. Comparación entre los tres regímenes. En el régimen de Rayleigh el diámetro de la partícula es menor a la longitud de onda, caso contrario en el régimen de rayos ópticos y el régimen central se caracteriza por que las dimensiones entre la partícula y la longitud de onda son similares. _____ **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 2. 9. Momento propagado a través de una esfera. a) Rayo con momento P a través de una esfera con índice mayor al medio en el que P_1 es el momento reflejado en la primer interfaz y P_2 corresponde al momento que sucede después de la reflexión en la segunda interfaz. b) Cambio de momento del rayo, en verde, el cambio en la esfera tiene la misma escala que el verde, pero en dirección opuesta de acuerdo con la tercera ley de Newton. _____ 30

Figura 2. 10. Esquema de fuerzas sobre la partícula Si los rayos r_1 y r_2 pasan a través de una lente para enfocar el haz, entonces surgirá una fuerza F_g que atrae a la partícula hacia la zona de enfoque, es decir, hacia la cintura del haz y a la vez es empujada por la fuerza de esparcimiento F_e en la dirección de propagación. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 2. 11. Geometría utilizada para el análisis de fuerzas en el régimen de Rayleigh. Donde n_2 corresponde al índice r es el radio de la partícula, n_1 al índice del medio, d es la distancia desde w_0 . La polarización se encuentra en dirección al eje x y la propagación del haz es en dirección al eje z . _____ 33

Figura 2. 12. Perfil de la intensidad del haz y su derivada. En verde, se resalta la región de atrapamiento. La pendiente de esta región está directamente relacionada con la rigidez: cuanto mayor sea esta, mayor será la rigidez de la trampa. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 2. 13. La rigidez de la PO permite que la partícula atrapada (círculo azul) se comporte como un oscilador armónico, donde experimenta una fuerza de restauración proporcional a su desplazamiento desde la posición de equilibrio en la trampa que corresponde al centro de ella. _____ **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 2. 14. Movimiento Browniano de la partícula y la señal (cuadro azul) que registra el fotodetector de las PO. _____ 39

Figura 3. 1. Dispositivo para TFDA. Se observa la vista posterior del dispositivo con los LEDs arreglados en filas y columnas adecuados para su uso en microplacas de 96 pozos y la distribución de irradiación en la microplaca. _____ 48

Figura 3. 2. a) Esquema del procedimiento para crear la solución base . b) Formación de biopelículas. _____ 48

Figura 3. 3. Configuración en la microplaca para la aplicación de TFDA, con los respectivos controles. _____ 50

Figura 3. 4. Aplicación de TFDA. Se observa un ejemplo de la aplicación de TFDA sobre la placa con las distribución de la Figura 3.3, sin C y CT. _____ 51

Figura 3. 5. Software utilizado para la calibración del haz. a) Se encuentran las posiciones del láser de detección dentro del recuadro rojo, en la parte azul las posiciones marcadas como iniciales. _____ 52

Figura 3. 6. Detección de la posición de la partícula en el plano de atrapamiento. Específicamente, los desplazamientos x y y se miden respecto al centro del detector de cuadrante como se presenta, donde A, B, C y D son las señales generadas a partir de cada uno de los cuatro cuadrantes. _____ 53

Figura 3. 7. Imágenes del láser de atrapamiento y detección para la calibración del haz. b) Se observa el láser de atrapamiento alineado con el láser de detección para el

<i>monitoreo de las posiciones de los organelos atrapados y en el recuadro c) se observa el perfil del haz de atrapamiento.</i>	53
<i>Figura 3. 8. Grafica proporcionada por el software TweezPal que representa las trayectorias de las partículas en la coordenada x e y.</i>	54
<i>Figura 3. 9. Histograma de las posiciones de las partículas.</i>	55
<i>Figura 3. 10. El potencial de atrapamiento (en unidades de kBT)</i>	55
<i>Figura 3. 11. Seguimiento de controles puntos la levadura de <i>C. tropicalis</i> a analizar no cuenta con FS ni fue radiada con luz roja (círculo rojo) los atrapa el organelo (cruz azul) con las PO mientras se realiza el monitoreo</i>	56
<i>Figura 3. 12. Esquema de las componentes de la celda con la muestra de <i>C. tropicalis</i> con TFDA.</i>	56
<i>Figura 3. 13. Sistema de pinzas ópticas. Instrumento utilizado para los experimentos en PO (a) así como el esquema de este. Adaptado de (Torres, 2016).</i>	57
<i>Figura 3. 14. Esquema del atrapamiento para un organelo con el sistema de PO. Ejemplo de la células de <i>C. tropicalis</i> (a) observadas en el sistema.</i>	58
<i>Figura 3. 15. Metodología para la aplicación de TFDA in situ. En este caso después de la incubación en el paso 5 se colocan 30 μl sobre la celdilla y se analiza el movimiento de un organelo atrapado por las PO mientras se aplica TFDA con el láser de detección.</i>	59
<i>Figura 4. 1. Porcentaje de UFC de los grupos evaluados sobre <i>C. tropicalis</i> tipo con AM al 10 μM e irradiación de 60 J/cm². Se presentan para cada uno de los grupos los valores de las medias y desviaciones estándar. Así como diferencias significativas ($p < 0.05$) en las comparaciones del grupo de tratamiento con el control de luz y TFDA.</i>	61
<i>Figura 4. 2. Placas Petri con 24 h de crecimiento posteriores a la aplicación de TFDA. Resultados de UFC de <i>C. tropicalis</i>, donde C corresponde a un ejemplo de las colonias obtenidas en el control, CL al control de luz, CT el control de toxicidad y TFDA los resultados de la aplicación del tratamiento.</i>	62
<i>Figura 4. 3. Valores de la rigidez en el tiempo para las coordenadas x y y para ambos métodos. Estos valores representan los controles para <i>C. tropicalis</i>, es decir sin FS.</i>	63
<i>Figura 4. 4. Valores promedio para los controles de <i>C. tropicalis</i> utilizando el método de equipartición y la estadística de Boltzman para ambas coordenadas.</i>	64

Figura 4. 5. Las siguientes fotografías muestran el seguimiento visual de los controles de *C. tropicalis* utilizando un láser de detección con una potencia de 1 mW y un láser de atrapamiento con una potencia de salida del 20%. En el círculo se encuentra la célula analizada y la flecha verde señala el organelo atrapado utilizando el sistema de pinzas ópticas. No se aprecian cambios significativos en la morfología interna de la célula tratada. _____ 65

Figura 4. 6. Valores promedios obtenidos para la rigidez una vez aplicada TFDA a *C. tropicalis*, mediante el método de equipartición y estadística de Boltzman para la coordenada en x. Se observa un aumento gradual en la rigidez a medida que transcurre el tiempo después del tratamiento (ajuste lineal en verde). _____ 66

Figura 4. 7. Valores promedios obtenidos para la rigidez una vez aplicada TFDA a *C. tropicalis*, mediante el método de equipartición y estadística de Boltzman para la coordenada en y. Se observa un aumento gradual en la rigidez a medida que transcurre el tiempo después del tratamiento (ajuste lineal en verde). _____ 67

Figura 4. 8. La gráfica muestra los pozos de energía potencial obtenidos a partir de la rigidez utilizando el método del teorema de equipartición para la coordenada y. Podemos observar un aumento en la energía potencial a medida que transcurre el tiempo después de la aplicación de TFDA, destacado por la flecha negra en la gráfica. _____ 68

Figura 4. 9. La gráfica muestra los pozos de energía potencial obtenidos a partir de la rigidez utilizando el método del teorema de equipartición para la coordenada x. Podemos observar un aumento en la energía potencial a medida que transcurre el tiempo después de la aplicación de TFDA, destacado por la flecha negra en la gráfica. _____ 68

Figura 4. 11. Seguimiento visual de célula de *C. tropicalis* posterior a la aplicación de TFDA . En las imágenes se puede apreciar la célula monitoreada, destacada por el círculo rojo, mientras que el organelo atrapado se muestra mediante una flecha verde. Además, se observan cambios morfológicos identificados por las flechas naranjas a partir de los 90 minutos. _____ 70

Figura 4. 10. En las siguientes fotografías se presenta la secuencia de aplicación de TFDA en una hifa de *C. tropicalis*. La región monitoreada está destacada por un óvalo rojo, mientras que el organelo atrapado se indica con una flecha amarilla a lo largo de todo el experimento. Se puede observar un cambio en la morfología interna a partir de los 90 min, evidenciado por las flechas naranjas. _____ 70

Figura 4. 12. Análisis de TFDA insitu en células de C. tropicalis. La célula tratada está representada en color rojo, el organelo atrapado se indica con una flecha amarilla y la célula de referencia está encerrada por un círculo verde. _____ 71

Figura 4. 13. Análisis de TFDA insitu en células de C. tropicalis durante 1 min de irradiación. La célula tratada está representada en color rojo, el organelo atrapado se indica con una flecha amarilla y la célula de referencia está delimitada por el círculo verde. _____ 72

Figura 4. 15. Grafica de los valores de la rigidez posterior a la aplicación de TFDA con el láser de detección durante 10 segundos utilizando el método de la estadística de Boltzman. Se pueden identificar tres regiones distintas: una fluctuación inicial (A-B), un incremento notable (B-C) y una estabilización en un nivel constante al igual que en el caso anterior. _____ 73

Figura 4. 14. Grafica de los valores de la rigidez posterior a la aplicación de TFDA con el láser de detección durante 10 segundos. Se identifican tres regiones: fluctuación inicial (A-B), incremento marcado (B-C) y estabilización en un nivel constante. Estos cambios representan la evolución de la rigidez a lo largo del tiempo y se analizaron mediante el método del teorema de equipartición. _____ 73

Figura 4. 16. Análisis de TFDA insitu en células de C. tropicalis durante 10 s de irradiación continua. La célula tratada está representada en color rojo, el organelo atrapado se indica con una flecha amarilla, las células que fueron tomadas como referencia están señaladas por las flechas verdes y las estructuras que limitaron el movimiento de los organelos están marcadas por las flechas azules. _____ 74

Lista de tablas

Tabla 4. 1. Valores de la rigidez para los controles de C. tropicalis. 64

1.Introducción

1.1 Antecedentes

La luz es un elemento esencial para la vida en la Tierra. Se puede observar cómo la presencia del sol tiene una influencia directa en los organismos vivos y cómo ellos responden a la luz solar. Uno de los procesos más evidentes es la fotosíntesis, donde las plantas convierten la energía lumínica en energía química y liberan oxígeno como subproducto de la combinación de agua y dióxido de carbono (Ort, 1996).

La forma en que los ojos humanos interpretan el entorno es un proceso complejo que involucra la capacidad de las células sensibles a la luz para detectar la luz y enviar señales eléctricas a nuestro cerebro. La luz es enfocada por el cristalino, lo que permite que tengamos una imagen clara y detallada (Yarbus, 2013). Esta capacidad visual es esencial para nuestra supervivencia y nos permite tener una comprensión completa de nuestro entorno.

La interacción entre la luz y los materiales biológicos es estudiada por una rama innovadora de la óptica llamada biofotónica. Esta área de investigación es multidisciplinaria, ya que combina diferentes conocimientos para analizar células, moléculas y tejidos mediante tecnologías basadas en la luz.

Por ejemplo, una de las aplicaciones más recientes de la biofotónica es la terapia fotodinámica (TFD), la cual utiliza luz, un fotosensibilizador (FS) y oxígeno para tratar enfermedades como el cáncer. Aunque su uso se remonta a civilizaciones antiguas como los griegos, hindúes o egipcios, la TFD se ha empleado en hospitales desde los años 70, principalmente para tratar tumores superficiales muy localizados.

La terapia fotodinámica antimicrobiana (TFDA) es una adaptación de la TFD, que se ha desarrollado específicamente para combatir infecciones causadas por bacterias y hongos. Esta terapia se presenta como una estrategia prometedora en la lucha contra las infecciones resistentes a los antibióticos y ofrece nuevas alternativas terapéuticas en el campo de la microbiología clínica.

Desde su creación, la biofotónica ha tenido un gran impacto en la comprensión de los procesos y fenómenos biológicos, lo que ha impulsado la aplicación de la óptica en la

biotecnología. Esta disciplina ha permitido desarrollar herramientas avanzadas para detectar y tratar enfermedades con mayor eficiencia.

Entre ellas, destacan las técnicas de espectroscopía Raman, la microscopía avanzada y los sistemas de obtención de imágenes como la tomografía óptica coherente, desarrollada en el MIT (1991). Sin embargo, nuestro mayor interés se centra en las pinzas ópticas (PO), implementadas por el científico Arthur Ashkin en los laboratorios Bell a partir de 1970 (Ashkin A. , Acceleration and trapping of particles by radiation pressure., 1970).

Las PO son dispositivos que permiten la captura y manipulación de micropartículas mediante el uso de un haz de luz altamente enfocado generado por un objetivo de microscopio. Desde su creación se han utilizado en la manipulación de células (Dziedzic, 1986), moléculas, virus y bacterias (Ashkin & Dziedzic, 1987). Su principal ventaja es que permiten manipular y desplazar las micropartículas sin causarles daño.

Este trabajo se enfocó en técnicas de manipulación y captura con PO para el estudio de las propiedades viscoelásticas de las células de *C. tropicalis*, una vez finalizada la TFDA. Así mismo, se analizaron los efectos y aplicaciones de PO en la TFDA *in situ*.

Justificación

El estudio de las propiedades celulares, una vez aplicada la TFDA, plantea un desafío importante debido a la necesidad de examinar las células de manera individualizada y en tiempo real durante el proceso de muerte celular. La manipulación de las células en muestras colectivas requiere el desarrollo de nuevas técnicas que permitan un análisis más detallado y específico de cada célula.

Al profundizar en el estudio de las propiedades celulares durante la muerte celular inducida por la TFDA, se podrán identificar cambios clave en la morfología, la rigidez, la viscosidad intracelular y otros aspectos que puedan influir en la efectividad del tratamiento. Esta información ayudará a optimizar las estrategias terapéuticas, permitiendo un abordaje más preciso y personalizado en el combate de infecciones fúngicas y bacterianas.

De esta manera, investigar a fondo las propiedades celulares tras la aplicación de TFDA no solo brindará una comprensión más profunda de los cambios celulares inducidos por este tratamiento, sino que también sentará las bases para futuras investigaciones y mejoras en el campo de la biofotónica. Esto representaría un acercamiento en la mejora de tratamientos tradicionales y al avance de la terapia fotodinámica antimicrobiana en general.

Problema general

El uso de la TFDA ha demostrado ser prometedora en diversas aplicaciones médicas. Sin embargo, se enfrenta a una limitación significativa: la escasez de técnicas avanzadas para el estudio individual de las células después de someterse a este tratamiento. En particular, la aplicación de pinzas ópticas (PO) en el monitoreo de células fúngicas, como *C. tropicalis*, ha sido poco explorada hasta la fecha. El uso de PO para la manipulación y captura de células después del tratamiento podría proporcionar valiosa información sobre las propiedades viscoelásticas y mecánicas de *C. tropicalis*. Es necesario seguir investigando y desarrollando tecnologías que aborden esta limitación y permitan maximizar la eficacia de la TFDA en el futuro.

Objetivo general

- Evaluar las propiedades viscoelásticas y el efecto de TFDA de manera convencional e *in situ* en células de *C. tropicalis* mediante el uso de PO.

Objetivos específicos

- Optimizar un protocolo para la aplicación de TFDA *in situ* y el análisis en células individuales de *C. tropicalis* empleando PO.
- Evaluar la elasticidad intracelular de *C. tropicalis* a través de PO después de aplicada la TFDA.
- Monitorear la muerte celular de *C. tropicalis* a través de las propiedades viscoelásticas del citoplasma en un período de tiempo determinado.

Guía del documento

Los capítulos de este documento están organizados de la siguiente manera:

El Capítulo 1 aborda la terapia fotodinámica, las pinzas ópticas y proporciona una breve introducción al tema principal del trabajo, que se centra en las técnicas de manipulación y captura con PO para estudiar las propiedades viscoelásticas de las células de *C. tropicalis* después de la TFDA.

El Capítulo 2 explora el fundamento de la TFD, que utiliza la combinación de fotosensibilizadores y luz para inducir efectos tóxicos en microorganismos, y se introduce el uso de las pinzas ópticas como herramienta valiosa para el estudio de la respuesta celular los estudios realizados con TFDA. Se mencionan los antecedentes de las pinzas ópticas y una revisión de investigaciones previas en células fúngicas.

El Capítulo 3 describe detalladamente la metodología implementada para el estudio de TFDA en células de *C. tropicalis*. Se explica el uso del azul de metileno como colorante fotosensibilizador y el láser He-Ne como fuente de luz para irradiar las muestras con una longitud de onda específica. Además, se detallan los procedimientos empleados para el análisis mediante pinzas ópticas, incluyendo el seguimiento de la respuesta celular en términos de cambios morfológicos y rigidez.

El Capítulo 4 se enfoca en el análisis de los efectos producidos por la TFDA en las células de *C. tropicalis*. Se presentan los resultados obtenidos de manera convencional, es decir, mediante técnicas tradicionales de evaluación de la terapia, y se comparan con los resultados posteriores a la aplicación del tratamiento y analizados mediante pinzas ópticas.

Este capítulo resalta cómo la combinación de estas dos técnicas permite una mejor comprensión de los cambios celulares inducidos por la terapia fotodinámica, especialmente en términos de rigidez celular y viscosidad intracelular. Además, se exploran los efectos de la terapia *in situ*, es decir, cuando la aplicación de TFDA y la manipulación con pinzas ópticas se realizan simultáneamente, lo que ofrece una perspectiva innovadora para estudiar la respuesta celular en condiciones más cercanas a la realidad biológica.

El Capítulo 5 presenta las conclusiones generales de los resultados obtenidos en los Capítulos 2, 3 y 4, destacando los hallazgos más significativos y su relevancia en el contexto de la TFDA y el estudio de células de *C. tropicalis*. Se resumen los avances logrados en el campo de las pinzas ópticas y su aplicación en el estudio de la respuesta celular ante la terapia. Además, se mencionan posibles trabajos futuros, enfocados en continuar explorando la interacción célula-tratamiento mediante técnicas ópticas avanzadas y en ampliar el espectro de microorganismos estudiados.

Por último, el documento incluye una sección de Apéndices que describe los protocolos utilizados para la aplicación de la TFDA en las pinzas ópticas.

En conjunto, esta investigación representa un avance significativo en el campo de la TFDA y el uso de pinzas ópticas como herramienta valiosa en el estudio de células fúngicas, ofreciendo nuevas perspectivas para futuros avances en estudios de mecánica celular.

2. Marco Teórico

2.1 Terapia fotodinámica

La TFD ha experimentado un rápido desarrollo, en el lapso de casi medio siglo desde la década de 1970, coincidiendo con la invención del láser y su uso en el ámbito médico. Aunque sus fundamentos se remontan a la antigüedad, el término "efecto fotodinámico" fue acuñado en el siglo XX al estudiar la toxicidad del compuesto acridina sobre organismos unicelulares por parte de Hermann Von Tappeiner y Oscar Rabb (Castano, 2004). Ellos encontraron que la toxicidad de la acridina variaba dependiendo de la hora del día, ya que las muestras se mantuvieron cerca de una ventana por la cual entraba la luz, es decir, la efectividad se vio influenciada por el nivel de iluminación al que estuvieron expuestas las muestras durante el día. En 1905 por primera vez se aplicó la TFD por Tappeiner (Tappeiner, 1909) en el tratamiento de cáncer de piel mediante la aplicación tópica de eosina al 1% e irradiación con luz blanca.

Actualmente su uso no se restringe al tratamiento de cáncer, sino también a distintas enfermedades de la piel como acné, queratosis actínicas y algunos tipos de carcinoma basocelular (Babilas, 2010).

La TFD requiere tres componentes esenciales para funcionar correctamente: un fotosensibilizador, la longitud de onda adecuada y la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) que conducen a la muerte celular. Esta técnica médica se basa en la administración de un fotosensibilizador, que se acumula en las células anormales, seguido de una exposición a una fuente de luz específica que activa el compuesto. Este proceso genera EROs que destruyen las células, permitiendo un tratamiento efectivo y mínimamente invasivo de distintos tipos de enfermedades.

La TFDA es una variante de la TFD que se caracteriza por centrarse en el estudio y el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos patógenos, como bacterias, hongos y virus, Este enfoque terapéutico emplea la acción combinada de la luz y un fotosensibilizador para combatir diversas infecciones, como infecciones cutáneas, así como dentales, periodontales y del tracto respiratorio (Ion, 2007).

2.1.1 Fotosensibilizador

Los agentes fotosensibilizadores son moléculas capaces de absorber fotones, lo que origina que la molécula pase del estado base al estado excitado, y eventualmente a un estado excitado de tiempo de vida largo, donde puede presentar citotoxicidad generando EROs que conducen a la muerte celular (Castano, 2004).

En 1990, Moan estableció las características que debe de tener un FS ideal:

- Pureza química.
- Acumulación específica en el tejido neoplásico.
- Intervalo corto de tiempo entre la administración de la sustancia y la acumulación máxima en el tumor (o tejido).
- Vida media corta y rápido aclaramiento del tejido sano.
- Activación de longitud de onda con óptima penetración tisular.
- Alta capacidad de producción de oxígeno singulete.
- Carecer de toxicidad en ausencia de luz.

Los FSs en presencia de luz y oxígeno molecular dan origen principalmente a aniones superóxido y a oxígeno singulete. Estos compuestos altamente reactivos, pueden producir daño donde quiera que se haya adherido.

Para aplicaciones antimicrobianas se han sintetizado FS derivados de las fenotiazinas como el azul de metileno, el cual presenta una alta absorción dentro del rango del espectro rojo ($\lambda = 600 - 680 \text{ nm}$). Tienen carga positiva y es capaz de producir EROs (reacciones tipo I) a través de la absorción de fotones, y producir oxígeno singulete (reacciones tipo II).

2.1.2 Funcionamiento de la TFD

La TFD se da en etapas. Primero se aplica el fotosensibilizador en la zona de interés ya sea mediante aplicación tópica o por vía intravenosa. Una vez que el FS se encuentra en la célula o el tejido, es activado al absorber un fotón con energía $E = \hbar\nu$ (donde \hbar es la constante de Planck y ν es la frecuencia de la radiación electromagnética). La absorción del fotón excita el cromóforo del estado fundamental (S_0) a un orbital de mayor energía de corta duración (S_n) compuesto a su vez de subniveles vibracionales (S_n'). El cromóforo en estado excitado puede perder energía y decaer a través de subniveles para alcanzar el

primer estado singlete excitado S_1 , antes de volver rápidamente al estado fundamental mediante fluorescencia. Alternativamente, un electrón en el estado S_1 puede sufrir una inversión de espín y pasar al primer estado de triplete excitado (de menor energía que S_1) T_1 .

El estado T_1 puede decaer al estado S_0 a través de la fosforescencia (Figura 2.1). Debido a que el tiempo de vida del estado triplete es mucho más grande que la fluorescencia, el electrón en el estado T_1 puede interactuar con el oxígeno del medio ambiente para iniciar producir radicales libres que inducen muerte celular (Aires, 2022).

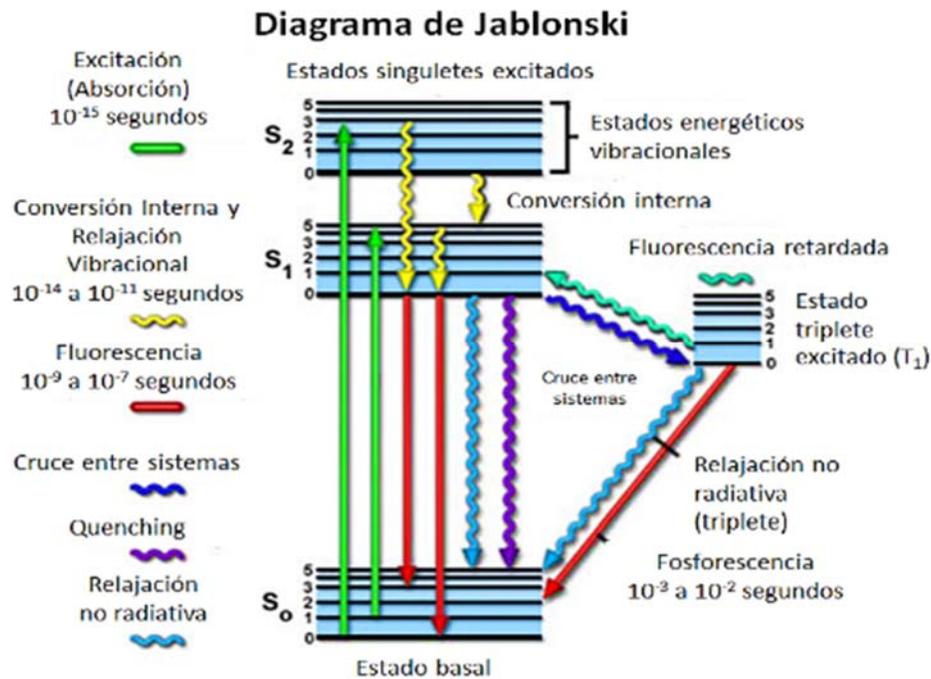


Figura 2. 1. Diagrama de Jablonski. Esquema donde se ven involucrados diferentes procesos dentro de la TFD. (Aires, 2022).

2.1.3 Ventajas de la TFD

La aplicación de TFD presenta muchas ventajas, lo que la convierte en una opción atractiva para el tratamiento de enfermedades de la piel y otras afecciones.

Entre sus ventajas, destaca su carácter no invasivo, lo que significa que no requiere incisiones o anestesia general. Esto la hace más segura y menos dolorosa a comparación de otros tratamientos. Otra de ellas es que resulta muy efectiva en el tratamiento de enfermedades de la piel, además que, a diferencia de otras opciones de tratamiento, la TFD no requiere un período prolongado de recuperación. Después de la sesión, los

pacientes pueden volver a sus actividades normales de inmediato y sin efectos secundarios graves: la diferencia es que algunos pacientes pueden experimentar un poco de enrojecimiento y picazón después de la sesión, pero estos síntomas desaparecen generalmente dentro de unos pocos días (Silva J. N., 2006).

2.2 Descripción del género *Candida*

2.2.1 *Candida*

El género *Candida* pertenece al orden *Saccharomycetales*, corresponde a un hongo levaduriforme y actualmente es una de las causas más comunes de infecciones fúngicas establecidas en la mayor parte del mundo (Thompson, 2011).

Las levaduras de este género crecen en temperaturas dentro del rango de 20 a 40 °C. Son caracterizadas por producir gemación y además de presentarse en células de forma cilíndricas, ovoide o incluso algunas elongadas, estas llegan a formar cadenas cortas de levaduras, llamadas pseudohifas y posteriormente hifas (Thompson, 2011). Los tamaños de estas van de los 3 a los 7 μm . Las colonias (Figura 2.2) generalmente son de color blanco, cremosas, brillantes, planas o sobresalientes, redondeadas y de bordes bien definidos además de un olor característico (Proo., 2017).

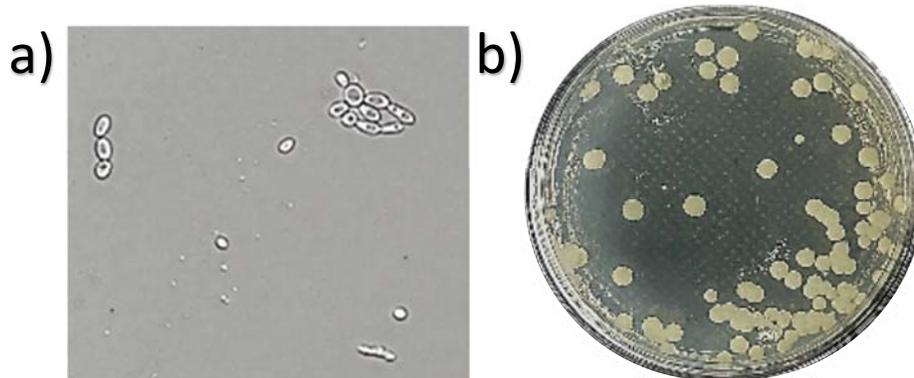


Figura 2. 2. Morfología de especies de *candida*. a) *C. tropicalis* observada bajo el microscopio a 40X. b) Colonias de *C. tropicalis* creciendo sobre medio de cultivo SDA.

Este hongo se encuentra en la mayoría de las superficies, en los humanos las levaduras del género *Candida* forman parte de la microbiota del aparato digestivo y las encontramos en las superficies de las mucosas como la piel, orofaringe y vagina. La mayoría de las especies pertenecientes a este género se conocen como oportunistas, representan variantes inofensivas, pero cuando las barreras de cada mucosa se ven rasgadas o el sistema

inmunitario se ve comprometido por alguna enfermedad inmunodepresora pueden invadir y causar enfermedades, como la candidiasis (Cárdenes Perera, 2000).

Candida sp. puede infectar a sus huéspedes de dos formas diferentes: la primera de ellas es a través de una infección endógena, en este caso se produce un cambio en la relación entre la levadura y el individuo a partir de la propia microbiota de este y la segunda es a través de una transmisión exógena por contacto con fuentes externas.

2.2.2 Especies de *Candida*

Existen más de 20 especies de *Candida* que pueden causar candidiasis.

La principal especie corresponde a *C. albicans*, la cual es responsable de la mayoría de las infecciones del torrente sanguíneo, se encuentra presente en personas sanas y distribuida en todo el mundo. Sin embargo, hay una incidencia cada vez mayor de infecciones causadas por *C. glabrata* y *C. tropicalis* (Antunes & Maenza, 2004)

El predominio de las especies puede variar según la región y el tipo de infección. A lo largo del continente americano se observa un claro predominio de *Candida glabrata* en el norte, en cambio en la parte sur se puede observar principalmente casos de *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis* (Figura 2.3). Algunas otras especies que ocasionan esta enfermedad son *Candida dubliniensis*, *Candida lusitaniae*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr* y *Candida krusei*. A pesar de que su incidencia es baja el grado de resistencia a algunos tratamientos antifúngicos las pone en la mira de los médicos e investigadores en el ámbito de la salud pública (Quindós, 2018).

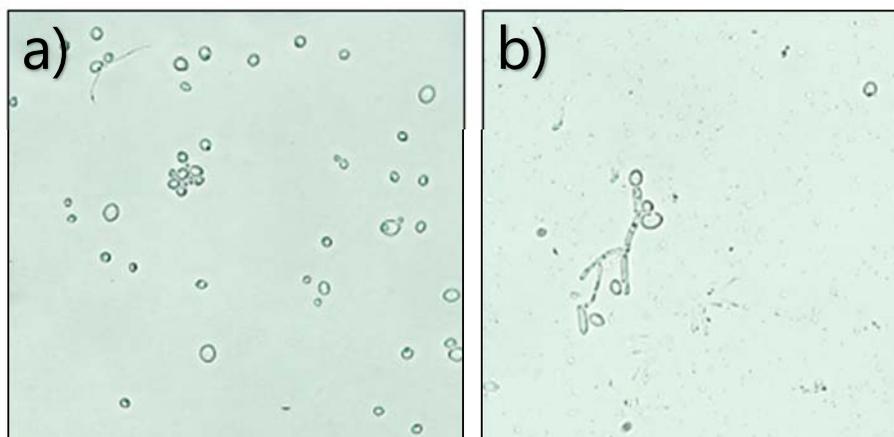


Figura 2. 3. Imagen de levaduras de *C. albicans* (a) y *C. tropicalis* (b) bajo el microscopio a un aumento 40x.

2.2.3 Switching fenotípico

El switching fenotípico es un proceso biológico característico del género *Candida*, en el que las células pueden cambiar su forma y función de una forma reversible, en respuesta a estímulos ambientales o señales internas (Sueli Fumie Yamada-Ogatta, 2016). Este proceso es importante para la adaptación de los hongos a diferentes ambientes y para su capacidad de causar infecciones.

Se cree que estos cambios fenotípicos están estrechamente relacionados con la virulencia de las levaduras, en especial para *C. albicans* y *C. tropicalis* ya que poseen la capacidad de cambiar entre diferentes formas fenotípicas cuando se encuentran en humanos (Huang G. , 2012).

El sistema de conmutación fenotípica, la transición blanco-opaca, ha sido ampliamente investigada durante la última década. Los fenotipos blancos y opacos (Figura 2.4) son hereditarios y muestran diferentes apariencias celulares y de colonias, capacidad de apareamiento y virulencia (Soll, 2009). Los glóbulos blancos son relativamente redondos y forman colonias hemisféricas lisas en medios sólidos, mientras que las células opacas son grandes y alargadas y forman colonias planas y grises u "opacas" (Anderson, 1987).

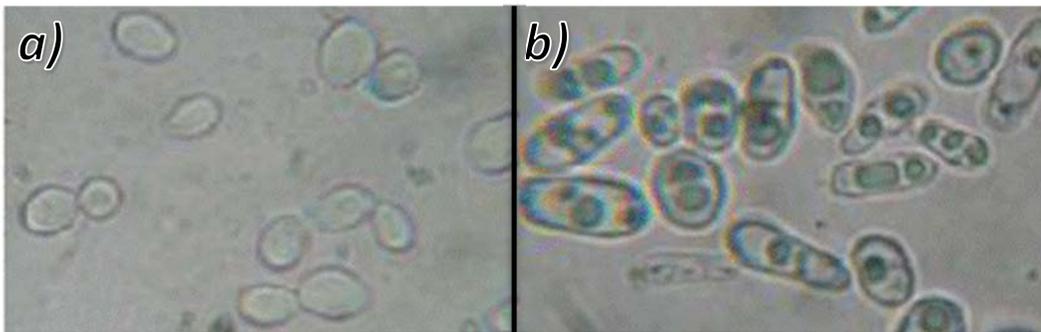


Figura 2. 4. Morfologías celulares del aislado clínico *C. tropicalis*. Se observan células blancas (a) y células opacas (b) tomado de (Proo., 2017).

Las células blancas y opacas también difieren en virulencia. Por ejemplo, en un estudio realizado por Huang et al. (2012), encontraron que las células blancas son muy virulentas en un modelo de infección sistémica de ratón y pueden colonizar rápidamente los riñones del huésped. Por el contrario, las células opacas tienen poca capacidad para colonizar los órganos internos del huésped, pero son mejores en la infección cutánea.

2.2.4 Candidiasis en México

C. albicans ha sido considerada la especie predominante encontrada en las infecciones del torrente sanguíneo. Sin embargo, en las últimas dos décadas, ha habido una tendencia creciente de infecciones causadas por otras especies del género, como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. famata*, *C. lusitaniae*, *Candida lambica*, *Candida zeylanoides*, *Candida africana* y *C. guilliermondii*.

Este aumento en las especies de *Candida* se atribuye al uso indiscriminado de antifúngicos y al incremento de trasplantes de órganos y terapia antibacteriana de amplio espectro.

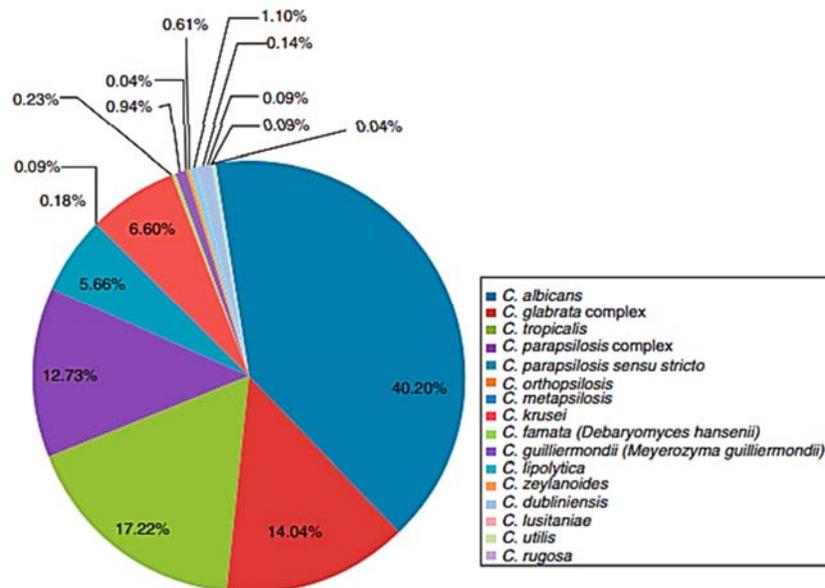


Figura 2. 5. Distribución de frecuencia de especies de *Candida* causantes de candidiasis invasora en México (del Rocío Reyes-Montes, 2017).

Se realizó una revisión sistemática de la literatura médica publicada entre 2005 y 2015 para determinar la prevalencia de la candidiasis superficial e invasiva en México (del Rocío Reyes-Montes, 2017), así como la susceptibilidad de las especies de *Candida* a los antifúngicos. Los hallazgos revelaron que la forma clínica más común de candidiasis superficial es la genital, seguida de la candidiasis bucal, onicomicosis y, finalmente, las infecciones cutáneas. Estos datos corresponden a los estados: Ciudad de México, Puebla, Yucatán, San Luis Potosí, Nuevo León y Veracruz (Figura 2.5).

En cuanto a la candidiasis invasiva, 15 publicaciones reportaron 2184 casos. Las poblaciones afectadas incluyeron neonatos y pacientes pediátricos, trasplantados, pacientes con fiebre de origen desconocido, pacientes con infección del torrente, entre otros. Los reportes encontrados fueron de Nuevo León, Guadalajara, Durango, Morelia, Sonora, Sinaloa, Coahuila, Estado de México y Tamaulipas (del Rocío Reyes-Montes, 2017).

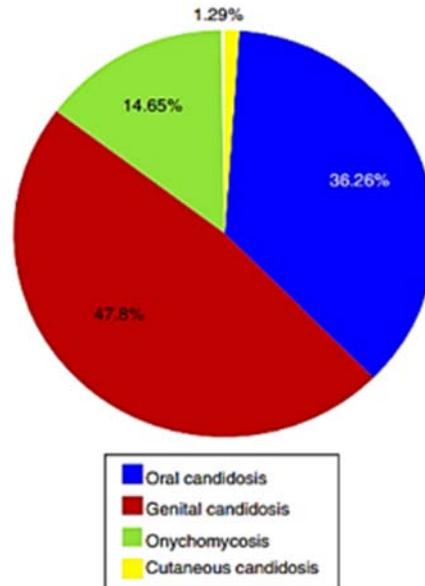


Figura 2. 6. Manifestaciones clínicas de la candidiasis superficial en pacientes de México, tomado de (del Rocío Reyes-Montes, 2017).

La principal especie asociada a la candidiasis invasora fue *C. albicans* (40,2%), seguida de *C. tropicalis* (17,22%), *C. glabrata complex* (14,04%), *C. parapsilosis complex* (12,73%), *C. krusei* (6,6%), *C. parapsilosis sensu stricto* (5,66%), *C. guilliermondii* (0,94%), *C. zeylanoides* (0,61%), *C. famata* (0,23%), *C. orthopsilosis* (0,18%), *C. lusitaniae* (0,14%), *C. utilis* (0,09%), *C. metapsilosis* (0,09%), *C. rugosa* (0,09%), *C. lipolytica* (0,04%) y *C. boidinii* (Figura 2.6) (del Rocío Reyes-Montes, 2017).

La identificación de especies del género *Candida* se realiza fácilmente mediante métodos fenotípicos y moleculares basados en características morfológicas y fisiológicas. Las especies del género son células vegetativas que se reproducen asexualmente por gemación.

Algunos estudios, como el realizado por Y. Chan et al. (2003), han señalado la terapia fotodinámica como una alternativa de tratamiento para diversas enfermedades

infecciosas. Sin embargo, existen numerosas variables que pueden influir en la cantidad de microorganismos afectados por esta técnica, como el tipo y concentración del fotosensibilizador, la etapa fisiológica del microorganismo, el período de incubación del fotosensibilizador antes de la irradiación, el tiempo de exposición y la densidad de energía láser, como menciona Wilson et al. (1993).

2.2.5 *C. tropicalis* en México

C. tropicalis es una levadura con forma redonda a ovalada que oscila entre aproximadamente entre los 2 y 10 μm . Las colonias son blancas, lisas y butirosas con un borde con flecos (Silva S. N., 2012)..

La incidencia de *C. tropicalis* en México no está claramente documentada, pero algunos estudios han reportado una alta prevalencia de esta especie en pacientes con candidemia, una infección grave que se produce cuando las levaduras de *Candida* entran al torrente sanguíneo (Franco-Curiel, 2018).

En México, la candidiasis es una de las infecciones fúngicas más frecuentes en pacientes con VIH, aunque también se presenta en pacientes no VIH, incluyendo pacientes hospitalizados.

2.3 Pinzas ópticas

Las PO, también conocidas como trampas ópticas, fueron desarrolladas por el físico Arthur Ashkin en la década de 1970 y le valió el Premio Nobel de Física en 2018.

Ashkin demostró que la luz podía ejercer una fuerza sobre las partículas microscópicas, permitiendo que se manipularan con precisión y desarrolló una técnica que utilizaba un láser de 5-10 mW para enfocar un haz de luz en una pequeña área, creando una zona de alta intensidad que podía atrapar partículas cercanas a la lente.

Las PO, son herramientas basadas en el uso de un rayo láser de alta intensidad, altamente enfocado, que crea un gradiente de fuerza óptica que permiten la manipulación, el atrapamiento óptico y además la caracterización de una amplia gama de materiales dentro de la escala de mediciones de 10^{-6} a 10^{-9} m.

La teoría del atrapamiento se basa en varios parámetros como lo son: la potencia del láser de atrapamiento, la longitud de onda, la apertura numérica del objetivo del microscopio y también de la forma, el tamaño y el índice de refracción de la partícula atrapada (Deng, 2007). Existen casos en los que se analizan las fuerzas de partículas, ya sea mucho más pequeñas o mucho más grandes que la longitud de onda de captura, los cuales se describen en secciones posteriores.

Actualmente las PO se utilizan en una variedad de aplicaciones, incluyendo la manipulación y medición de propiedades mecánicas de células vivas, la construcción de estructuras microscópicas y la creación de dispositivos (Guo, 2013).

2.3.1 Historia y aplicaciones

Cuando la luz incide sobre un objeto ejerce diferentes tipos de fuerzas, una de ellas es conocida como presión de radiación, y representa la fuerza mecánica ejercida por la luz. Aunque esta fuerza es pequeña, del orden de picoNewtons ($1 \text{ pN} = 1 \times 10^{-9} \text{ N}$), tiene un impacto medible sobre micro objetos. Johannes Kepler (1571-1630) fue el pionero en sugerir esto en 1619, cuando mencionó que la presión de la luz solar desviaba la cola de un cometa, ya que siempre apuntaba en una dirección contraria a la del sol. Sin embargo, más tarde se demostró que la presión de radiación de la luz solar no es lo suficientemente

fuerte, y que en realidad es el viento solar el que empuja hacia afuera los gases y la nube de polvo que rodean al cometa cuando este pasa cerca del sol (Asimov, 1979).

Durante la década de 1870, el físico británico James Clerk Maxwell (1831-1879) desarrolló la teoría electromagnética, en la que demostró que la luz ejerce presión sobre los objetos. Él predijo que hay una presión en la dirección normal a las ondas y que numéricamente es igual a la energía contenida en una unidad de volumen. Sin embargo, la presión predicha era extremadamente pequeña para fuentes de luz ordinarias. En este caso, la presión de radiación sigue siendo insignificante para objetos microscópicos (Sepulveda, 2007).

En determinadas situaciones, la luz puede comportarse como si estuviera compuesta por partículas llamadas fotones. Este concepto proporcionó una comprensión de fenómenos como el efecto fotoeléctrico y la emisión de luz por los cuerpos calientes. Conceptos que no podían ser explicados por la teoría ondulatoria de la luz.

Esta teoría, fue inicialmente propuesta por Max Planck (1858-1947) y posteriormente desarrollada por Albert Einstein (1879-1955), y contribuyó a demostrar que la luz tiene una naturaleza dual, tanto ondulatoria como corpuscular, fue un hito científico que revolucionó nuestra comprensión de la luz.

Cada fotón como partícula individual tiene asociada una propiedad conocida como momento lineal, lo que significa que, en conjunto, los fotones pueden ejercer presión sobre la materia cuando inciden sobre ella. Esta fuerza es evidencia de la naturaleza corpuscular de la luz y proporciona una explicación para el comportamiento observado en diversos experimentos.

En el año 1960, gracias a la invención del láser, se abrieron muchas nuevas posibilidades para observar efectos de la fuerza de la luz. Esto debido a las características únicas del láser, como su alta monocromaticidad y coherencia espacial, que permiten encontrar nuevas aplicaciones dentro de la óptica y contribuyen al desarrollo de nuevas áreas cada vez más vanguardistas y multidisciplinarias.

Unos pocos años después de su invención, se desarrollaron las trampas ópticas y en el año 1970, Ashkin llevó a cabo un experimento para medir la presión de radiación generada por un láser Gaussiano de argón a una longitud de onda de 514.5 nm. Él utilizó microesferas transparentes de látex (para evitar posibles efectos de calentamiento por la

absorción de la luz) suspendidas en agua, las cuales tenían diámetros que variaban desde fracciones de micra hasta unas pocas micras.

Durante el experimento, Ashkin se sorprendió al descubrir que la presión de radiación no solo era capaz de acelerar las partículas en la dirección de propagación del láser, sino que también observó que eran atraídas hacia el centro del haz de luz en la dirección transversal, en donde se encontraba la parte más intensa (Ashkin A. , 1970).

En base a los resultados obtenidos en su experimento, Arthur Ashkin llevó su investigación un paso más allá al desarrollar una técnica revolucionaria. Empleo dos haces de luz propagados en direcciones opuestas a lo largo de un eje horizontal, logrando un equilibrio en las fuerzas ejercidas por cada uno de los láseres.

Este preciso equilibrio, permitió la creación de un punto de atrapamiento óptico donde las partículas quedaban suspendidas. Este hallazgo marcó el inicio de una de las áreas más fascinantes y prometedoras en la ciencia y la tecnología actual: el atrapamiento óptico.

Ashkin y sus colaboradores, publican un artículo en el año de 1986 en que se anuncia la implementación de tal trampa para micropartículas (Ashkin A. D., 1986) utilizando un único haz láser de argón con una longitud de onda de 514.5 nm, el cual fue fuertemente enfocado mediante un objetivo de microscopio de alta apertura numérica. Este haz fue utilizado para capturar partículas suspendidas en agua de tamaños que oscilaban entre 25 nm y 10 μm en tres dimensiones. La única limitante que se presentó en este experimento fue el posible daño que podía sufrir la partícula debido a la alta intensidad en el foco.

Tras el descubrimiento de la capacidad de las PO para manipular partículas, el equipo de Ashkin comenzó a explorar las posibles aplicaciones de esta nueva técnica. En un experimento realizado un año después, se demostró que las PO no solo podían manipular material inanimado, sino también material vivo. Para ello, se utilizó un láser infrarrojo cercano de Nd:YAG de onda continua con una longitud de onda de 1.064 μm . La capacidad de las PO para manipular material vivo ha sido ampliamente utilizada desde entonces en estudios sobre la mecánica celular y la física de la célula, y ha llevado al desarrollo de nuevas técnicas para la terapia celular y la ingeniería de tejidos.

2.3.2 Pinzas ópticas utilizadas en células fúngicas

El atrapamiento óptico presenta las siguientes ventajas sobre los métodos mecánicos más tradicionales de micromanipulación: es mucho menos invasivo y puede causar un daño y estrés insignificantes a las células (Berns M. W., 1991); permite atrapar objetos dentro de células vivas; ofrece un control muy preciso de la posición del objeto manipulado; y permite atrapar o liberar instantáneamente objetos (Wright G. D., 2007).

Las PO han sido utilizadas en una amplia gama de estudios, en diferentes campos de la ciencia, en cuya mayoría de los casos, se utilizan células de origen animal o vegetal y partículas de diferentes materiales, pero hay muy pocos estudios dentro del campo donde se utilicen células fúngicas (Wright G. D., 2005).

Dentro de los estudios con hongos se han utilizado células completas y organelos de la levadura en brote, principalmente de *Saccharomyces cerevisiae* (tipo de levadura utilizado en la fabricación de pan, cerveza y vino), han sido micro manipulados en una variedad de estudios para evaluar diferentes sistemas de PO.

Las PO también se han utilizado de manera más experimental con células de levadura para investigar las propiedades viscoelásticas del citoplasma (Tolić-Nørrelykke, 2004), también para examinar la inhibición del crecimiento de las células de *Hanseniaspora uvarum* (Arneborg, 2005) y para estudiar el crecimiento rápido y responder rápidamente a estímulos se estudian hongos filamentosos como *Neurospora crassa* que a menudo poseen hifas o células grandes (Berns M. W., 1992).

Para aprovechar al máximo su potencial en la investigación científica es necesario comprender las fuerzas involucradas en las PO para realizar mediciones precisas y reproducibles. Esto permite medir las fuerzas aplicadas sobre las partículas o células en estudio y analizar su comportamiento a diferentes estímulos.

2.4 Física de las pinzas ópticas

El atrapamiento de partículas es un fenómeno complejo y multifacético que va más allá de la aplicación de una única fuerza óptica, ya que implica la interacción entre la luz y la partícula. Comprender cómo estas fuerzas interactúan y afectan la partícula es esencial para lograr un control preciso y efectivo del atrapamiento. En este sentido, la transferencia de momento lineal y angular del haz de luz al atrapar la partícula juega un papel clave en este proceso.

2.4.1 Fuerzas de atrapamiento

El proceso de atrapamiento de partículas se logra mediante la interacción de diferentes fuerzas ópticas que actúan sobre ellas. Dos de estas fuerzas son la fuerza gradiente y la presión de radiación.

La presión de radiación surge debido al esparcimiento de la luz reflejada por las partículas atrapadas y provoca una aceleración de las esferas en la dirección de propagación del haz.

Por otro lado, la fuerza gradiente se debe al gradiente de intensidad del perfil del haz gaussiano (Figura 2.7). Esta fuerza atrae a las partículas con un alto índice de refracción hacia la zona de mayor intensidad (el centro del haz), mientras repele a las partículas con un índice de refracción más bajo.

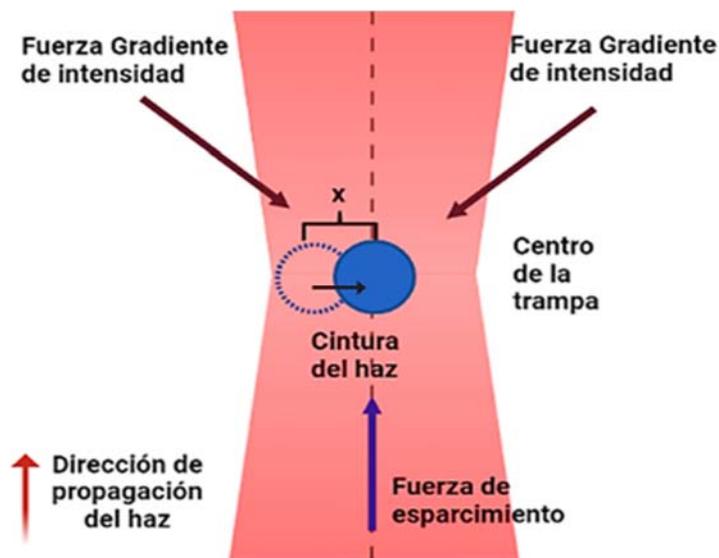


Figura 2. 7. Diagrama de las fuerzas involucrado en las pinzas ópticas en donde la partícula (azul) se comporta como un oscilador armónico.

En consecuencia, si se aplica una fuerza F que aleja la partícula de la trampa, la partícula experimentará una fuerza de restauración que la llevará de regreso a la posición de equilibrio. Esto se debe a que la partícula está en un estado de equilibrio dentro de la trampa óptica, lo que permite un control preciso sobre su movimiento y posición.

Estas fuerzas hacen que la trampa actúe como si la partícula estuviese unida a un resorte con una constante elástica k , también llamada “rigidez de la trampa”, que ayuda a medir la fuerza solo midiendo los desplazamientos de las esferas.

La medición de fuerzas en las PO genera un interés dual desde la parte teórica como práctica. En primer lugar, hay una razón más pragmática, ya que en numerosas aplicaciones resulta crucial conocer de manera precisa la magnitud de las fuerzas ópticas aplicadas sobre la partícula atrapada. Por otro lado, surge la curiosidad de comprender los fundamentos físicos que sustentan estas trampas ópticas, así como buscando comparar y contrastar los resultados experimentales con los valores teóricos esperados.

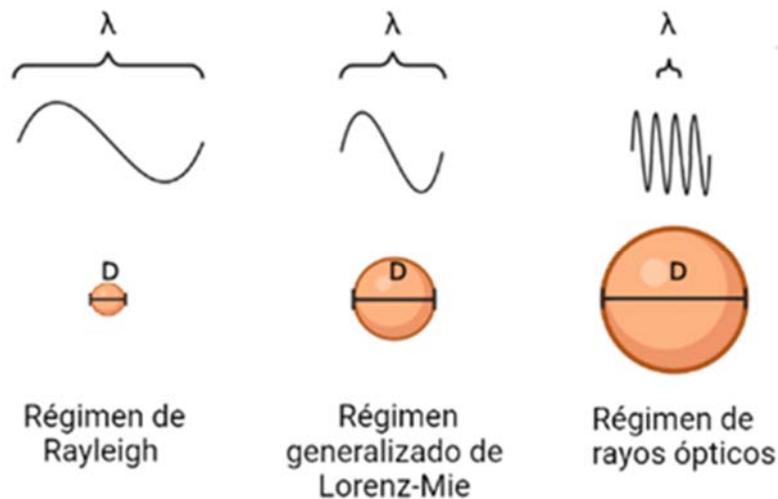


Figura 2. 8. Comparación entre los tres regímenes. En el régimen de Rayleigh el diámetro de la partícula es menor a la longitud de onda, caso contrario en el régimen de rayos ópticos y el régimen central se caracteriza por que las dimensiones entre la partícula y la longitud de onda son similares.

El estudio de las fuerzas se divide en tres rangos dependiendo del tamaño del diámetro de las partículas (D) y la longitud de onda del láser (λ), se pueden utilizar diferentes soluciones o aproximaciones para analizar las fuerzas que actúan en el sistema. (Figura 2.8).

En el caso cuando $D \gg \lambda$ es llamado régimen de rayos ópticos o régimen de Mie. Al caso opuesto, $D \ll \lambda$, nos referimos como el régimen de campos ópticos o de Rayleigh.

2.4.2 Régimen de rayos ópticos

Para una partícula atrapada en el caso límite en que $D \gg \lambda$ las fuerzas de captura de la luz pueden ser entendidas en términos de la geometría de los rayos ópticos. Este principio se basa en el principio de que la luz se propaga en una línea recta en un medio homogéneo y en la ley de la reflexión y refracción, en este caso, se puede descomponer el haz de luz total en rayos individuales, cada uno con una intensidad y dirección apropiadas, que se propagan en un medio con índice de refracción uniforme.

Los rayos cuando se reflejan o se refractan cambian su dirección. En esta aproximación tanto la longitud de onda como los efectos de difracción pueden ser despreciados (Wolf, 1986).

De acuerdo con este modelo, las fuerzas involucradas en las PO son explicadas por la transferencia de momento lineal (Figura 2.9) asociada al cambio de trayectoria de los rayos en una interfaz dieléctrica ya sea por reflexión o por transmisión y la tercera ley de Newton (H. Felgner, 1995).

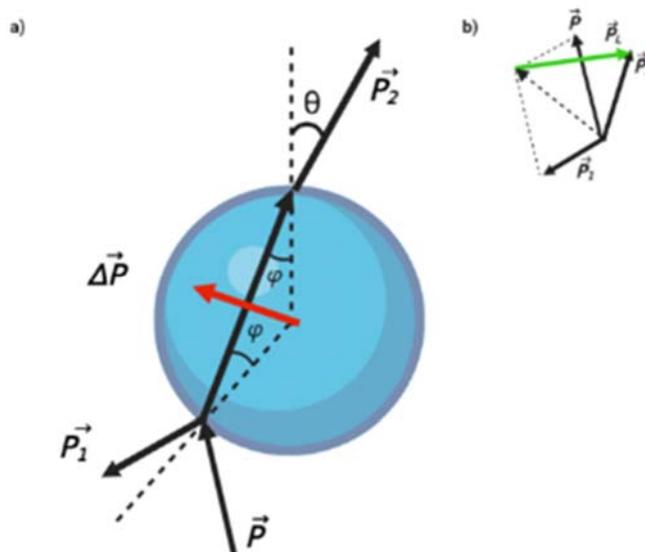


Figura 2. 9. Momento propagado a través de una esfera. a) Rayo con momento \vec{P} a través de una esfera con índice mayor al medio en el que \vec{P}_1 es el momento reflejado en la primer interfaz y \vec{P}_2 corresponde al momento que sucede después de la reflexión en la segunda interfaz. b) Cambio de momento del rayo, en verde, el cambio en la esfera tiene la misma escala que el verde, pero en dirección opuesta de acuerdo con la tercera ley de Newton.

En el caso de la reflexión, cuando un rayo láser incide en la interfaz dieléctrica de una partícula, parte de su momento lineal se transfiere y esta transferencia de momento crea una fuerza óptica sobre la partícula, atrayéndola hacia la región de mayor intensidad de

luz (Figura 2.10). La fuerza generada depende de dos factores principales: el índice de refracción de la partícula y la tasa de transferencia de momento entre el rayo láser y la partícula.

En el caso de la transmisión, cuando el rayo atraviesa la interfaz dieléctrica, también ocurre una transferencia de momento lineal a la partícula. La dirección y magnitud de la fuerza óptica resultante dependerán de las características de la partícula y de cómo interactúa con la luz.

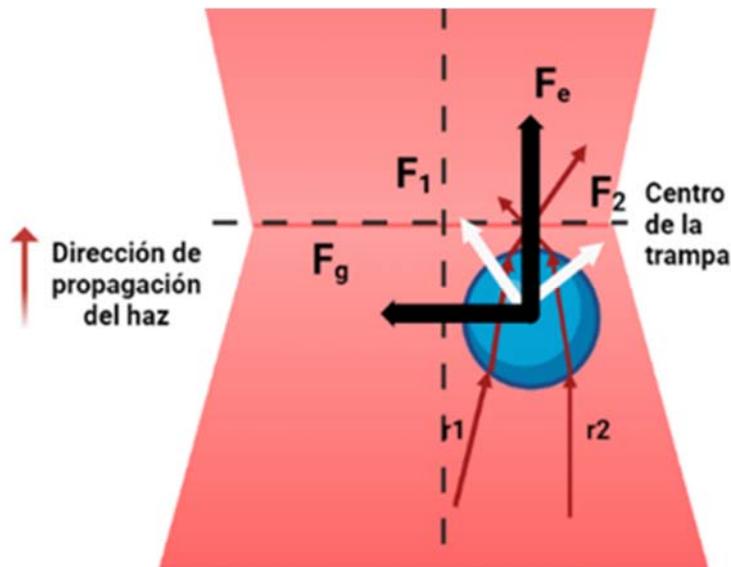


Figura 2. 10. Esquema de fuerzas sobre la partícula Si los rayos r_1 y r_2 pasan a través de una lente para enfocar el haz, entonces surgirá una fuerza F_g que atrae a la partícula hacia la zona de enfoque, es decir, hacia la cintura del haz y a la vez es empujada por la fuerza de esparcimiento F_e en la dirección de propagación.

En los trabajos de Ashkin (Ashkin A. , 1992) y Roosen (G. Roosen, 1976) se han calculado las fuerzas ópticas sobre una esfera debido a un rayo de luz de potencia P, usando los coeficientes de Fresnel de reflexión y transmisión.

La suma de las fuerzas ejercidas por los rayos incidentes se puede dividir en dos componentes:

- La fuerza de esparcimiento (1) F_e , la cual provoca que la partícula sea desplazada fuera del foco de la trampa. Sin embargo, si la partícula se encuentra en una trampa estable la fuerza de esparcimiento es compensada por la fuerza de gradiente y de esta manera, la partícula se mantiene atrapada en el punto de mayor intensidad del haz de luz, donde las fuerzas de esparcimiento y gradiente se equilibran. La fuerza de

gradiente (2) F_g actúa como una fuerza restauradora que empuja la partícula hacia el centro de la trampa, funcionando de manera similar a un resorte óptico.

$$F_e = \frac{n_1 P}{c} \left((1 + R \cos \theta - T^2) \frac{\cos (2\theta - 2\varphi) + R \cos 2\theta}{1 + R^2 + 2R \cos 2\varphi} \right) = \frac{n_1 P}{c} Q_e \quad (1)$$

$$F_g = \frac{n_1 P}{c} \left((R\theta - T^2) \frac{(2\theta - 2\varphi) + R2\theta}{1 + R^2 + 2R2\varphi} \right) = \frac{n_1 P}{c} Q_g \quad (2)$$

donde n_1 es el índice de refracción del medio, P es la potencia del láser, θ es el ángulo incidente del rayo y φ es el ángulo del rayo refractado, Q_e y Q_g son los términos entre paréntesis. R y T son el coeficiente de reflexión y transmisión de Fresnel, respectivamente.

$$F_{tot} = \frac{n_1 P}{c} \sqrt{Q_e^2 + Q_g^2} \quad (3)$$

La suma vectorial de estas dos componentes de fuerza (ecuaciones 1 y 2) nos dan la magnitud de la fuerza (3). Cuando hay un desplazamiento de la ubicación de la partícula de la posición de equilibrio ilustrada en la Figura 2.9, las fuerzas ópticas no equilibradas lo atraerán de nuevo hacia la cintura de la trampa, es decir, la posición de equilibrio (Blocka, 2004). Según la teoría óptica de rayos, se predice que la posición de equilibrio es del 3-5% del diámetro de la esfera más allá del foco láser (H. Felgner, 1995).

2.4.3 Régimen de Rayleigh

En el régimen de Rayleigh, las partículas atrapadas son mucho más pequeñas que la longitud de onda de la luz utilizada ($D \ll \lambda$), lo que limita la influencia de los efectos de transferencia de momento y difracciones.

Una característica importante de este régimen es que las partículas deben mantenerse cerca del punto focal para una manipulación efectiva debido a que las fuerzas ópticas disminuyen rápidamente a medida que la partícula se aleja del punto focal del haz de luz, y su efecto sobre las partículas se debilita, lo que dificulta su manipulación precisa y controlada. Además, las fuerzas de gradiente son más dominantes en comparación con las fuerzas de esparcimiento.

La partícula actúa como una pequeña antena que interactúa con el campo electromagnético de la luz y se describe su funcionamiento utilizando un modelo clásico de campo electromagnético para las fuerzas (Figura 2.10). En este régimen la perturbación del frente de onda es mínima y la partícula puede ser vista como un dipolo inducido, que se polariza en presencia de un campo eléctrico, comportándose de acuerdo con la electrodinámica (Odde, 2002).

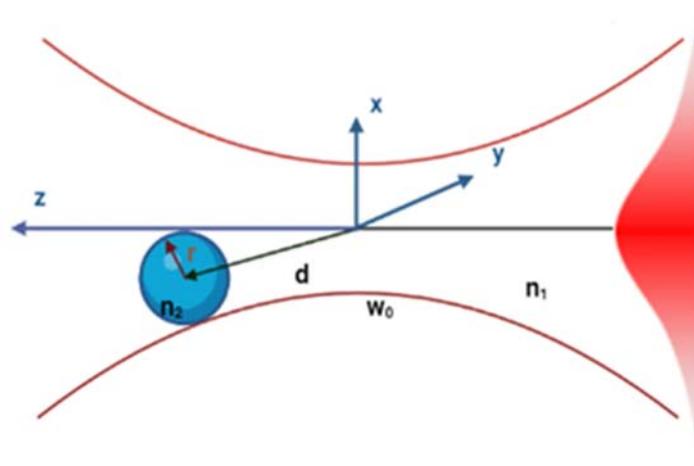


Figura 2. 11. Geometría utilizada para el análisis de fuerzas en el régimen de Rayleigh. Donde n_2 corresponde al índice n y el radio de la partícula, n_1 al índice del medio, d es la distancia desde w_0 . La polarización se encuentra en dirección al eje x y la propagación del haz es en dirección al eje z .

El estudio se basa en el tratamiento hecho por Harada (Harada, 1996). Cuando se multiplica el momento de un dipolo $p = qd$ por el gradiente del campo eléctrico ∇E se está considerando cómo varía el campo eléctrico en la vecindad de la partícula y cómo esta variación afecta al momento dipolar inducido.

Esto resulta en una fuerza que actúa sobre la partícula, atrayéndola o repeliéndola, dependiendo de las características del campo eléctrico y la polarizabilidad de la partícula. Tomando en cuenta lo anterior el momento del dipolo la fuerza se puede reescribir como:

$$F = (p \cdot \nabla)E \quad (4)$$

Si la respuesta de la partícula al campo eléctrico aplicado es proporcional al campo eléctrico y no hay efectos no lineales significativos, entonces el momento se toma como:

$$p = \alpha E \quad (5)$$

Donde α es la polarizabilidad de la partícula.

Al utilizar la ecuación:

$$(E \cdot \nabla)E = \nabla \frac{1}{2}E^2 - E \times (\nabla \times E) \quad (6)$$

Donde:

$$(\nabla \times E) = 0 \quad (7)$$

La fuerza gradiente queda como:

$$F = \frac{1}{2} \alpha \nabla |E|^2 = \frac{1}{2} \alpha \nabla I \quad (8)$$

La fuerza que la partícula experimenta en un estado estacionario, es decir, cuando las condiciones se mantienen constantes en el tiempo representa a una fuerza promedio denominada como fuerza gradiente.

Esta fuerza representa la tendencia de la partícula a moverse desde o hacia las regiones de mayor intensidad de ∇E y se calcula tomando el promedio de la ecuación (8):

$$F_g = \langle F \rangle = 4\pi n_2^2 \epsilon_0 r^3 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \left(\frac{1}{2} \nabla \langle |E|^2 \rangle \right) \quad (9)$$

Utilizando la relación:

$$\langle |E|^2 \rangle = \frac{2}{n_2 \epsilon_0 c} I \quad (10)$$

Se obtiene:

$$F_g = \frac{2\pi n_2 r^3}{c} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \nabla I \quad (11)$$

Donde I es la distribución de intensidad o irradiancia del haz incidente en un punto arbitrario definida como una versión promedio en el tiempo del vector de Poynting $\langle S \rangle$ y

r representa el radio de la partícula y $m = n_1/n_2$ es el índice de refracción relativo de la partícula.

La fuerza que actúa sobre la partícula está relacionada con el gradiente de intensidad del haz, que en este caso es un perfil Gaussiano (Figura 2.12 a). Al obtener la derivada, se obtiene una región lineal (Figura 2.12 b), que representa la zona de atrapamiento donde la derivada es cero y hay una fuerza de restitución cuando la partícula se desplaza hacia la izquierda o derecha.

A pesar de que la partícula experimenta el movimiento browniano, la trampa óptica contrarresta este movimiento de forma que la partícula se mantiene centrada. Así, se observa una oscilación continua de la partícula cuya magnitud está determinada por la pendiente, la cual es controlada por la intensidad del haz.

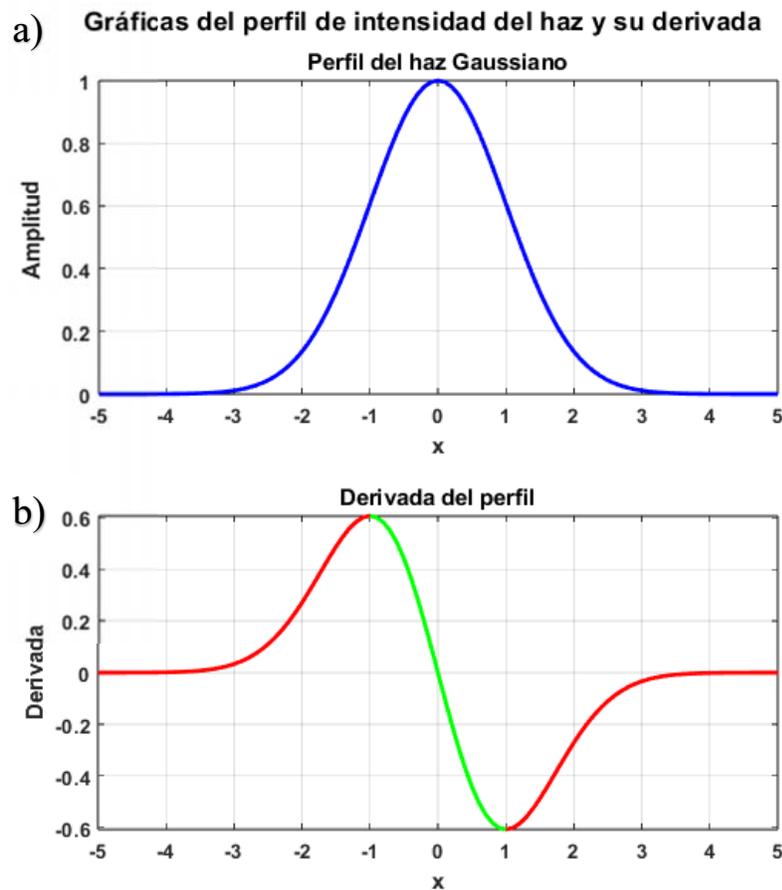


Figura 2. 12. Perfil de la intensidad del haz y su derivada. En verde, se resalta la región de atrapamiento. La pendiente de esta región está directamente relacionada con la rigidez: cuanto mayor sea esta, mayor será la rigidez de la trampa.

Una mayor pendiente indica a menor movilidad de la partícula, lo que implica una trampa más rígida y una mayor capacidad de retención de la partícula.

2.4.4 Régimen generalizado de Lorenz-Mie (RGLM)

La mayoría de los objetos que son motivo de estudio o interesantes para atrapar con las PO, tienden a caer en el rango intermedio de tamaño, en las cuales se cumple que $D \approx \lambda$ (B. A. Brown, 2001). Es decir, cuando la partícula es más grande que la longitud de onda de la luz incidente pero no necesariamente entra al régimen de Rayleigh la descripción de fuerzas de confinamiento resulta no sencillo de deducir.

En este caso se cae en el régimen de Lorenz-Mie, se analiza la interacción entre una partícula y la luz incidente utilizando las ecuaciones de Maxwell, que describen el comportamiento de los campos eléctricos y magnéticos. Bajo apropiadas condiciones para la interfaz entre la partícula y el medio alrededor de ella, proporciona un marco teórico para comprender y calcular cómo la luz interactúa con partículas dieléctricas o metálicas, y permite estudiar fenómenos como la dispersión, la absorción y el enfoque de la luz en estas partículas.

La generalización de la teoría de Mie ha sido considerada por muchos investigadores, pero el trabajo más extensivo fue presentado por K. F. Ren, et al (1994), y es llamada la teoría generalizada de Lorenz-Mie (TGLM) (B. A. Brown, 2001). Esta teoría es una extensión de la teoría de esparcimiento de Mie, que permite calcular fuerzas de radiación ejercidas sobre una partícula de tamaño arbitrario y campos esparcidos bajo un haz Gaussiano.

En la TGLM, las fuerzas ópticas están escritas en términos de dos secciones transversales $C_{pr,x}$, $C_{pr,y}$ y una sección longitudinal asociada a la propagación en z del haz $C_{pr,z}$, para la presión de radiación (cuyo desarrollo, las derivaciones y expresiones detalladas de estas secciones transversales se dan en Gouesbet et al (1988) y su publicación de (1999), K.F. Ren (1994), Grehan et al (1999) y los resultados numéricos extensos en Gouesbet et al (1989) de acuerdo con la siguiente relación:

$$F = \frac{n_2}{c} I_0 [C_{pr,x} \hat{x} + C_{pr,y} \hat{y} + C_{pr,z} \hat{z}] = \frac{2Pn_2}{\pi W_0^2 c} [C_{pr,x} \hat{x} + C_{pr,y} \hat{y} + C_{pr,z} \hat{z}] \quad (12)$$

Siendo I_0 la intensidad del haz en la cintura mínima y P la potencia del láser.

En el régimen de tamaño intermedio, la teoría electromagnética a través de la teoría generalizada de Lorenz-Mie (Lock, 2009) ha proporcionado mejores resultados que la óptica geométrica. Sin embargo, ninguno de los dos modelos ha resultado completamente satisfactorio analíticamente, pero si numéricamente.

2.5 Fuerzas en la trampa óptica: estimación experimental

La pinza óptica actúa como un oscilador armónico caracterizado por una rigidez, que trata de estar en su estado no perturbado, al moverlo se tiene que regresar a su estado de equilibrio (Figura 2.13).

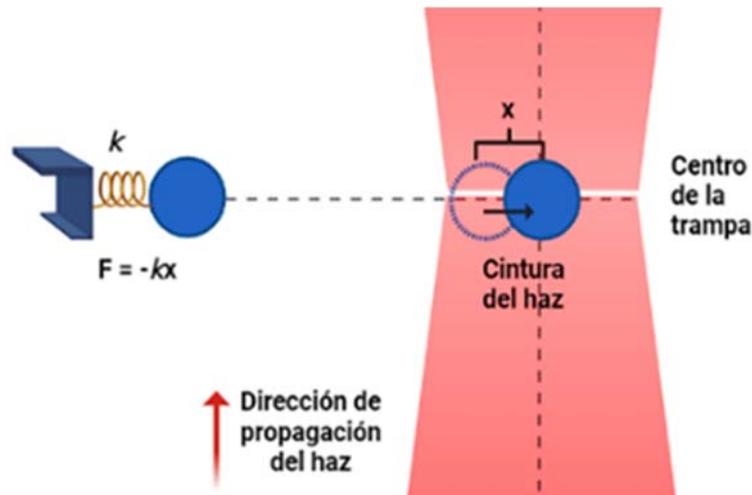


Figura 2. 13. La rigidez de la PO permite que la partícula atrapada (círculo azul) se comporte como un oscilador armónico, donde experimenta una fuerza de restauración proporcional a su desplazamiento desde la posición de equilibrio en la trampa que corresponde al centro de ella.

El funcionamiento de las PO se basa en el confinamiento de una partícula en un campo óptico, actuando como un oscilador armónico, y la fuerza de restauración que actúa sobre ella es proporcional al desplazamiento a través de una constante elástica o de rigidez siguiendo la ley de Hooke:

$$F = -k(x - x_{eq}) \quad (13)$$

donde x es el desplazamiento respecto de la posición de equilibrio x_{eq} y k es la rigidez de la trampa, misma que es controlada por la potencia del haz.

En consecuencia, si se aplica una fuerza F que aleja la partícula de la trampa, la partícula experimentará una fuerza de restauración que la llevará de regreso a la posición de equilibrio. Esto se debe a que la partícula está en un estado de equilibrio estable dentro de la trampa óptica, lo que permite un control preciso sobre su movimiento y posición.

El potencial de captura está representado por:

$$U = \frac{1}{2}k(x - x_{eq})^2 \quad (14)$$

La profundidad del potencial óptico se caracteriza típicamente en unidades de la energía térmica $k_B T$, donde k_B es la constante de Boltzman y T es la temperatura absoluta. Para que la partícula permanezca dentro de la trampa óptica, el pozo de potencial óptico debe ser lo suficientemente profundo, es decir debe tener al menos unos pocos $k_B T$ de profundidad para poder confinar una partícula.

El análisis del movimiento térmico de la partícula atrapada ópticamente en el potencial óptico proporciona información sobre las fuerzas locales que actúan sobre la partícula, la distribución de posición es gaussiana:

$$\rho(x) = \rho_0 \exp \left[- \left(\frac{k_x (x - x_{eq})^2}{2k_B T} \right) \right] \quad (15)$$

Antes de proceder a medir las fuerzas que actúan sobre un objeto en una trampa óptica, es necesario realizar la calibración del potencial óptico para determinar la constante "k". Una vez calibrada, la trampa óptica se convierte en un micro-transductor sensible de fuerzas, que ha sido utilizado en una amplia variedad de aplicaciones para ejercer y medir fuerzas (Gieseler, 2021).

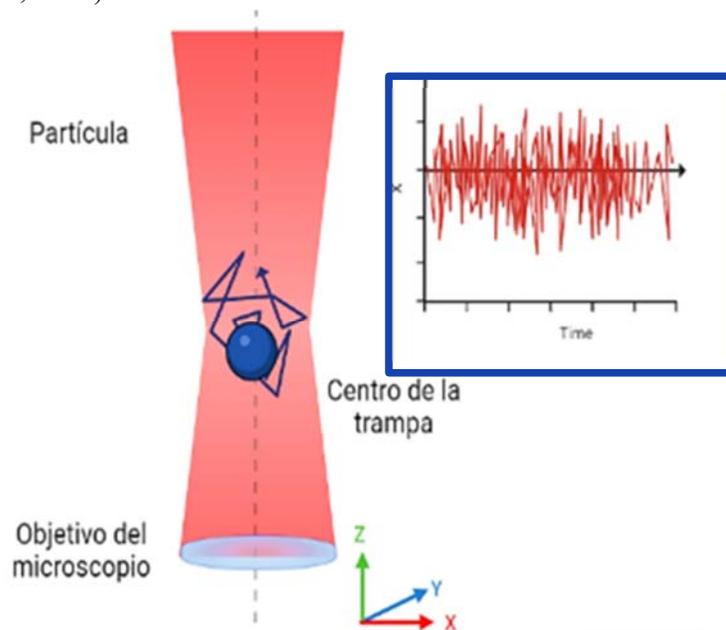


Figura 2. 14. Movimiento Browniano de la partícula y la señal (cuadro azul) que registra el fotodetector de las PO.

Existen diversos métodos para calibrar la fuerza de atrapamiento de las PO, se pueden clasificar como pasivos o activos.

Los métodos pasivos utilizan información sobre la trayectoria browniana de una partícula atrapada en unas PO estáticas (Figura 2.14). Por otro lado, los métodos activos se enfocan en la respuesta de la partícula a una perturbación conocida en el tiempo que se aplica a la partícula. Esta perturbación puede ser una fuerza externa que se genera al mover periódicamente la posición de estas.

La fuerza ejercida por las PO también se puede determinar directamente midiendo cómo se dispersa la luz de trampa utilizando una cámara digital o un fotodetector.

Estos métodos activos brindan información precisa sobre la rigidez de las PO y permiten una calibración más precisa, lo cual es realmente importante para utilizarlas en una amplia variedad de aplicaciones, tanto en biología como en otros campos, y así llevar a cabo investigaciones más detalladas y experimentos sofisticados.

2.6 Métodos de calibración

Las PO funcionan mediante la confinación de la partícula en un campo óptico, cuya fuerza de confinamiento es proporcional al desplazamiento del objeto. Para medir este desplazamiento, existen dos métodos: el primero consiste en utilizar una cámara de video para monitorear el movimiento de la partícula, mientras que el segundo se basa en un detector de posición altamente preciso que registra la posición de la partícula.

La rigidez de la trampa, por su parte, puede ser calculada de diversas formas, dependiendo de factores como la longitud de onda y la potencia del láser utilizado, así como del índice de refracción del medio circundante.

Los métodos de calibración basados en el estudio del movimiento browniano estudian el resultado del movimiento aleatorio de las moléculas de la solución sobre la partícula. La ecuación de movimiento de la partícula atrapada en este caso es dada por la ecuación de Langevin (para una dimensión x o y).

$$m\ddot{x}(t) + F_D + kx(t) = \eta(t) \quad (16)$$

Donde m es la masa de la partícula, $x(t)$ su posición en el tiempo, F_D la fuerza de arrastre, $-kx(t)$ representa la fuerza armónica de la trampa, k_B la constante de Boltzman y para todo t' y t'' , γ_0 como el coeficiente de arrastre y $\eta(t)$ que en este caso representa a una fuerza aleatoria que satisface:

$$\langle \eta(t) \rangle = 0 \quad (17)$$

$$\langle \eta(t')\eta(t'') \rangle = 2k_B T \gamma_0 \delta(t' - t'') \quad (18)$$

Como resultado, el promedio de la fuerza $\langle \eta(t) \rangle$ no depende de t y el promedio de dos tiempos $\langle \eta(t')\eta(t'') \rangle$ depende solo de la diferencia de tiempo $(t' - t'')$. Es decir, la fuerza aplicada es completamente aleatoria ya que no hay correlación en el tiempo. En consecuencia, se modela convenientemente mediante un proceso aleatorio.

Utilizando la ley de Stokes, la cual establece que la fuerza de arrastre F_D experimentada por un cuerpo esférico sólido que se mueve en un fluido viscoso es directamente proporcional a su velocidad, radio y también a la viscosidad del fluido, se obtiene que:

$$F_D = \gamma_0 \dot{x}(t) \quad (19)$$

En la cual:

$$\gamma_0 = 6R\pi\rho\nu \quad (20)$$

donde γ_0 el coeficiente de arrastre, ρ es la densidad, ν la viscosidad del fluido y R el radio de la partícula.

Cuando una partícula de tamaño micrométrico está atrapada en un medio acuoso, su movimiento está influenciado por una fuerza de amortiguamiento proporcional a la velocidad de la partícula que actúa en dirección opuesta al movimiento.

La magnitud de esta fuerza de amortiguamiento depende del coeficiente de viscosidad del medio, del tamaño, la forma de la partícula y es conocida como la resistencia del fluido. La resistencia es mucho mayor en comparación con la masa de la partícula, por lo cual la partícula no muestra movimientos rápidos o bruscos, sino que se mueve y responde de manera más lenta y suave a las fuerzas externas.

Esto significa que el término inercial en la ecuación (4) puede ser ignorado, ya que su contribución es mínima y no afecta significativamente el comportamiento de la partícula atrapada, y se reescribe como:

$$\dot{x}(t) + \frac{kx(t)}{\gamma_0} = \frac{\eta(t)}{\gamma_0} \quad (21)$$

Definiendo a la variable $\tau_0 = \frac{\gamma_0}{k}$ como tiempo de relajación, a $\eta(t)$ como una función de arbitraria, es decir que puede variar de manera libre, y resolviendo la ecuación anterior se obtiene que:

$$x(\tau) = e^{-\frac{\tau}{\tau_0}} \int_{-\infty}^{\tau} \frac{\eta(\tau')}{\gamma_0} e^{\frac{\tau'}{\tau_0}} d\tau' \quad (22)$$

Tomando la función de correlación $\langle x(t)x(t + \tau) \rangle$, escribimos:

$$\langle x(0)x(\tau) \rangle = \frac{e^{-\frac{\tau}{\tau_0}}}{\gamma_0^2} \int_{-\infty}^0 \eta(\tau'') e^{\frac{\tau''}{\tau_0}} d\tau'' \int_{-\infty}^{\tau} \eta(\tau') e^{\frac{\tau'}{\tau_0}} d\tau' \quad (23)$$

Tomando el promedio del conjunto de muestras, para las variables estocásticas η tenemos:

$$\langle x(0)x(\tau) \rangle = \frac{e^{-\frac{\tau}{\tau_0}}}{\gamma_0^2} \int_{-\infty}^0 d\tau'' \int_{-\infty}^{\tau} \langle \eta(\tau')\eta(\tau'') \rangle e^{\frac{(\tau''+\tau')}{\tau_0}} d\tau' \quad (24)$$

Sustituyendo la ecuación (6) en la (12) tenemos:

$$\langle x(0)x(\tau) \rangle = \frac{2k_B T \gamma_0 e^{-\frac{\tau}{\tau_0}}}{\gamma_0^2} \int_{-\infty}^0 e^{\frac{2\tau''}{\tau_0}} d\tau'' \quad (25)$$

Resolviendo lo anterior:

$$\langle x(0)x(\tau) \rangle = \frac{k_B T \gamma_0 \tau_0}{\gamma_0^2} e^{-\frac{\tau}{\tau_0}} = \frac{k_B T}{k} e^{-\frac{\tau}{\tau_0}} \quad (26)$$

Por lo cual la correlación será:

$$\langle x(t)x(t+\tau) \rangle = \frac{k_B T}{k} e^{-\frac{|\tau|}{\tau_0}} \quad (27)$$

Cuando la potencia del láser (y, por lo tanto, la fuerza de la trampa k) es baja, los tiempos de correlación τ_0 pueden ser largos y deben tenerse en cuenta. El tiempo de correlación finito también se puede interpretar como una especie de filtrado pasa bajas de parte de la partícula.

Al aplicar la transformada de Fourier a la función de autocorrelación, se obtiene el espectro de potencia, que muestra cómo se distribuye la energía de la señal en diferentes frecuencias. Utilizando el teorema de Wiener-Khintchine, se obtiene:

$$x^2(\omega) = \frac{2k_B T \gamma_0}{k^2 (1 + \omega^2 \tau_0^2)} \quad (28)$$

El teorema de Wiener-Khintchine establece una relación matemática fundamental entre la autocorrelación de una señal y su espectro de potencia. En pocas palabras, el teorema establece que el espectro de potencia de una señal se puede obtener mediante la transformada de Fourier de su función de autocorrelación (Weisstein, 2023).

Esto proporciona la respuesta en frecuencia característica de la partícula ante la fuerza de conducción térmica, normalizada de manera que:

$$\int_{-\infty}^0 x^2(\omega) d\omega = \langle x^2 \rangle \quad (29)$$

Lo cual abre la puerta a diferentes métodos de calibración. Existen varios de ellos clasificados en métodos activos, directos y pasivos para la calibración de PO algunos de ellos son:

Método del análisis espectral: Este método se basa en el análisis de la posición de la partícula atrapada en relación con el tiempo, y su espectro de potencia es utilizado para calcular la rigidez de la pinza.

Método del desplazamiento térmico: Este método se basa en la relación entre el desplazamiento térmico de una partícula atrapada y la temperatura del ambiente en el que se encuentra. El análisis estadístico del movimiento Browniano de la partícula permite la determinación de la rigidez de la pinza.

Método de fluctuaciones: Este método utiliza la relación entre la intensidad de las fluctuaciones de la velocidad de una partícula atrapada y su tamaño para determinar la rigidez de la pinza

En esta ocasión nos enfocamos en 2 métodos pasivos: el método de equipartición y la estadística de Boltzman por la practicidad que presentan, estos métodos se basan en el análisis estadístico de la trayectoria Browniana de la partícula y permiten determinar la rigidez de la pinza con alta precisión, son útiles para calibrar PO en situaciones donde la aplicación de fuerza externa no es deseable o factible. Sin embargo, su precisión puede verse afectada por factores como la temperatura, la viscosidad y la geometría de la partícula atrapada, por lo que su uso debe ser evaluado cuidadosamente en cada situación específica.

2.6.1 Calibración pasiva

Teorema de equipartición

El teorema de equipartición (Sarshar M. W., 2014) (Hemmen, 1980) establece que el movimiento que tiene una partícula en una solución está relacionada a la energía térmica y es donde las fluctuaciones térmicas de una partícula atrapada pueden ser usadas para obtener la constante elástica o rigidez de la pinza óptica a través del uso de un fotodetector (Jones, 2015).

Trabajando en el modelo de un oscilador armónico, cada grado de libertad tiene una energía dada por $\frac{1}{2}K_B T$, donde K_B es la constante de Boltzman y T es la temperatura absoluta.

La energía para cada coordenada queda expresada como:

$$U = \frac{1}{2}K_B T \quad (30)$$

La energía potencial del sistema está dada por la ecuación (30) y tomando al punto de equilibrio como la posición inicial $x_{eq} = 0$ de la ecuación (14) tenemos:

$$U = \frac{1}{2}k\langle x^2 \rangle \quad (31)$$

Por lo tanto, midiendo el promedio del cuadrado del desplazamiento de la partícula, cuando la temperatura es conocida e igualando la ecuación (30) y (31) la constante elástica de la trampa puede ser determinada como:

$$k = \frac{K_B T}{\langle x^2 \rangle} \quad (31)$$

Para la coordenada en y se sigue el mismo procedimiento. Este método se ve afectado por la forma y el tamaño de la partícula, así como las propiedades del medio que lo rodea por lo cual debe calibrarse antes de usarse con el fotodetector. Sin embargo, al trabajar con esta calibración, una ventaja significativa es que es independiente del coeficiente de fricción y el radio de la partícula.

Método de la estadística de Boltzman

El método de la estadística de Boltzman es una técnica utilizada en diversos campos, para describir el comportamiento de un sistema compuesto por muchas partículas (Florin, 1998). Según las estadísticas de Boltzman, la probabilidad de encontrar la partícula en una determinada posición cuando se somete a un pozo de potencial armónico sigue una distribución gaussiana dada por la ecuación (32) (Sarshar M. W., 2014).

$$\rho(x) = C \exp \left[- \left(\frac{E(x - x_{eq})}{K_B T} \right) \right] \quad (32)$$

La contribución de C , el factor de normalización es una compensación de energía y se calcula asumiendo un potencial cero en el centro de la trampa óptica $x_{eq} = 0$.

La energía potencial resultante se ajusta mediante una ecuación cuadrática:

$$E(x) = \frac{k_x x^2}{2} + c \quad (33)$$

donde k_x es la rigidez de la trampa a lo largo del eje x y C es un desplazamiento de energía asumido como cero. La rigidez de la trampa a lo largo del eje y se mide de la misma manera que a lo largo del eje x , por lo cual la ecuación (32) queda descrita como:

$$\rho(x) = C \exp \left[- \left(\frac{k_x x^2}{2K_B T} \right) \right] \quad (34)$$

La ecuación (32) resulta similar a la ecuación (15) teniendo a C como ρ_0 .

Al asumir una distribución normal para el histograma de posición de la partícula atrapada y ajustar una parábola al logaritmo de la distribución normal, los resultados calculados por el método estadístico de Boltzman se vuelven idénticos a los del teorema de equipartición.

La calibración de una trampa óptica utilizando el método de Boltzman no requiere conocer la forma de la partícula atrapada, el coeficiente de arrastre o la viscosidad del medio. Otra ventaja de dicha calibración es que también proporciona información sobre el potencial en la región alejada del centro de la trampa donde el potencial óptico no es armónico.

3. Metodología

3.1 Material biológico

Se utilizó una cepa de *C. tropicalis* tipo.

3.1.1 Medio de cultivo y soluciones

Agar dextrosa Sabouraud (SDA): Se disolvieron $65 \frac{\text{g}}{\text{l}}$ de medio SDA (MCD LAB, S.A. de C.V.) en agua destilada. Se hirvió por 1 minuto y esterilizó por 15 min en autoclave. Se enfrió a temperatura ambiente, y distribuyó en placas de 5 cm de diámetro. Se enfrió en un refrigerador comercial durante 24 h a una temperatura de 12 °C.

Caldo agar dextrosa Sabouraud (SDB): Se disolvió $20 \frac{\text{g}}{\text{l}}$ de medio SDB en agua destilada, se esterilizó por 15 min en autoclave y se enfrió a temperatura ambiente.

Solución de FS: El azul de metileno (AM) (MEYER #7220-79-3), el peso molecular (PM) es de $383.90 \frac{\text{g}}{\text{M}}$ y su espectro de absorción se presenta en el rango de $\lambda = 618 - 650$ nm.

Se preparó una solución stock de $C = 200 \mu\text{M}$ con buffer (tampón fosfato salino (PBS), pH 7.4) para un volumen de $V = 100 \text{ ml}$ utilizando la formula:

$$m = C * PM * V = 200 \frac{\mu\text{M}}{\text{l}} * 383.90 \frac{\text{g}}{\text{M}} * 0.001\text{l} = 7.47\text{mg} \quad (35)$$

Se esterilizó con un filtro de jeringa estéril (LUZEREN 0.22 μm), posteriormente se diluyó a 20 μM en 10 ml, con la cual se trabajó y la solución stock se guardó en refrigeración.

Fuente de luz: Se realizó con un dispositivo rojo con 12 LEDs (LED-P1YLLLL-120/41 marca SiLed), fabricado a medida para microplacas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos (Figura 3.1), en el departamento de óptica del INAOE. El dispositivo sobre la microplaca y se irradió durante 18 min dando una dosis de $60 \frac{\text{J}}{\text{cm}^2}$.

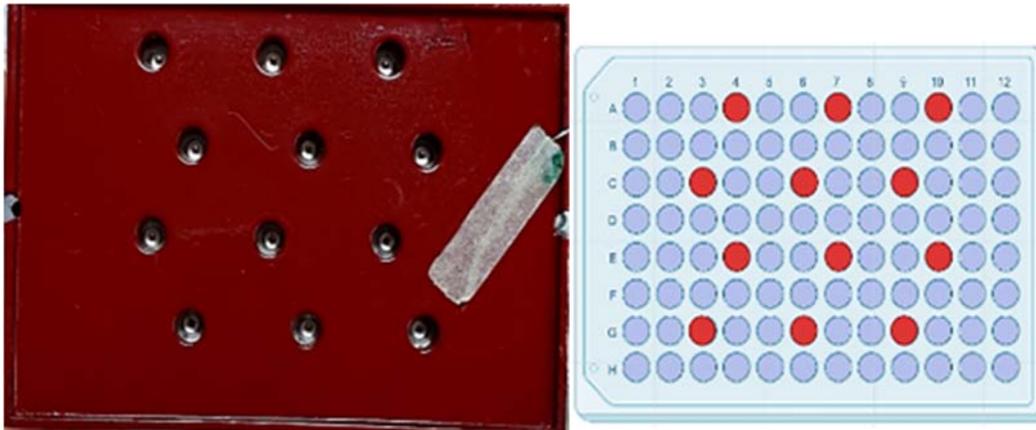


Figura 3. 1. Dispositivo para TFDA. Se observa la vista posterior del dispositivo con los LEDs arreglados en filas y columnas adecuados para su uso en microplacas de 96 pozos y la distribución de irradiación en la microplaca.

3.1.2 Realización de biopelículas

Se utilizó una cepa de *C. tropicalis* cultivada SDA por estría cruzada, se incubó a 37 °C por un periodo de 24 h. Se tomó una asada de una colonia y se cultivó en caldo SDB (Figura 3. 2 a). Posteriormente se determinó la concentración inicial de células por medio de conteo con un hemocitómetro (Neubauer improved 0.1 mm depth; Marienfeld) para calcular una población de $1 \times 10^6 \frac{\text{cel}}{\text{ml}}$, la cual se denominó como sol_1 .

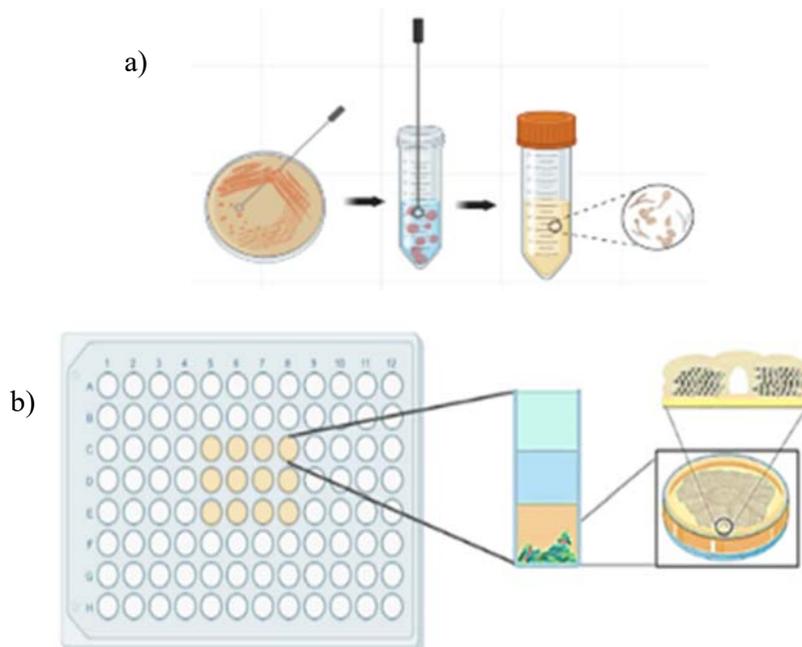


Figura 3. 2. a) Esquema del procedimiento para crear la solución base . b) Formación de biopelículas.

Posteriormente se realizó la formación de biopelículas en un microplaca con 50 μl de sol_1 y 50 μl de SDB (Figura 3. 2 b), se realizaron 12 siembras siguiendo este procedimiento.

Se selló correctamente la microplaca, se cubrió con aluminio y se incubó a 37 °C en la incubadora de agitación (PRO1001319, marca LUZEREN) a 150 rpm por 24 h.

3.2 TFDA convencional

Se procedió a romper la biopelícula por agitaciones empleando una micropipeta de 200 μl , se recuperaron las células de las biopelículas y se disolvieron en un tubo de 5 ml de PBS, esta solución se denominó sol_2 , a partir de ella se preparó una dilución con concentración $\rho = 10 - 16 \times 10^6 \frac{\text{cel}}{\text{ml}}$. La concentración ρ se utilizó para preparar controles con el fin de evaluar el comportamiento de las células de *C. tropicalis* sin la administración de FS y para tratamientos, ya que se realizaron varias mediciones para una muestra.

Las muestras se ordenaron en una microplaca de 96 pozos, se colocaron 3 controles, al primero (C), se le administraron 50 μl de ρ (marcada con color naranja en la figura 3.3), a este control no se le administró FS ni se irradió utilizando el dispositivo para de luz LED, al siguiente control (CL) se le administraron 50 μl de ρ (marcada en color amarillo en la figura 3.3) y al igual que el control anterior no se le administró FS, en este caso si se irradió con el dispositivo.

Para el control de toxicidad (CT, marcado en color azul marino en la figura 3.3) y TFDA (marcado en azul en la figura 3.3) se le administró a cada micro pozo 50 μl de ρ y 50 μl de la solución de AM, para que la concentración final sea de 10 μM , a CT no se le irradió con el dispositivo LED.

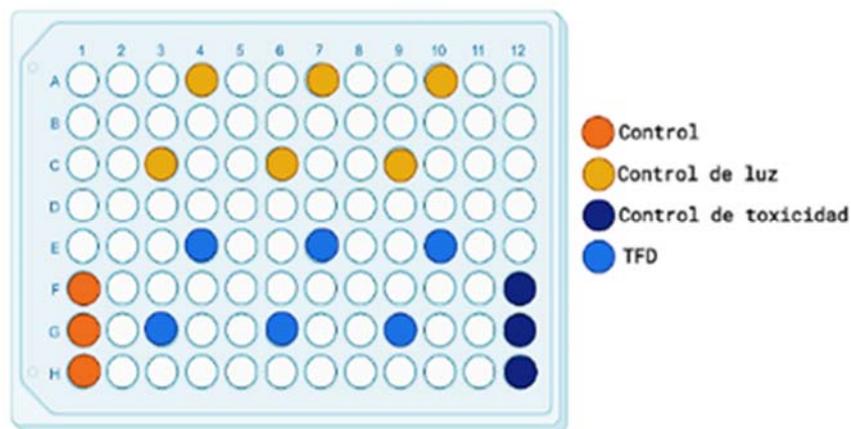


Figura 3. 3. Configuración en la microplaca para la aplicación de TFDA, con los respectivos controles.

Una vez que se realizó lo anterior, se procedió a incubar la microplaca durante 30 min a 30 °C. Pasado ese tiempo se resuspendieron las células de los pozos de C y CT se tomaron 20 μl de cada uno y se sembraron por estriado masivo en una placa con SDA.

Posteriormente, se irradian las muestras de TFDA y CL a $60 \frac{\text{J}}{\text{cm}^2}$, utilizando el dispositivo rojo con emisión en $\lambda = 630 \text{ nm}$ durante 19.23 min sobre la microplaca (Figura 3.4).

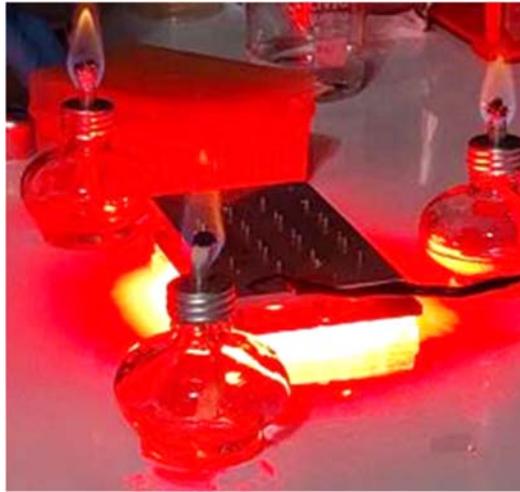


Figura 3. 4. Aplicación de TFDA. Se observa un ejemplo de la aplicación de TFDA sobre la placa con las distribución de la Figura 3.3, sin C y CT.

Una vez aplicada la TFDA se resuspendieron las células que estaban en los micropozos CL y TFDA se tomaron 20 μl de cada uno respectivamente y se sembraron por estriado masivo en una placa con SDA.

Las placas estriadas de C, CL, CT y TFDA se incubaron durante 24 horas a 30°C y posterior a ello se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

Se realizaron 4 pruebas de 3 experimentos biológicos independientes. El análisis estadístico se realizó utilizando el software Excel y ANOVA para un factor con la prueba de Tukey para las cepas y bajo un nivel de significancia de 0.05. Se destaca con (*) las diferencias significativas respecto al control y tratamientos solo de TFDA en la sección de resultados.

3.3 Análisis en pinzas ópticas

Para realizar los experimentos con PO se requirió de una calibración entre el láser de atrapamiento y el láser de detección. Para la detección se utilizan las bases para interferencia de campo lejano de la luz laser inicial con la luz esparcida por la partícula atrapada. La luz esparcida es colimada por el condensador del sistema y después se describen corrimientos en el perfil de intensidad debido a los movimientos que tiene la partícula. Este método es conocido como back-focal-plane interferometry (Upadhy, 2019).

Cuando se usa un láser separado para la detección en el fotodiodo detector de cuadrante (QPD), la potencia de este láser se establece lo suficientemente baja (menor a 1 mW), para descartar fuerzas adicionales a la producida por el haz de captura, esto ofrece la ventaja de que puede usarse fácilmente en combinación con trampas múltiples

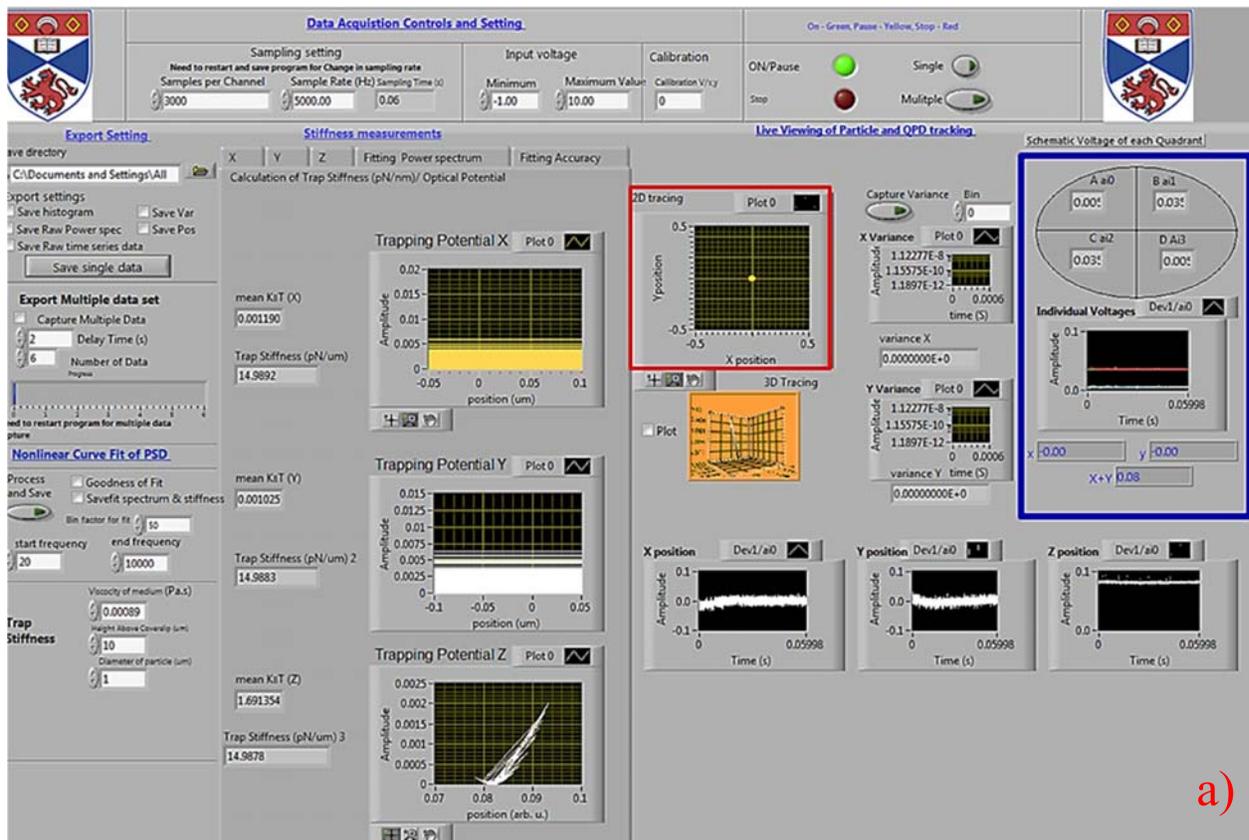


Figura 3. 5. Software utilizado para la calibración del haz. a) Se encuentran las posiciones del láser de detección dentro del recuadro rojo, en la parte azul las posiciones marcadas como iniciales.

compartidas en el tiempo.

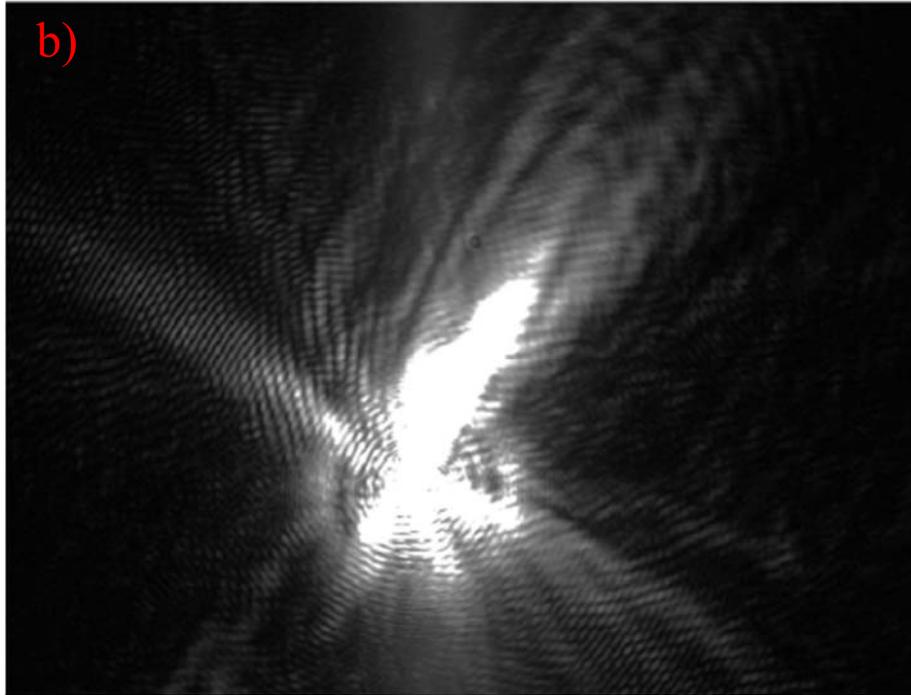


Figura 3. 6. Imágenes del láser de atrapamiento y detección para la calibración del haz. b) Se observa el láser de atrapamiento alineado con el láser de detección para el monitoreo de las posiciones de los organelos atrapados. Se puede observar una aberración por el objetivo del microscopio.

A diferencia del haz de captura, el láser de detección debe alinearse cuidadosamente con la partícula para garantizar la detección en el régimen lineal del QPD, esto se realizó

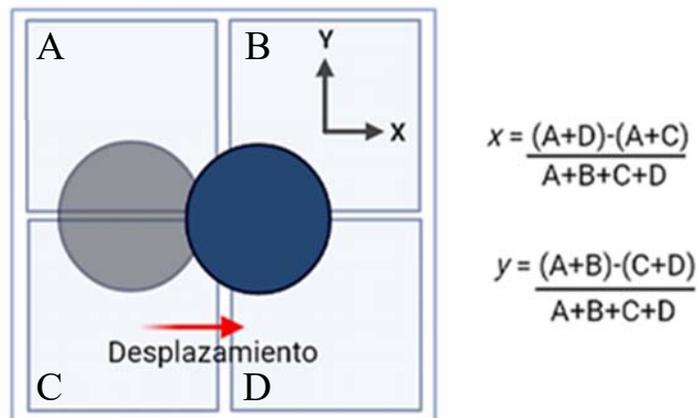


Figura 3. 7. Detección de la posición de la partícula en el plano de atrapamiento. Específicamente, los desplazamientos x y y se miden respecto al centro del detector de cuadrante como se presenta, donde A, B, C y D son las señales generadas a partir de cada uno de los cuatro cuadrantes.

mediante el software en LabVIEW proporcionado por el fabricante del sistema de pinzas ópticas, ver figura 3.5 y 3.7.

Para convertir los cambios de intensidad sobre los cuatro segmentos del detector en cambios de desplazamiento de la partícula atrapada, se siguen las ecuaciones del detector dados dentro de la figura 3.6.

Una vez calibrado se procede a hacer el monitoreo de la célula, cuyo diámetro se encuentra alrededor de 5 μm , atrapando solamente a uno de los organelos para la *C. tropicalis*, y no a toda la célula con el haz de atrapamiento (emite en $\lambda = 1070 \text{ nm}$ con un diámetro de $\sim 1 \mu\text{m}$).

Al finalizar lo anterior, se detectó la trayectoria del organelo mediante el QPD, se importó esta información al software TweezPal para calcular el histograma de posición, el potencial de captura y la rigidez. La ventana principal del programa mostraba un gráfico con la trayectoria de la partícula (Figura 3.8), un panel con opciones de fuente de datos y visibilidad, y también incluía el histograma de posición (Figura 3.9) y el potencial de captura con un selector de región de ajuste (Figura 3.10).

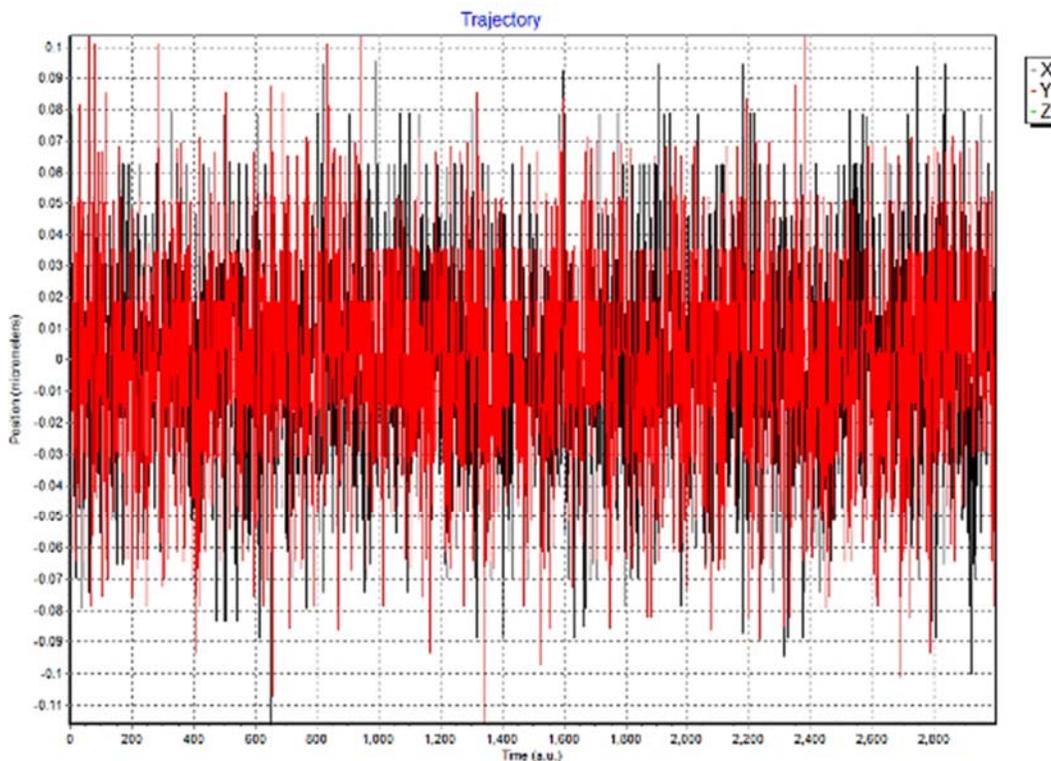


Figura 3. 8. Grafica proporcionada por el software TweezPal que representa las trayectorias de las partículas en la coordenada x e y.

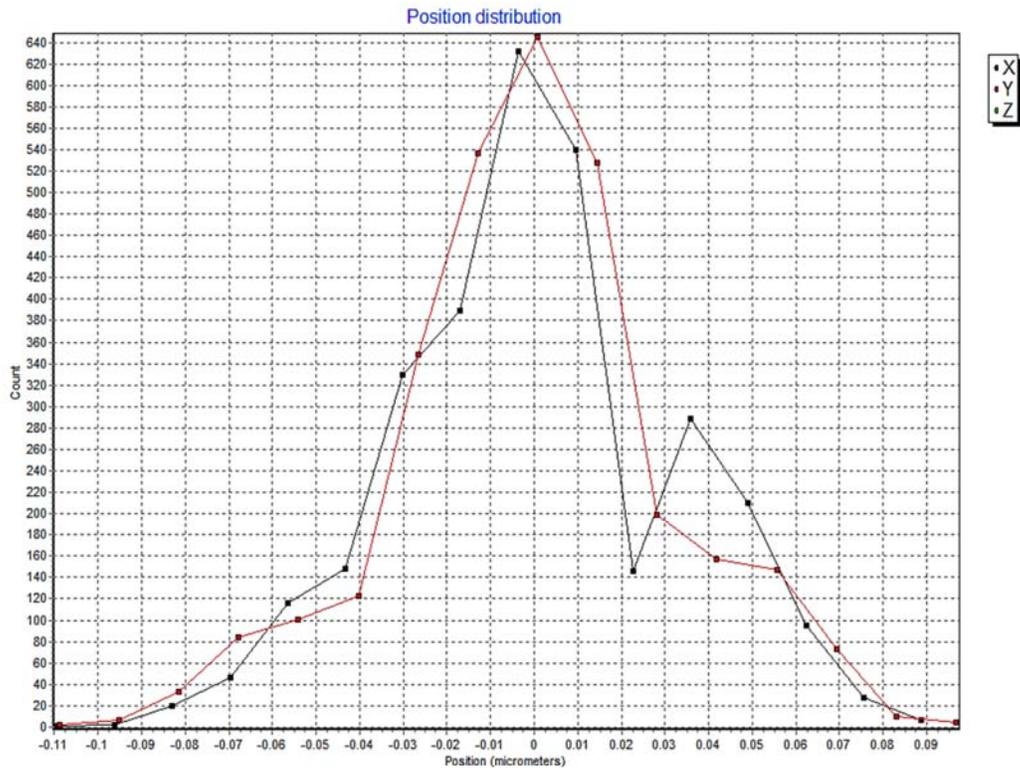


Figura 3. 9. Histograma de las posiciones de las partículas.

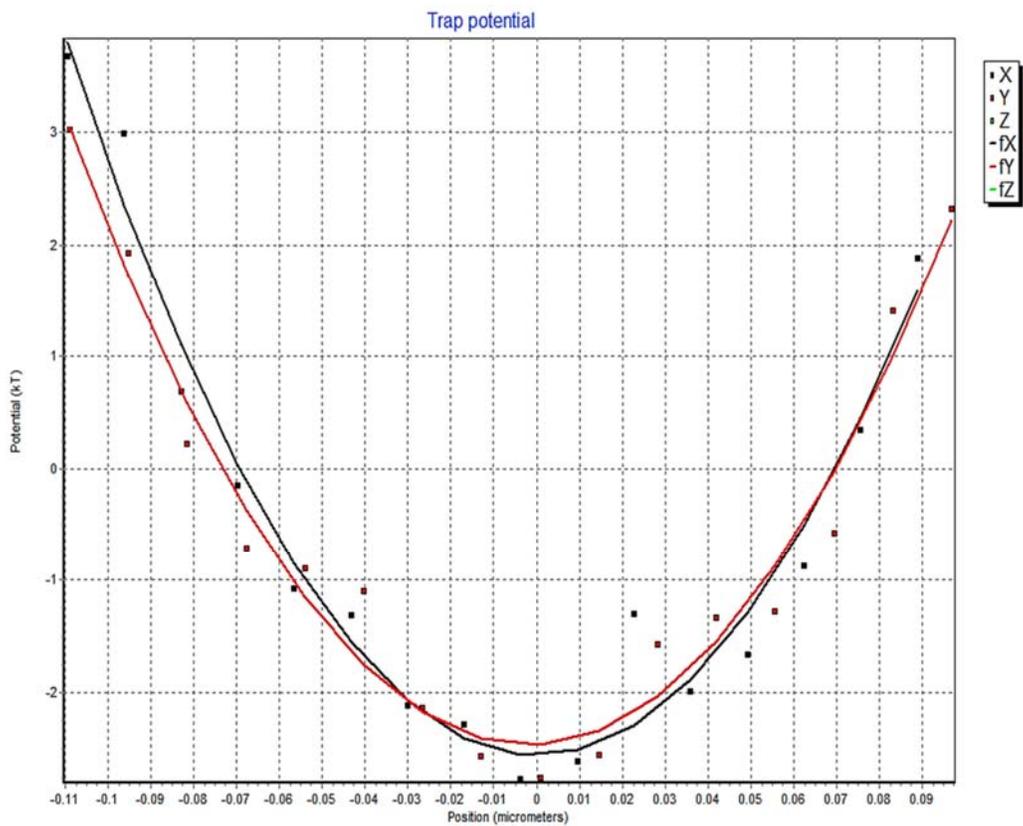


Figura 3. 10. El potencial de atrapamiento (en unidades de $k_B T$)

Posteriormente, los datos de rigidez se exportaron a Excel, se catalogaron y se procesaron en Matlab para realizar los ajustes necesarios. Se realizaron controles para la *C. tropicalis* sin administrar FS ni irradiación con luz (Figura 3.11).

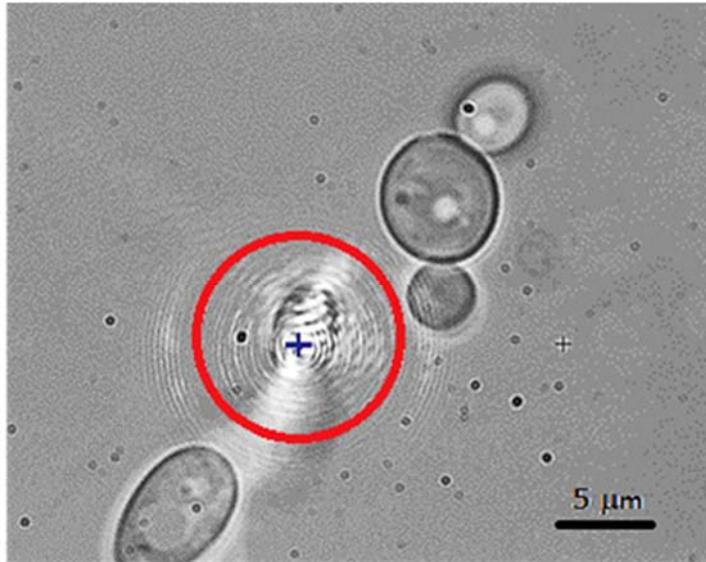


Figura 3. 11. Imagen de la levadura de *C. tropicalis* a analizar para los controles (círculo rojo), en este caso no cuenta con FS ni fue radiada con luz roja, el organelo atrapado con las PO se encuentra marcado por la cruz azul.

3.3.1 Para TFDA convencional:

En esta ocasión, una vez que se ha realizado la TFDA se procedió a colocar la solución de células en una celdilla de aproximadamente 100 μm de profundidad hecha por la unión de un portaobjetos y un cubreobjetos (Figura 3.12) previamente preparada.

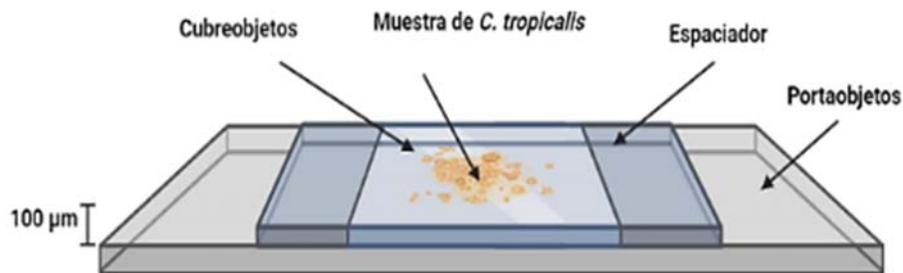


Figura 3. 12. Esquema de las componentes de la celda con la muestra de *C. tropicalis* con TFDA.

El equipo de PO ubicado en el laboratorio de óptica del INAOE corresponde a un microscopio invertido (Elliot scientific E3500 AOD) con un objetivo de 100x, para el

atrapamiento se utilizó un láser Nd-YAG de $\lambda = 1070 \text{ nm}$ y para la detección un diodo láser con $\lambda = 633 \text{ nm}$, así como un QPD, un diodo sensible a la luz dividido en cuatro segmentos iguales, utilizado para detectar cambios en la distribución de intensidad, y una cámara de detección para la obtención de imágenes, todo unido al mismo sistema (Figura 3.13).

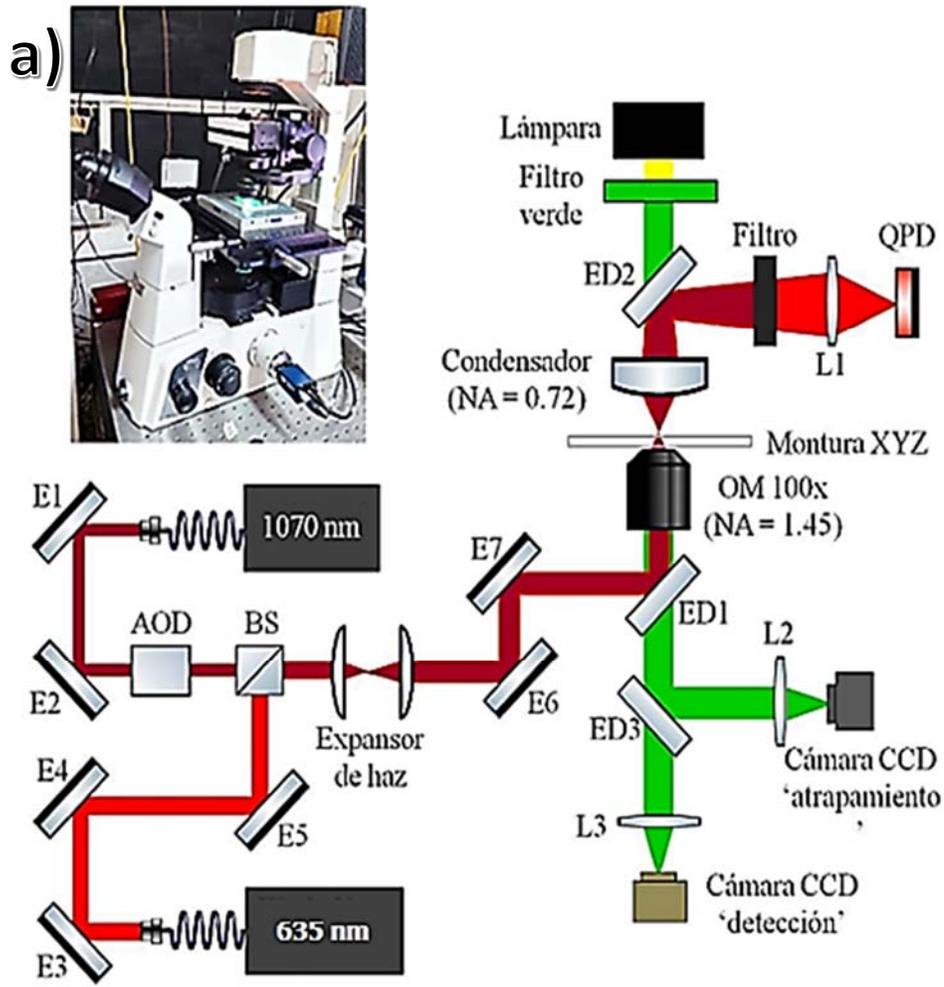


Figura 3. 13. Sistema de pinzas ópticas. Instrumento utilizado para los experimentos en PO (a) así como el esquema de este. Adaptado de (Torres, 2016).

Con el fin de que el cambio de índice de refracción entre el objetivo y el cubreobjetos fuese el mínimo y minimizar las pérdidas por reflexión de luz, el objetivo de microscopio utilizado en este arreglo fue para inmersión en aceite.

Se colocaron $30 \mu\text{l}$ de la muestra en la celda mostrada anteriormente, en el microscopio del sistema de PO. Un organelo dentro de la célula fue atrapado ópticamente y la posición

y la fuerza de captura se midieron utilizando un QPD, con un seguimiento continuo durante 2 horas por intervalos de 10 min.

Para evitar un daño del láser rojo a las células, las mediciones se realizaron en intervalos de tiempo cortos (aproximadamente 5 s), con un tiempo total de 120 min, y desenfocando el haz del láser de detección alrededor de 40 μm al concluir cada medición.

En cada intervalo de medición se obtuvieron datos por triplicado para 15 experimentos dando un total de 45 pruebas.

El QPD además de la cámara de detección permitieron obtener los valores para realizar la cuantificación de la rigidez de la trampa una vez aplicada la TFDA y el seguimiento en imágenes del proceso (Figura 3.14). La potencia utilizada para el atrapamiento corresponde al 20% de la salida total del láser (aproximadamente 1.20 mW desde la salida y 21 μW en la muestra) y a 0.5 mW para el láser de detección.

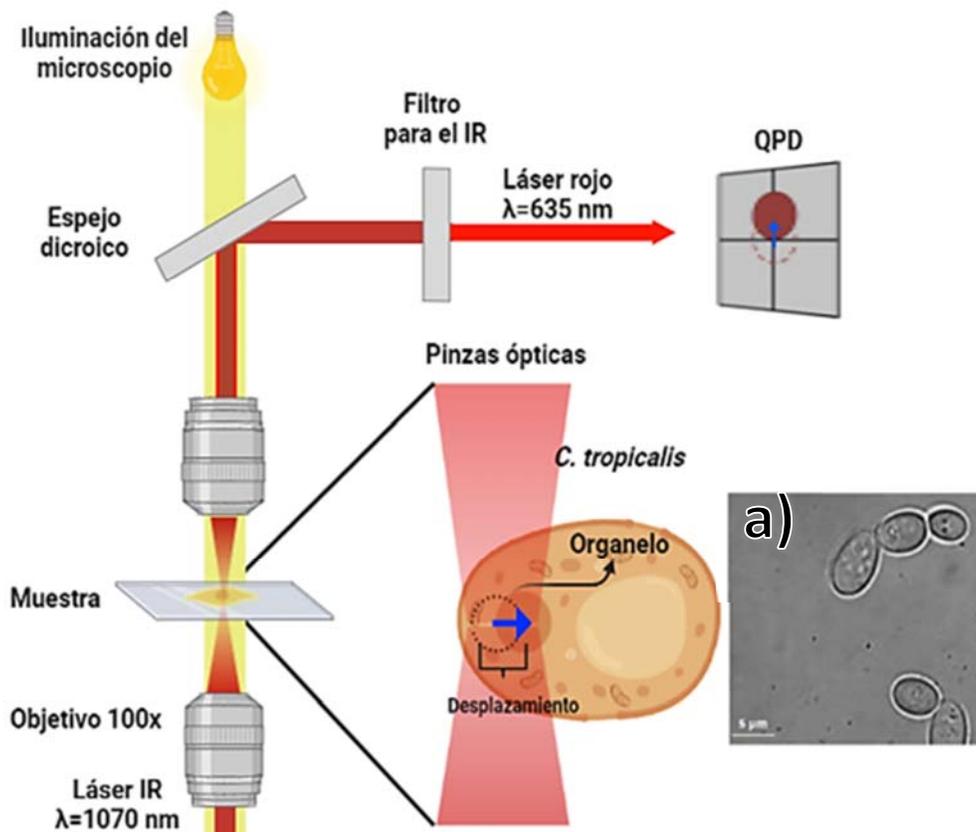


Figura 3. 14. Esquema del atrapamiento para un organelo con el sistema de PO. Ejemplo de la células de *C. tropicalis* (a) observadas en el sistema.

3.3.2 TFDA *in situ*:

La metodología es similar al caso anterior, en este caso, una vez incubada la microplaca, paso 5 de la Figura 3.15, se situó en la celdilla de la Figura 3.12, 30 μ l de solución de un micropozo (concentración aproximada de $0.03 \times 10^6 \frac{\text{cel}}{\text{ml}}$) y se colocó sobre el microscopio de PO.

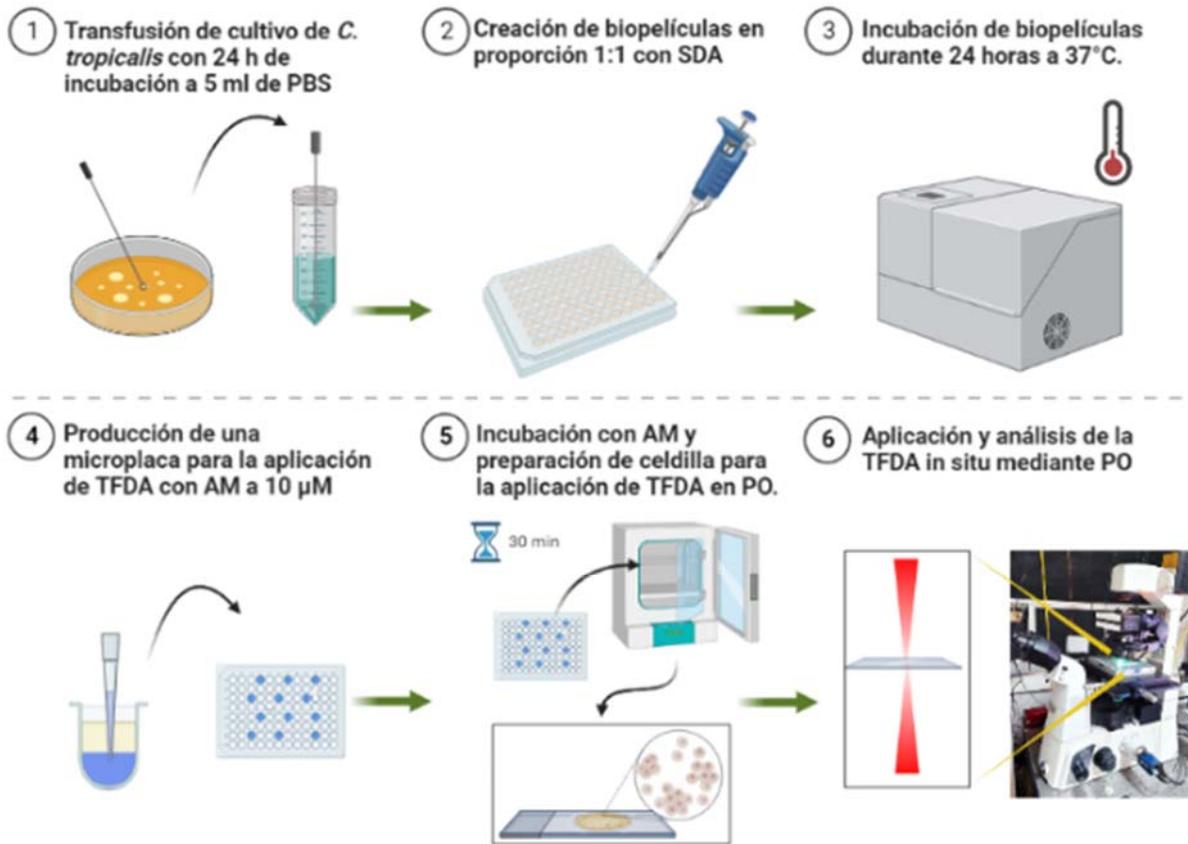


Figura 3. 15. Metodología para la aplicación de TFDA in situ. En este caso después de la incubación en el paso 5 se colocan 30 μ l sobre la celdilla y se analiza el movimiento de un organelo atrapado por las PO mientras se aplica TFDA con el láser de detección.

Se realizó la localización de una célula, con ayuda del objetivo de microscopio del sistema (100x), y se logró capturar un organelo ópticamente.

A continuación, se irradió durante 10 min, 1 min y 15 s consecutivos utilizando el láser de detección con una longitud de onda de 633 nm. Durante este proceso, se monitoreó constantemente la posición y la fuerza de captura, siguiendo el mismo método descrito en el apartado anterior.

Es importante resaltar que se aplicaron las mismas configuraciones de potencia tanto para el atrapamiento como para la detección que en el caso anterior para 7 experimentos por triplicado. Para 3 de estos seguimientos se utilizó una radiación continua de 15 segundos del láser de detección ($\lambda = 633 \text{ nm}$) con el fin de minimizar cualquier daño a la célula, se realizaron en intervalos de 5 min, durante un total de una 30 min.

Para el caso en el que se irradió durante 10 min se utilizó el programa IMAGEJ para analizar el área de las células tratadas utilizando una dosis mayor a los $60 \frac{\text{J}}{\text{cm}^2}$ ($\sim 4215 \frac{\text{J}}{\text{cm}^2}$), en un tiempo total de 10 min y un monitoreo de 25 min.

Se llevaron a cabo 2 experimentos con una irradiación continua de 1 min utilizando el láser de detección (aproximadamente $21 \mu\text{W}$ en la muestra). Posteriormente se desenfocó el microscopio $40\mu\text{m}$, cada vez que se terminaba la medición, y se monitoreo durante 50 min por medio de imágenes.

Se llevaron a cabo 5 experimentos, por triplicado, de aplicación de TFDA con el láser de detección durante 15 s. Se utilizó una potencia de $21 \mu\text{W}$ en la muestra para el proceso de atrapamiento, se atrapó un organelo y después se procedió a desenfocar el láser ($\sim 40\mu\text{m}$) al terminar cada medición las cuales tuvieron una duración aproximada de 5 s cada una. En los 3 casos el láser de detección operó a una potencia de 0.5 mW .

Al finalizar lo anterior, se detectó la trayectoria del organelo mediante el QPD, se importó esta información al software TweezPal para calcular el histograma de posición, el potencial de captura y la rigidez. Posteriormente, los datos de rigidez se exportaron a Excel se catalogaron y se procesaron en Matlab y Origin para realizar las gráficas correspondientes.

4. Resultados

A continuación, se muestran los resultados obtenidos durante la aplicación de TFDA.

Se dividen en tres secciones. La primera de ellas presenta los experimentos realizados con el método convencional de TFDA. En la segunda se presenta el seguimiento de las propiedades mecánicas de las células de *C. tropicalis* utilizando PO, 10 min posteriores a la aplicación de TFDA. Por último, se presenta el seguimiento después de incubar las muestras de *C. tropicalis* y la aplicación de TFDA *in situ*.

Además, se incluyen las gráficas del análisis de resultados, gráficas de los potenciales obtenidos y también se presenta el seguimiento en imágenes para los procedimientos.

4.1 TFDA convencional

Los resultados de la aplicación de TFDA de manera convencional (utilizando el dispositivo rojo, con emisión de $\lambda = 630 \text{ nm}$), donde se evaluó la proporción de muestras de *C. tropicalis* en las placas de agar funcionales en relación con el total de la población (Porcentaje de viabilidad), se presentan a continuación.

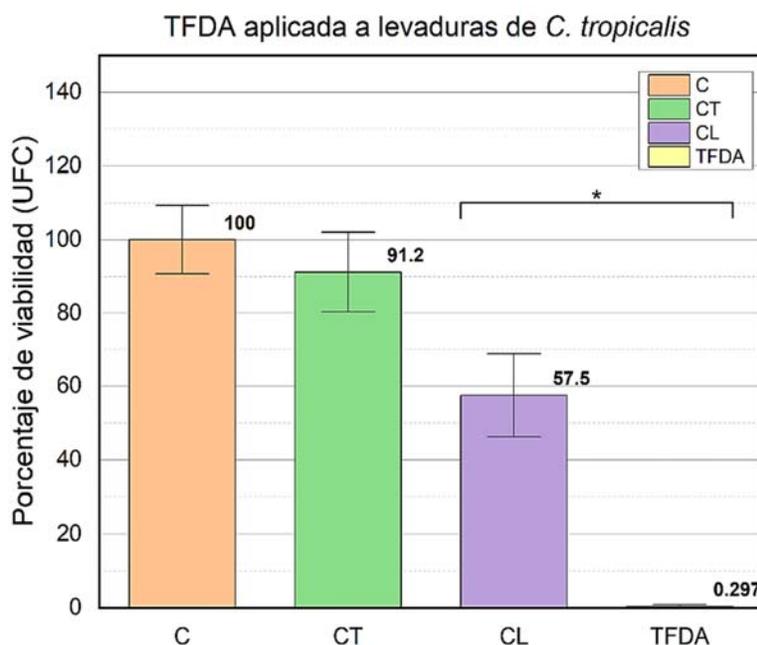


Figura 4. 1. Porcentaje de UFC de los grupos evaluados sobre *C. tropicalis* tipo con AM al $10 \mu\text{M}$ e irradiación de $60 \text{ J}/\text{cm}^2$. Se presentan para cada uno de los grupos los valores de las medias y desviaciones estándar. Así como diferencias significativas ($p < 0.05$) en las comparaciones del grupo de tratamiento con el control de luz y TFDA.

Para todas las gráficas, las barras están basadas en el promedio de las mediciones. La primera, es el control principal C y se tomó como referencia para saber que tanto fueron afectados los demás controles y tratamientos (Figura 4.1).

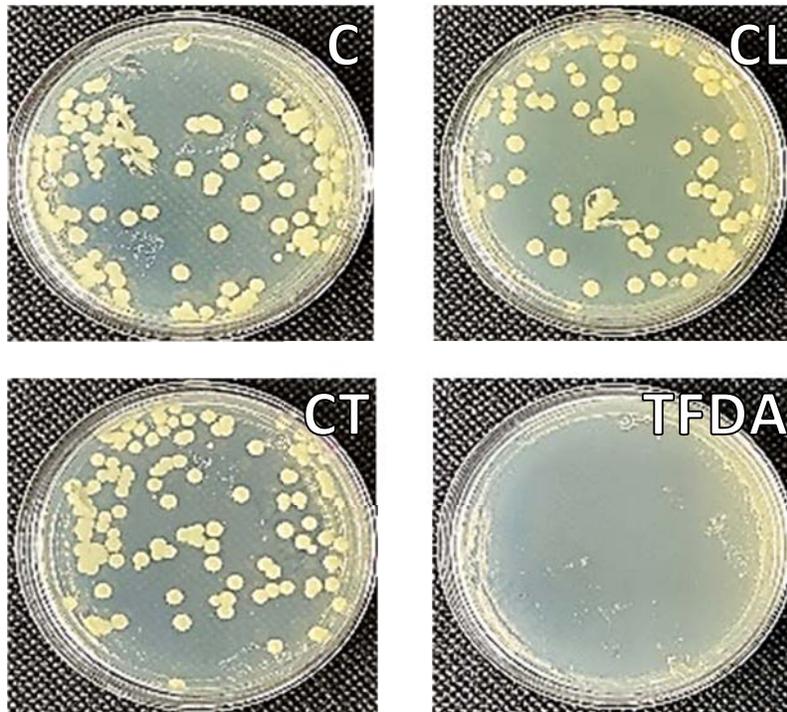


Figura 4. 2. Placas Petri con 24 h de crecimiento posteriores a la aplicación de TFDA. Resultados de UFC de *C. tropicalis*. Los resultados del análisis estadístico ANOVA mostraron que el CL y TFDA fueron significativos con respecto a C. Además, mostraron que el uso de FS no afectó de manera significativa la viabilidad de la cepa (Figura 4.2).

4.2 Muestreo control utilizando PO

Para realizar los experimentos con PO se requirió de una calibración entre el láser de atrapamiento y el láser de detección. Una vez atrapado el organelo, se le dio un seguimiento por un período de 2.5 h con intervalos de mediciones de 5 s cada 10 min.

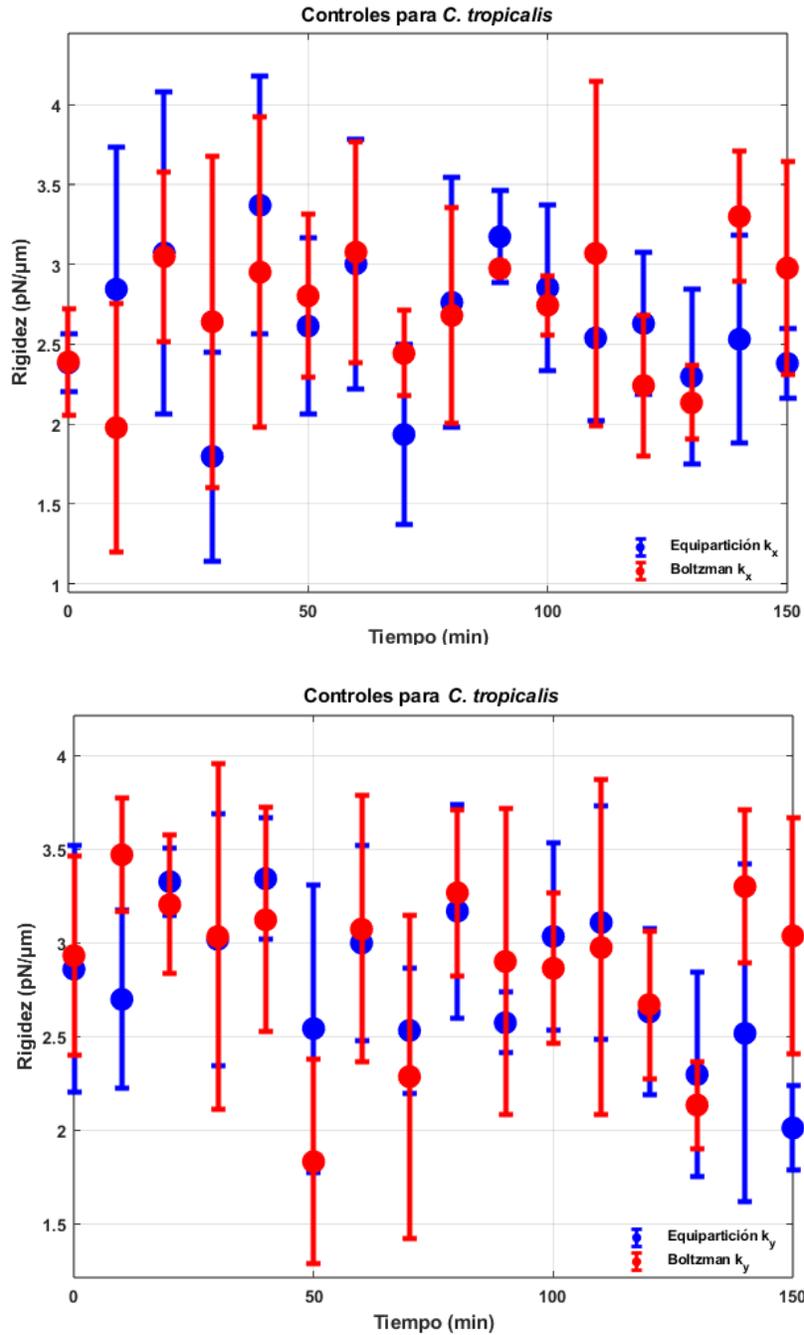


Figura 4. 3. Valores de la rigidez en el tiempo para las coordenadas x y y para ambos métodos. Estos valores representan los controles para *C. tropicalis*, es decir sin FS.

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 4.3, los valores de las posiciones se analizaron mediante el método de equipartición y el de la estadística de Boltzmann, acompañados de sus respectivas imágenes para realizar un seguimiento de su morfología.

Se graficaron los valores para la rigidez de los controles obtenidos con los métodos de medición en la figura 4.4.

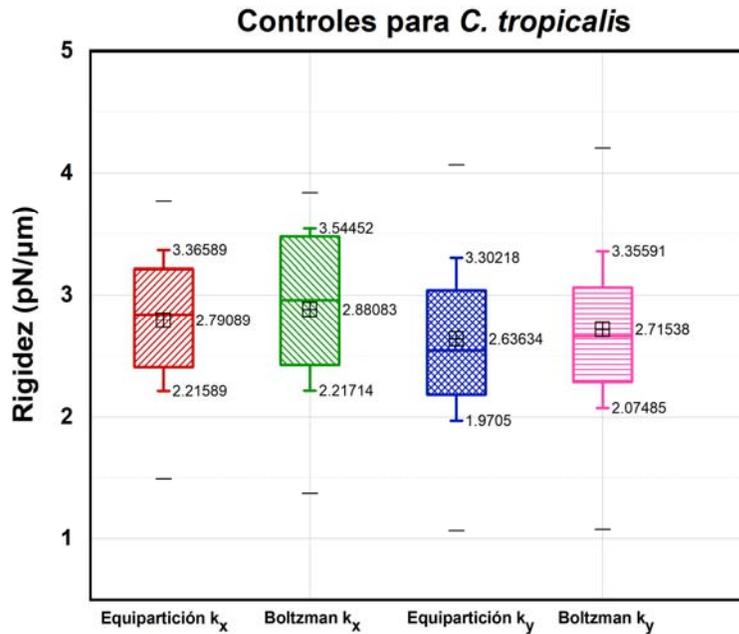


Figura 4. 4. Valores promedio para los controles de *C. tropicalis* utilizando el método de equipartición y la estadística de Boltzmann para ambas coordenadas.

Posteriormente se calculó el promedio total una vez finalizado el tiempo de monitoreo para los controles utilizando PO, así como la desviación estándar, presentada en la tabla 4.1..

Tabla 4. 1. Valores de la rigidez para los controles de *C. tropicalis*.

Rigidez ($\frac{pN}{\mu m}$)			
Equipotencial		Boltzman	
k_x	k_y	k_x	k_y
2.79 ± 0.58	2.63 ± 0.67	2.88 ± 0.66	2.71 ± 0.64

Es importante resaltar que los valores de rigidez en las coordenadas x y y para ambos métodos se obtuvieron mediante la captura de organelos en levaduras ovoides. En

ocasiones, se realizó un seguimiento en hifas y se observó que los controles no mostraron cambios significativos tanto en la rigidez de la trampa como en la morfología celular.

Para el seguimiento en imágenes se tomaron fotografías durante cada medición y se observan a continuación en la figura 4.5.

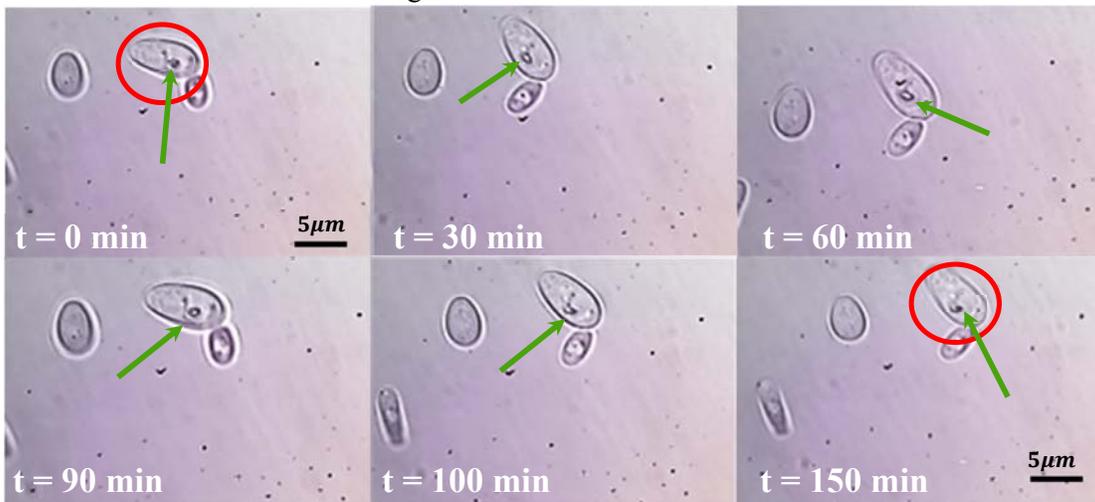


Figura 4. 5. Las siguientes fotografías muestran el seguimiento visual de los controles de *C. tropicalis* utilizando un láser de detección con una potencia de 1 mW y un láser de atrapamiento con una potencia de salida del 20%. En el círculo se encuentra la célula analizada y la flecha verde señala el organelo atrapado utilizando el sistema de pinzas ópticas. No se aprecian cambios significativos en la morfología interna de la célula tratada.

4.3 Medición de las propiedades mecánicas de *C. tropicalis* después de ser sometidas a la TFDA con diodos LED

Una vez aplicada la TFDA se pasó al sistema de PO donde un orgánulo dentro de la célula fue atrapado ópticamente. Se registraron la posición y la fuerza de captura utilizando un QPD, realizando mediciones triples en cada intervalo de tiempo, para un total de 36 pruebas en 12 experimentos.

Para el atrapamiento, se utilizó una potencia equivalente al 20% de la salida total del láser, mientras que el láser de detección operó a una potencia de 0.5 mW. Los resultados de rigidez se presentan en las Figuras 4.6 y 4.7.

Se realizó un ajuste lineal cuya pendiente tuvo un valor de $0.03 \frac{\mu\text{N}}{\text{m min}}$ y el coeficiente de correlación de Pearson es 0.93 y 0.92 para la coordenada x, 0.93 y 0.95 para la coordenada en y para el teorema de equipotencial y el método de la estadística de Boltzman respectivamente.

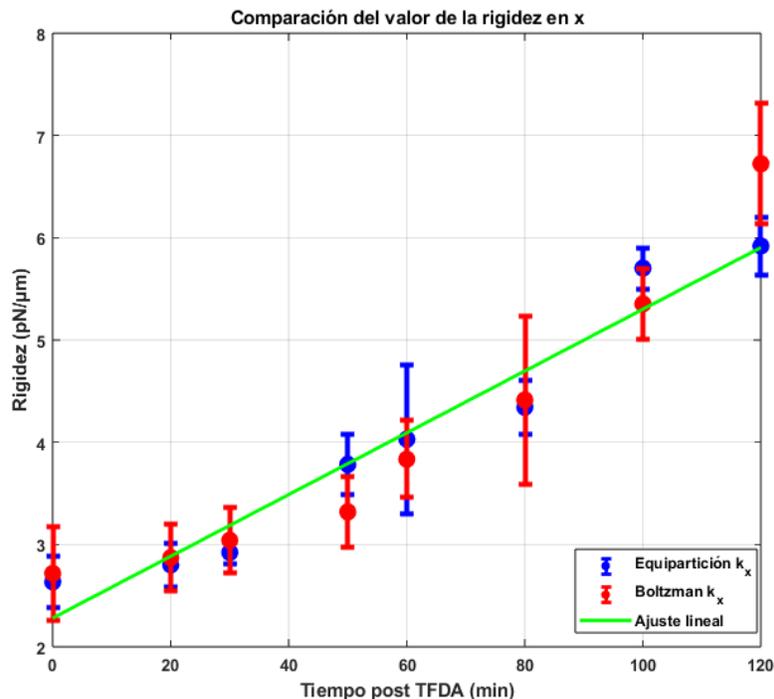


Figura 4. 6. Valores promedio obtenidos para la rigidez una vez aplicada TFDA a *C. tropicalis*, mediante el método de equipartición y estadística de Boltzman para la coordenada en x. Se observa un aumento gradual en la rigidez a medida que transcurre el tiempo después del tratamiento (ajuste lineal en verde).

Se observó una tendencia creciente en los valores de rigidez a medida que pasaba el tiempo después de la aplicación de TFDA. Esto se apreció tanto en las coordenadas x y y

como en los métodos de análisis empleados: el teorema de equipartición y la estadística

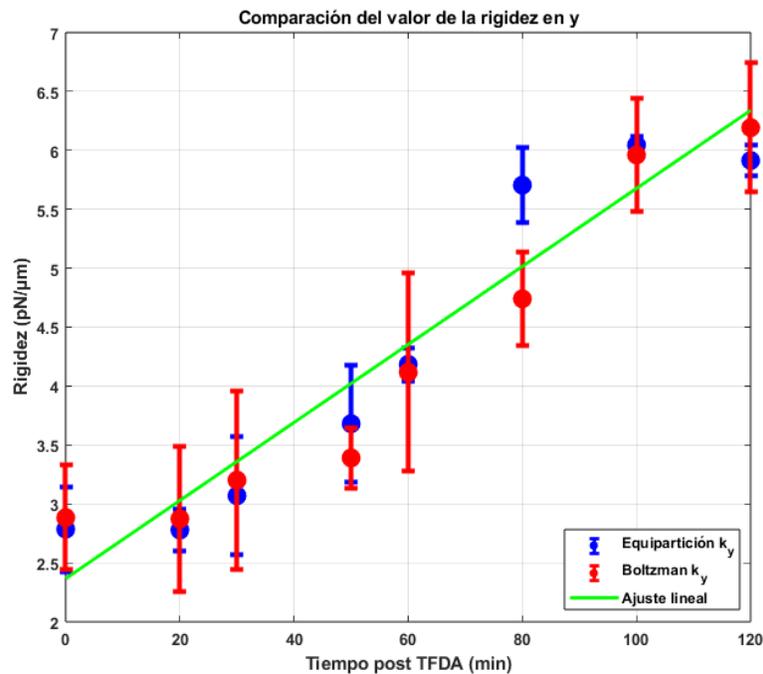


Figura 4. 7. Valores promedio obtenidos para la rigidez una vez aplicada TFDA a *C. tropicalis*, mediante el método de equipartición y estadística de Boltzmann para la coordenada en y. Se observa un aumento gradual en la rigidez a medida que transcurre el tiempo después del tratamiento (ajuste lineal en verde).

de Boltzmann.

Este aumento progresivo en los valores de rigidez sugiere que la TFDA tuvo un efecto significativo en las propiedades mecánicas de las células. Se observó una mayor resistencia y rigidez en las células tratadas, lo que puede ser indicativo de cambios en su estructura y composición interna. Estos hallazgos apuntan a que la TFDA alteró la biomecánica celular de manera generalizada.

Además, al analizar las coordenadas x y y por separado, se observó un comportamiento similar en ambos ejes, lo que fortalece la consistencia de los resultados obtenidos.

Este hallazgo sugiere que la rigidez celular aumentó en todas las direcciones, lo cual es relevante para comprender cómo la TFDA afecta la biomecánica celular.

Los valores de rigidez obtenidos a través del método del teorema de equipartición se utilizaron para calcular los pozos de potencial ($U \sim kx^2$, donde x es el desplazamiento del organelo atrapado desde el centro del QPD).

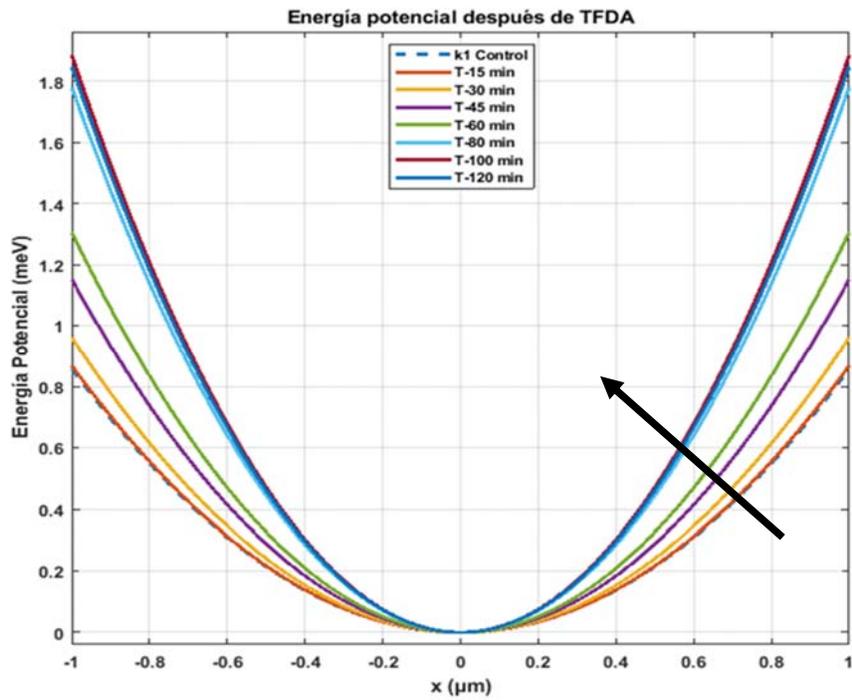


Figura 4. 9. La gráfica muestra los pozos de energía potencial obtenidos a partir de la rigidez utilizando el método del teorema de equipartición para la coordenada x. Podemos observar un aumento en la energía potencial a medida que transcurre el tiempo después de la aplicación de TFDA, destacado por la flecha negra en la gráfica.

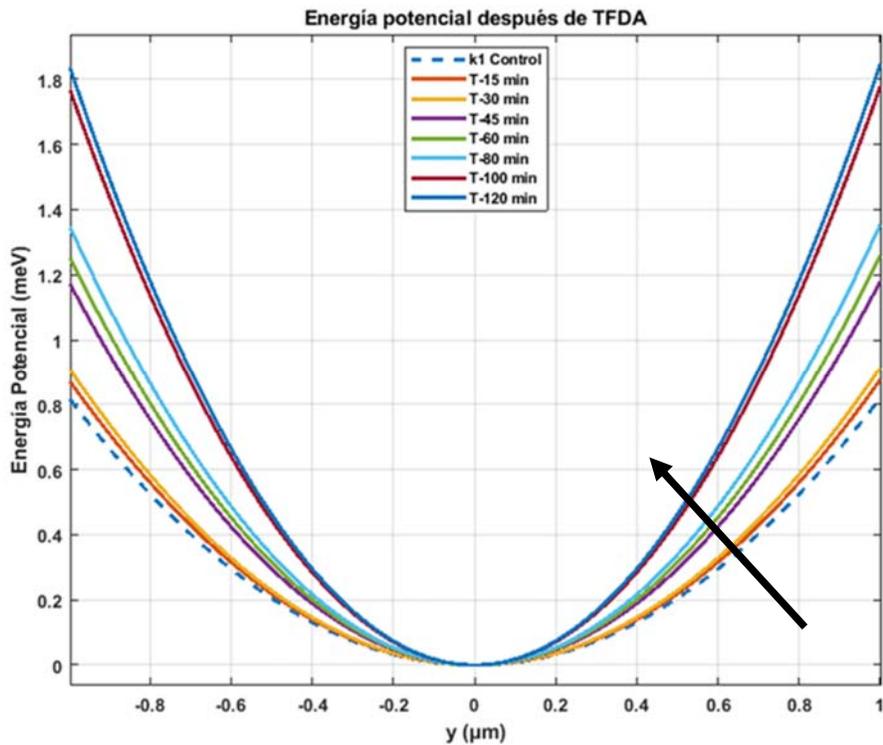


Figura 4. 8. La gráfica muestra los pozos de energía potencial obtenidos a partir de la rigidez utilizando el método del teorema de equipartición para la coordenada y. Podemos observar un aumento en la energía potencial a medida que transcurre el tiempo después de la aplicación de TFDA, destacado por la flecha negra en la gráfica.

Estos cálculos se llevaron a cabo en diferentes momentos después de la aplicación de TFDA con el objetivo de evaluar la evolución de la rigidez celular a lo largo del tiempo. Los resultados se representaron en las gráficas de energía potencial (Figura 4.8 y 4.9), lo que permitió analizar la relación entre los valores de rigidez y la forma de los pozos de potencial.

Durante el análisis de los pozos de potencial en diferentes momentos después de la aplicación de TFDA, se observó cómo la rigidez celular evolucionaba a lo largo del tiempo. Se notó un incremento significativo en el valor de los pozos de potencial en comparación con el grupo de control, que estaba representado por líneas punteadas en azul.

Cuando los pozos de potencial son más amplios y menos profundos en las primeras etapas después del tratamiento, esto sugiere que las células tienen menor rigidez y que los organelos pueden moverse más fácilmente, en otras palabras, es menos restrictivo. Con el paso del tiempo, se vuelven más estrechos y profundos, lo que indica un aumento en la rigidez de las células tratadas. Esto significa que los organelos encuentran una mayor dificultad para desplazarse libremente dentro de la célula.

Estos hallazgos son consistentes con los resultados previos que mostraron una tendencia creciente en los valores de rigidez con el tiempo, después de la aplicación de TFDA. Las gráficas de energía potencial proporcionaron una representación visual adicional para respaldar y comprender mejor esta tendencia.

Las fotografías tomadas durante cada medición para el seguimiento en imágenes se presentan en la Figura 4.10 y Figura 4.11. A partir de los 90 minutos, se observó un cambio morfológico notable en comparación con los primeros 30 minutos posteriores a la aplicación de TFDA.

Durante este período extendido, se pudieron apreciar modificaciones significativas en la estructura y apariencia de la muestra. En particular, cambios en la forma y la organización de las estructuras intracelulares.

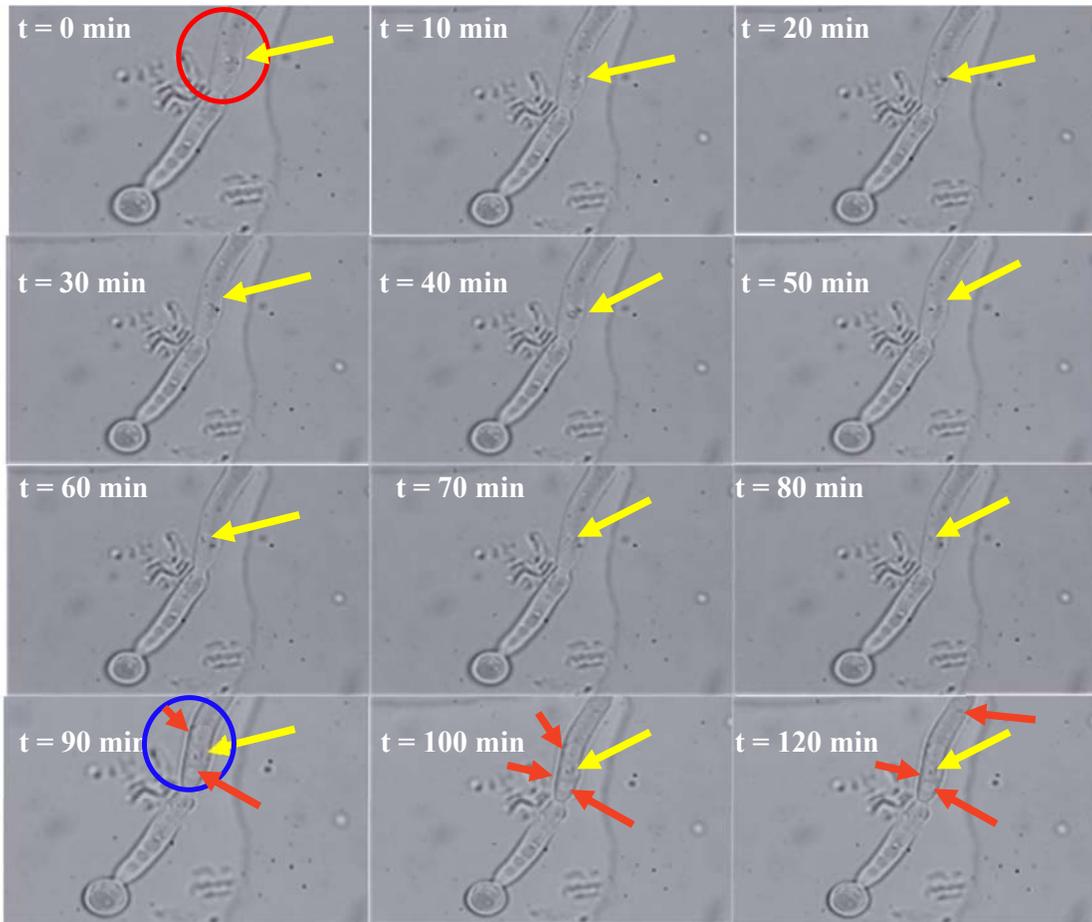


Figura 4. 11. En las siguientes fotografías se presenta la secuencia de aplicación de TFDA en una hifa de *C. tropicalis*. La región monitoreada está destacada por un óvalo rojo, mientras que el organelo atrapado se indica con una flecha amarilla a lo largo de todo el experimento. Se puede observar un cambio en la morfología interna a partir de los 90 min, evidenciado por las flechas naranjas.

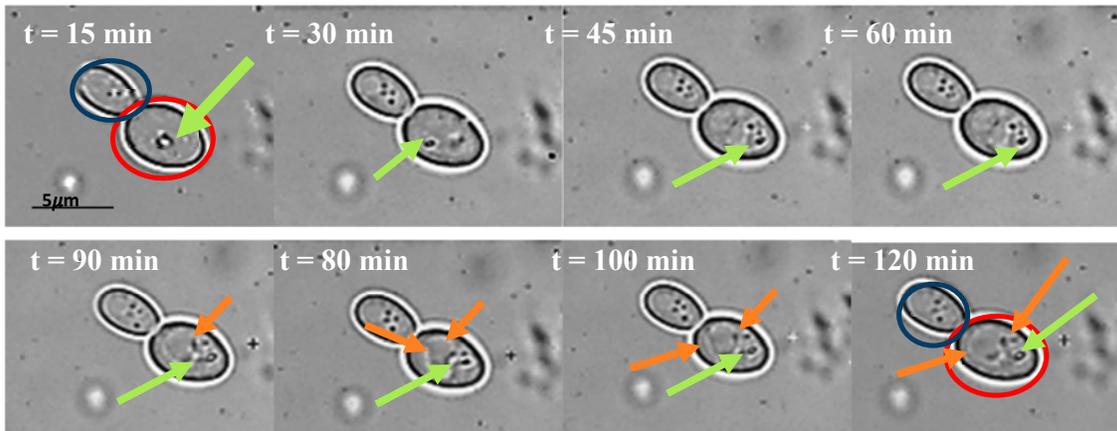


Figura 4. 10. Seguimiento visual de célula de *C. tropicalis* posterior a la aplicación de TFDA . En las imágenes se puede apreciar la célula monitoreada, destacada por el círculo rojo, mientras que el organelo atrapado se muestra mediante una flecha verde. Además, se observan cambios morfológicos identificados por las flechas naranjas a partir de los 90 minutos.

4.4 Medición de las propiedades mecánicas de *C. tropicalis* durante la TFDA *in situ*

En esta ocasión, se obtuvieron datos de pruebas realizadas por triplicado para cada intervalo de mediciones en cuyo caso las células se irradiaron durante 10 minutos, 1 minuto y 15 segundos, respectivamente. Se realizaron un total de 7 experimentos.

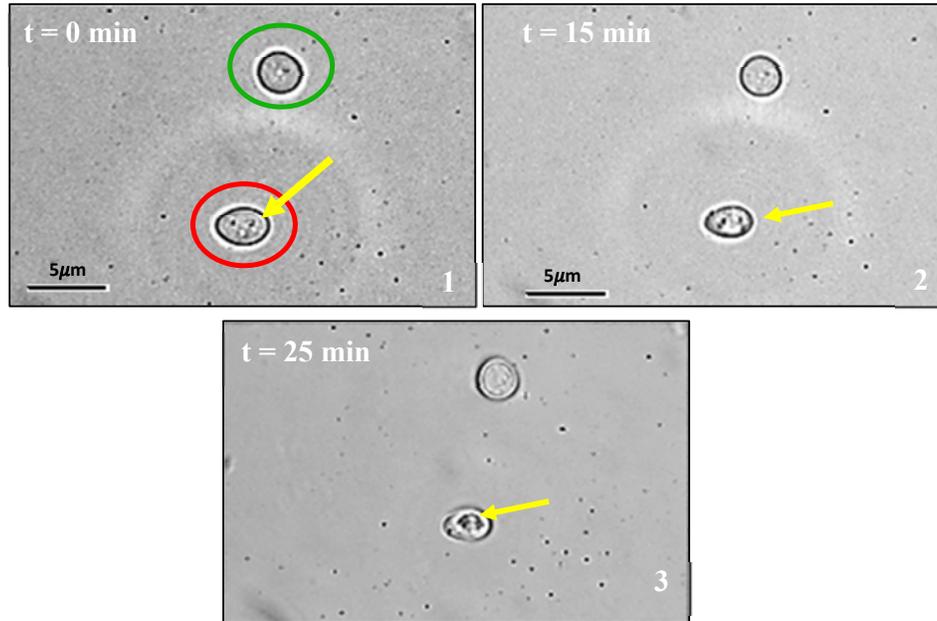


Figura 4. 12. Análisis de TFDA insitu en células de *C. tropicalis*. La célula tratada está representada en color rojo, el organelo atrapado se indica con una flecha amarilla y la célula de referencia está encerrada por un círculo verde.

La primera prueba tuvo un tiempo de exposición de 10 minutos. Las imágenes correspondientes a ella se presentaron en la figura 4.12. En estas fotografías se pudo apreciar el proceso de aplicación de la TFDA individual.

La célula tratada se marcó con un círculo rojo, el organelo atrapado se indicó mediante una flecha amarilla, y la célula de referencia se encerró en un círculo verde. En este caso particular, la célula de referencia no fue irradiada por el láser de detección, sino que solo fue incubada con el FS.

La imagen (1) fue capturada 15 min después de la incubación de *C. tropicalis* con AM a una concentración de 10 μM.

Mediante el uso de IMAGEJ, se encontró una reducción del área ($82.48 \mu\text{m}^2$) de la célula atrapada en un 21.16% ($17.45 \mu\text{m}^2$) mientras que el área de la célula de referencia

($17.20 \mu\text{m}^2$), indicado por el círculo verde, experimentó una reducción del 4.33% ($16.45 \mu\text{m}^2$) en comparación con el tiempo inicial y a partir de 15 min se observaron cambios en la morfología intracelular.

A continuación, se llevaron a cabo dos experimentos con una irradiación continua de 1 minuto utilizando el láser de detección. Las imágenes correspondientes se muestran en la Figura 4.13. Se observó un cambio en la morfología intracelular a partir de los 30 minutos, con una restricción en el movimiento del organelo.

Después de los 50 min, el movimiento ya no fue perceptible por el QPD.

Se llevaron a cabo 5 experimentos de aplicación de TFDA con el láser de detección durante 15 s. Los resultados obtenidos se presentan en las Figuras 4.14 y 4.15. En ella se pudieron observar tres regiones distintas que reflejaron cambios significativos en la rigidez a lo largo del tiempo.

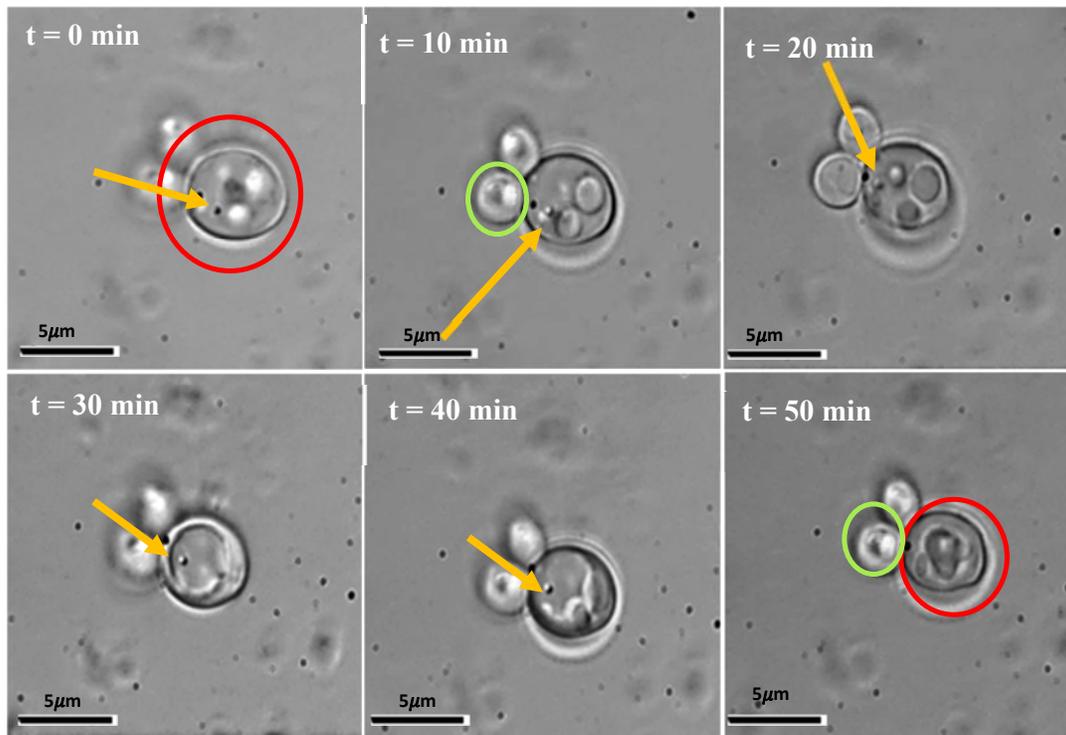


Figura 4. 13. Análisis de TFDA insitu en células de *C. tropicalis* durante 1 min de irradiación. La célula tratada está representada en color rojo, el organelo atrapado se indica con una flecha amarilla y la célula de referencia está delimitada por el círculo verde.

En la primera región, identificada como A-B en ambas gráficas (4.14 y 4.15) el valor de la rigidez fluctúa durante los primeros 20 min de medición.

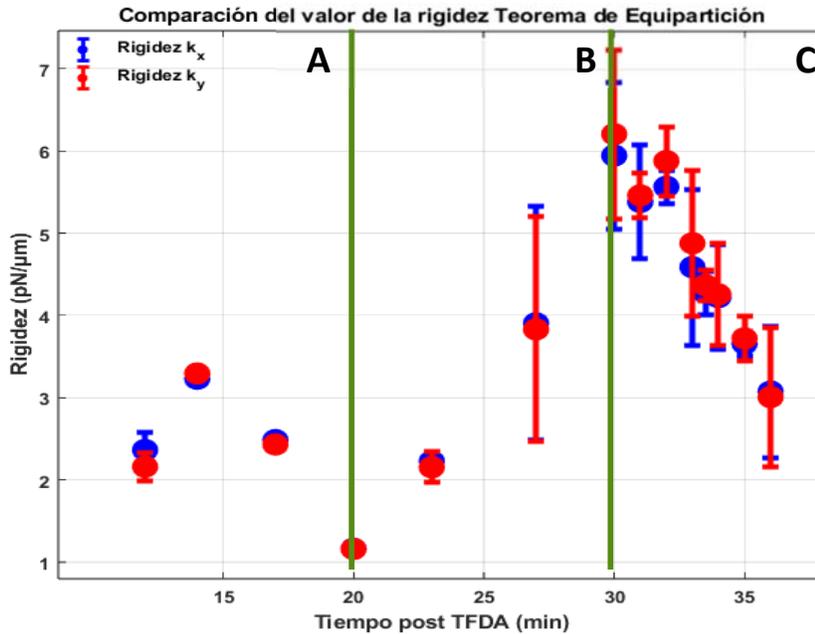


Figura 4. 15. Grafica de los valores de la rigidez posterior a la aplicación de TFDA con el láser de detección durante 10 segundos. Se identifican tres regiones: fluctuación inicial (A-B), incremento marcado (B-C) y estabilización en un nivel constante. Estos cambios representan la evolución de la rigidez a lo largo del tiempo y se analizaron mediante el método del teorema de equipartición.

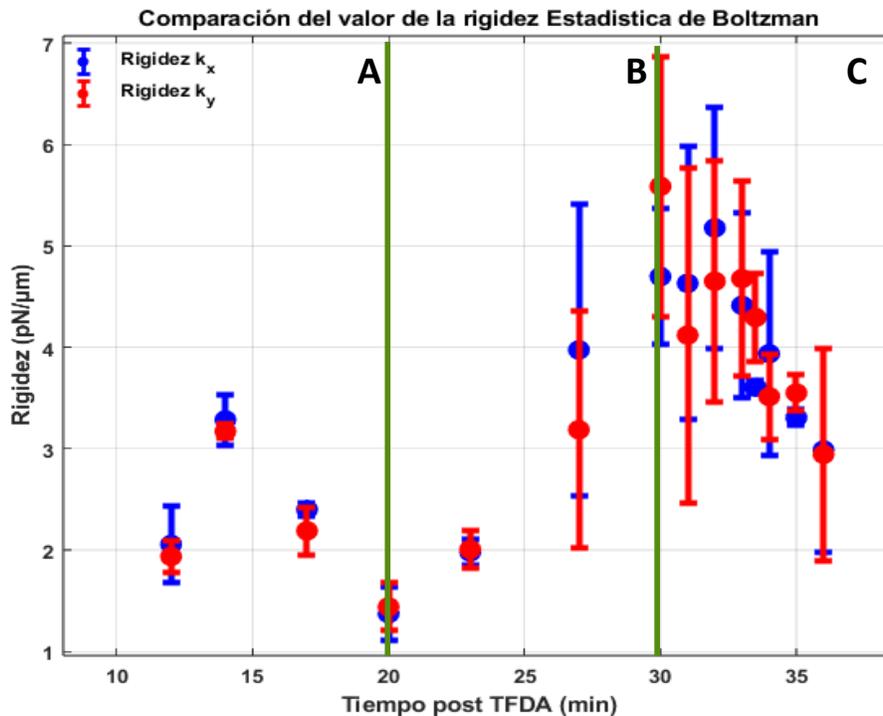


Figura 4. 14. Grafica de los valores de la rigidez posterior a la aplicación de TFDA con el láser de detección durante 10 segundos utilizando el método de la estadística de Boltzman. Se pueden identificar tres regiones distintas: una fluctuación inicial (A-B), un incremento notable (B-C) y una estabilización en un nivel constante al igual que en el caso anterior.

A partir del punto B, se observó un incremento gradual en la rigidez hasta alcanzar un punto máximo a los 30 min, para el método del teorema de equipartición. En el caso del método de la estadística de Boltzman se observó un incremento en la región B-C, pero no corresponde al valor máximo en la coordenada x .

La tercera región comienza a partir del tiempo $t=30$ min, marcada como B-C, donde los valores de la rigidez de las PO comenzaron a variar nuevamente, pero en un rango más estrecho. Sin embargo, a medida que transcurrió el tiempo, se estabilizaron y alcanzaron un valor constante después de los 35 min.

Para el seguimiento en imágenes se tomaron fotografías durante cada medición y se observan a continuación en la figura 4.16.

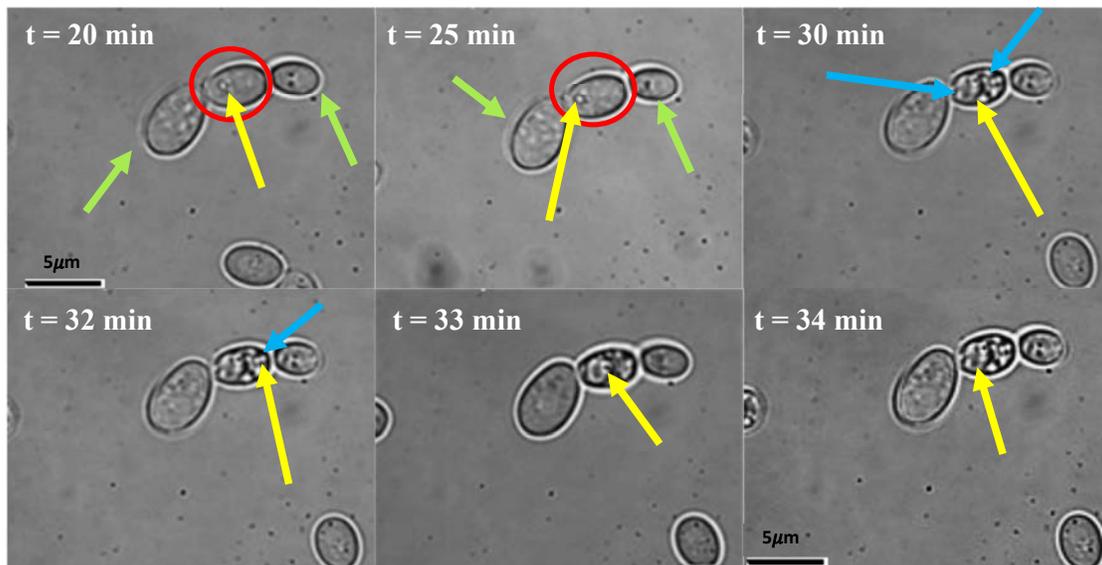


Figura 4. 16. Análisis de TFDA *in situ* en células de *C. tropicalis* durante 10 s de irradiación continua. La célula tratada está representada en color rojo, el organelo atrapado se indica con una flecha amarilla, las células que fueron tomadas como referencia están señaladas por las flechas verdes y las estructuras que limitaron el movimiento de los organelos están marcadas por las flechas azules.

Desde los 30 minutos hasta los 34 minutos, se observó un cambio en la morfología intracelular, donde diferentes estructuras dentro de la célula limitaron el movimiento del organelo (flechas azules en la figura 4.16). Los valores detectados por el QPD se mantuvieron constantes, lo que indicó que el movimiento del organelo ya no era perceptible por el detector.

En las imágenes también se observaron células que sirvieron como referencia y no fueron radiadas por el láser de detección, lo que significó que la TFDA no se activó en ellas. Estas células no mostraron daño aparente.

5. Discusión

A continuación, se interpretaron los resultados obtenidos de la aplicación de TFDA y el monitoreo con PO en células de *C. tropicalis*, enfocándonos en el aumento en la rigidez celular, los cambios en la morfología intracelular y la posible relación con la viscosidad intracelular. Se establecieron conexiones con la literatura existente y se discute el contexto de estos hallazgos en el campo de la mecánica celular y su relevancia para futuras investigaciones sobre la viscosidad celular.

Para la parte de TFDA convencional los resultados obtenidos son consistentes con investigaciones previas realizadas en otras especies de *Candida*, como *C. albicans*, donde la aplicación de TFDA con diferentes fotosensibilizadores como el rosa de bengala y el AM ha demostrado una inhibición significativa en el crecimiento y desarrollo del hongo.

Por ejemplo, en el estudio de Torres-Hurtado et al. (2019), se utilizó una fluencia de 10 – 60 J/cm² y se reportó una inhibición del 99% en células planctónicas. Además, otros estudios como el desarrollado por Hsieh et al. (2018) han utilizado fármacos como el miconazol y como FS a la curcumina para lograr una buena inhibición en diferentes condiciones (una dosis de 9 J/cm²).

La búsqueda de artículos sobre TFDA aplicada en *C. tropicalis* específicamente utilizando AM ha arrojado pocos resultados, y la mayoría de ellos son principalmente en células planctónicas de esta especie.

Al comparar nuestros resultados con estudios previos realizados por Souza et al. (2006) donde se empleó la TFDA con AM a una concentración de 0.1 mg/ml y luz láser de $\lambda = 685$ nm (28 J/cm²), se encontró que la aplicación de TFDA con AM a una concentración de 10 μ M de AM y una dosis de 60 J/cm² reduce significativamente la formación de colonias en comparación con los controles, logrando un porcentaje de inhibición superior al 98% mientras que ellos reportaron una reducción del 82.6 %.

Estos resultados son alentadores, especialmente considerando que se utilizó una dosis similar a la del estudio de Salinas (2021), pero con una cuarta parte de la concentración de AM, lo que sugiere una mayor eficacia de la formulación utilizada en nuestro estudio.

Un aspecto que resaltar es que al revisar el CL se encontró que *C. tropicalis* presenta una susceptibilidad a la luz roja ya que se encontraron diferencias significativas entre C y CL. Es importante considerar que la acción fotodinámica requiere una combinación de fotosensibilizador y luz, por lo que estos resultados sugieren un posible efecto tóxico de la luz en este hongo.

Varios estudios han informado que la irradiación celular con luz visible y su absorción por las moléculas del tejido pueden causar tanto efectos proliferativos como inhibidores, como se presentó en el trabajo de Tiina Karu (1989). Estos resultados concuerdan con las observaciones realizadas por Souza et al. (2006) donde se observó que la aplicación aislada de láser también provocó una reducción en los valores de UFC de *C. tropicalis* y otras cepas.

Este proceso se produce sin la presencia de fotosensibilizadores externos, lo que sugiere que *C. tropicalis* puede contener alguna molécula que actúa como cromóforo y funciona como fotosensibilizador en respuesta a la interacción con la luz roja. Esta observación podría explicarse a través de las cadenas de respiración estudiadas por Tiphlova et al. (1987).

El estudio con PO reveló hallazgos significativos sobre la manipulación de organelos en células de *C. tropicalis*. No solo pudimos manipular los organelos en células de control, sino también en células tratadas con TFDA, lo que amplía las aplicaciones potenciales en estudios celulares.

Es importante mencionar que la manipulación con PO en células fúngicas ya había sido documentada previamente en estudios como el de Wright et al. (2005), centrado solamente en la manipulación de hifas a diferentes dosis de luz sin la utilización de algún FS y el posible fotodaño inducido, pero nuestro enfoque fue innovador al combinar TFDA y manipulación con PO. Esto nos permitió atrapar organelos en células tratadas y observar su movimiento en el citoplasma y poder relacionar la viscosidad intracelular con la muerte celular así como el aumento en la rigidez de la trampa..

Estos resultados son consistentes con los hallazgos previos reportados por Wright et al. (2007) donde se reporta el atrapamiento y manipulación de organelos, en específico vacuolas, en células fúngicas, pero sin medir la viscosidad o producir muerte celular.

Nuestra combinación de técnicas ha permitido una mayor comprensión de los procesos celulares involucrando la relación entre la viscosidad y la rigidez en la respuesta a la TFDA.

Enfatizamos el potencial innovador de las pinzas ópticas para manipular y estudiar organelos en células fúngicas, proporcionando información valiosa sobre su movilidad y dinámica en situaciones de tratamiento. Los cambios observados en la rigidez celular y la relación con la viscosidad intracelular sugieren que la TFDA no solo inhibió la viabilidad celular, sino que también afectó la morfología y rigidez de las PO.

Inicialmente, observamos un aumento en la rigidez de las células tratadas con TFDA, lo que sugiere posibles cambios en la viscosidad intracelular. Estos cambios han sido previamente asociados con la muerte celular inducida por la luz en estudios como el realizado por Kuimova et al (2012), donde relacionaron la muerte fotoinducida con cambios en la viscosidad intracelular utilizando moléculas rotativas para medir y mapear la viscosidad en células vivas.

Este estudio representa un avance significativo en la combinación de técnicas de TFDA y PO, lo cual ha sido poco explorado hasta ahora. Los resultados obtenidos revelan alteraciones en la viscosidad celular tras la aplicación de la TFDA. Estas observaciones están relacionadas con los procesos desencadenados por la exposición a la luz y el uso de AM, lo cual ofrece una perspectiva innovadora para comprender mejor los efectos de la terapia en las células.

La utilización de las PO permitió un seguimiento individual de los efectos de la TFDA, ya que se registraron las posiciones del organelo atrapado mediante el QPD, proporcionando información valiosa sobre la rigidez celular y permitiendo deducir su relación con la viscosidad intracelular y la muerte fotoinducida.

Es interesante notar que a medida que aumenta la rigidez celular, los organelos encuentran más dificultad para moverse libremente dentro de la célula de *C. tropicalis*. Este hallazgo se reflejó en el incremento significativo en los pozos de potencial, obtenidos mediante el análisis de la rigidez a partir del teorema del equipotencial.

Mientras que los controles no mostraron un aumento en el valor de la rigidez, observamos una variación significativa en la morfología y la viscosidad intracelular en las células tratadas, lo que sugiere una respuesta específica al tratamiento. Estos cambios pueden

atribuirse a la presencia del FS en la muestra, lo cual desencadena una reacción fotoquímica en las células, un fenómeno que ha sido previamente documentado por Algorri et al. (2021).

Finalmente, al aplicar la TFDA *in situ*, se observó un aumento en la rigidez celular durante los primeros 30 minutos del tratamiento. Esta asociación entre el aumento de la rigidez y la viscosidad intracelular se encontró respaldada por investigaciones previas, como el estudio realizado por Kuimova et al. (2005). En su investigación, monitorearon la muerte celular fotoinducida por TFD en células de carcinoma de pulmón y observaron un incremento en la viscosidad intracelular.

Estos hallazgos se corroboraron mediante el seguimiento realizado mediante fotografías, siguiendo el tratamiento aplicado, coincidiendo con la investigación de Wright et al. (2007). En su estudio, también observaron cambios en la morfología intracelular durante la manipulación y movimiento de organelos en levaduras (*S. cerevisiae*), atribuyendo estos cambios principalmente al efecto de la luz sin la aplicación de algún tratamiento como la TFDA.

El aumento en la rigidez después de la aplicación de la TFDA puede atribuirse a varios factores. En primer lugar, la activación del FS puede desencadenar una serie de procesos intracelulares, incluyendo la generación de EROs y alteraciones en la homeostasis celular (Granville, 2001). Además, estos procesos pueden implicar la muerte celular por apoptosis (Plaetzer, 2003). Estos cambios pueden afectar la estructura celular, provocando un aumento en la rigidez y, como consecuencia, influir en la viscosidad del citoplasma durante el proceso de muerte celular.

6. Conclusiones

En conclusión, el enfoque experimental utilizado, ha proporcionado una comprensión más completa de la interacción entre la TFDA y la manipulación con pinzas ópticas, para células de *C. tropicalis*.y en el desarrollo de futuras investigaciones en el campo de la biología celular utilizando sistemas de PO y respaldan la relación que se observó entre el aumento en la rigidez celular al avanzar el proceso de muerte fotoinducida y los cambios en la viscosidad intracelular después de la aplicación del tratamiento.

Estos cambios alteran el movimiento browniano de los organelos celulares, lo que se puede considerar como un marcador celular que ofrece una alternativa a las técnicas tradicionales y abre la puerta a una nueva herramienta para la caracterización celular.

La observación de estructuras intracelulares que limitan el movimiento del organelo atrapado, junto con la falta de detección de movimiento posterior, sugiere un posible cambio en la morfología intracelular en respuesta a la muerte fotoinducida.

En conjunto, este trabajo realizó el uso exitoso de las PO como valiosa herramienta en la investigación de levaduras, avanza en el entendimiento de la TFDA y su impacto en células de *C. tropicalis*, y destaca su relevancia para futuros avances en biología celular y terapias antimicrobianas.

7. Trabajo futuro

Es fundamental reconocer las limitaciones presentes en este estudio, incluyendo la falta de control sobre ciertos factores experimentales y el uso de un único modelo celular. Por lo tanto, es necesario abordar estas deficiencias mediante futuras investigaciones que amplíen nuestra comprensión de los mecanismos intracelulares.

En adelante, se pretende seguir explorando y aprovechando las ventajas de las PO en el estudio y manipulación de células microscópicas. Se podría investigar el impacto de diferentes concentraciones de fotosensibilizantes y dosis de luz para determinar sus efectos óptimos en células fúngicas.

Una línea de investigación interesante sería examinar la interacción de las PO con otros tipos de células fúngicas. Esto ampliaría nuestro conocimiento sobre la aplicación de las PO en diversos contextos microbianos y evaluaría su eficacia en el tratamiento de distintas infecciones.

Además, resultaría prometedor investigar el uso combinado de la TFDA con otras terapias, como tratamientos farmacológicos. Esta exploración de tratamientos combinados podría abrir nuevas oportunidades para desarrollar enfoques terapéuticos más efectivos que aborden múltiples aspectos de las infecciones fúngicas. También se podrían realizar estudios para determinar qué tipo de organelo es más propenso a ser atrapado por el sistema de PO, lo que proporcionaría información valiosa para el estudio de la mecánica intracelular.

8. Bibliografía

- Aires, U. d. (2022). *Campus Virtual: Facultad de farmacia y bioquímica*. Obtenido de Campus Virtual: Facultad de farmacia y bioquímica: <https://campus.ffyb.uba.ar/>
- Algorri, J. F.-V.-C.-H. (2021). Photodynamic therapy: A compendium of latest reviews. *Cancers*.
- Anderson, J. M. (1987). Unique phenotype of opaque cells in the white-opaque transition of *Candida albicans*. *Journal of bacteriology*, 5579-5588.
- Antunes, L. I., & Maenza, C. (2004). *Cínica-UNR.org*. Obtenido de Candidiasis invasiva: <https://www.clinica-unr.com.ar/seminarios-centrales/533/533-discu.php>
- Arneborg, N. S. (2005). Interactive optical trapping shows that confinement is a determinant of growth in a mixed yeast culture. *FEMS microbiology letters*, 155-159.
- Ashkin, & Dziedzic, J. (1987). Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science*, 1517-1520.
- Ashkin, A. (1970). Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Physical review letters*, 156-159.
- Ashkin, A. (1992). Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Biophysical Journal*, 569-582.
- Ashkin, A. D. (1986). Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Optics letters*, 288-290.
- Ashkin, A., & Dziedzic, J. M. (1987). Optical Trapping and Manipulation of Viruses and Bacteria. *Science*, 1517–1520.
- Asimov, I. (1979). *100 preguntas básicas sobre la ciencia*. Madrid: Alianza Editorial SA.
- B. A. Brown, a. P. (2001). Optical tweezers: Theory and current applications. *American laboratory*, 13-20.
- Babilas, P. S. (2010). Photodynamic therapy in dermatology: state-of-the-art. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, 118-132.
- Berns, M. W. (1991). Laser microbeam as a tool in cell biology. *International review of cytology*, 1-44.
- Berns, M. W. (1992). Optical trapping in animal and fungal cells using a tunable, near-infrared titanium-sapphire laser. *Experimental cell research*, 375-378.
- Blocka, K. C. (2004). Optical trapping. *American Institute of Physics*, 2789.
- Cárdenes Perera, C. D. (2000). *Repositorio Institucional Universidad de La Laguna*. Obtenido de <http://riull.ull.es/xmlui/handle/915/12396>

- Castano, A. P. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 279–293.
- de Souza, S. C.-I. (2006). Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. . *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 34–38.
- del Rocío Reyes-Montes, M. D.-E.-H.-A.-D. (2017). Current status of the etiology of candidiasis in Mexico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 203-210.
- Deng, Y. B. (2007). Brownian motion in a modulated optical trap. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*.
- Dziedzic, A. A. (1986). Internal cell manipulation using infrared laser. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 7914–7918.
- El-Batawy, Y. M. (2016). *Photodetectors*. Woodhead Publishing.
- Florin, E. L. (1998). Photonic force microscope calibration by thermal noise analysis. *Applied Physics A*, 75-78.
- Franco-Curiel, D. L.-R.-A. (2018). *Estudio comparativo de la candidiasis invasiva en México y España*.
- G. Gouesbet, B. M. (1988). Light scattering from a sphere arbitrarily located in a Gaussian beam, using a Bromwich formulation. *Journal of the Optical Society of America A*, 1427-1443.
- G. Gouesbet, G. G. (1989). On the generalized Lorenz-Mie theory: first attempt to design a localized approximation to the computation of the coefficients gnm. *Journal of Optics*, 31.
- G. Roosen, a. C. (1976). Optical levitation by means of two horizontal laser beams a theoretical and experimental study. *Physics Letters A*, 6-8.
- G.Grehan, G. G. (1999). Generalized Lorenz-Mie theory for assemblies of spheres and aggregates. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*, 706-712.
- Gieseler, J. G.-S.-T. (2021). Optical tweezers from calibration to applications: a tutorial. *Advances in Optics and Photonics*, 74-271.
- Gouesbet, G. (1999). Validity of the localized approximation for arbitrary shaped beams in the generalized Lorenz–Mie theory for spheres. *Journal of the Optical Society of America A*, 1641-1650.
- Granville, D. J. (2001). Photodynamic therapy: shedding light on the biochemical pathways regulating porphyrin-mediated cell death. *Histology and Histopathology*, 309-317.
- Guo, H. &. (2013). Optical tweezers technique and its applications. *Science China Physics, Mechanics and Astronomy*, 2351-2360.
- H. Felgner, O. M. (1995). Calibration of light forces in optical tweezers. *Applied Optics*, 977-982.

- Harada, Y. &. (1996). Radiation forces on a dielectric sphere in the Rayleigh scattering regime. *Optics communications*, 529-541.
- Hemmen, J. v. (1980). A generalized equipartition theorem. *Physics Letters A*, 25-28.
- Hsieh, Y. H. (2018). An in vitro study on the effect of combined treatment with photodynamic and chemical therapies on *Candida albicans*. *International journal of molecular sciences*, 337.
- Huang, D. S. (1991). Optical coherence tomography. *Science*, 1178-1181.
- Huang, G. (2012). Regulation of phenotypic transitions in the fungal pathogen *Candida*. *Virulence*, 251-261.
- Ion, R. M. (2007). Photodynamic therapy (PDT): a photochemical concept with medical applications. *Revue Roumaine de Chimie*, 1093-1102.
- Jones, P. H. (2015). Optical tweezers: Principles and applications. *Cambridge University Press*.
- K. C. Neuman, S. M. (2004). Optical trapping. *Review of Scientific Instruments*, 2787-2809.
- K.F. Ren, G. G. (1994). Radiation pressure forces exerted on a particle arbitrarily located in a Gaussian beam by using the generalized Lorenz-Mie theory, and associated resonance effects. *Optics Communications*, 343-354.
- Karu, T. (1989). Photobiology of low-power laser effects. *Health physics*, 651-704.
- Kuimova, M. K. (2009). Imaging intracellular viscosity of a single cell during photoinduced cell death. *Nature chemistry*, 69-73.
- Kuimova, M. K. (2012). Mapping viscosity in cells using molecular rotors. *Physical Chemistry Chemical Physics*.
- Lock, J. A. (2009). Generalized Lorenz–Mie theory and applications. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 800-807.
- M. Wilson, N. M. (1993). Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. *Journal of oral pathology & medicine*, 354-357.
- Odde, Y. K. (2002). Analysis of Radiation Forces in Laser Trapping and Laser-Guided Direct Writing Applications. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, 131-141.
- Ort, D. R. (1996). *Oxygenic photosynthesis: the light reactions* (Vol. 4). Springer Science & Business Media. Recuperado el Enero 2023
- Padgett., J. E. (2002). Lights, action: optical tweezers. *Contemporary physics*, 241-258.
- Plaetzer, K. K. (2003). The modes of cell death induced by PDT: an overview. *Medical Laser Application*, 7-19.
- Proo., E. C. (2017). *Identificación y caracterización fenotípica de levaduras del género candida aisladas de pacientes*. Puebla: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

- Quindós, G. (2018). Epidemiología de las micosis invasoras: un paisaje en continuo cambio. *Revista Iberoamericana de Micología*, 171-178.
- Salinas, D. A. (2021). *Efecto de la inactivación fotodinámica en la inhibición de biopelículas formadas por Candida spp.* Tesis Doctoral. Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica.
- Sarshar, M. W. (2014). Comparative study of methods to calibrate the stiffness of a single-beam gradient-force optical tweezers over various laser trapping powers. *Journal of Biomedical Optics*.
- Sepulveda, K. V. (2007). Pinzas ópticas: las delicadas manos de la luz. *Ciencia*, 18-25.
- Silva, J. N. (2006). Photodynamic therapies: principles and present medical applications. *Bio-Medical Materials and Engineering*, S147-S154.
- Silva, S. N. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS microbiology reviews*, 288-305.
- Sobel, J. D. (2003). Candidiasis in the intensive care unit. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, 99-111.
- Soll, D. R. (2009). Why does *Candida albicans* switch? *FEMS yeast research*, 973-989.
- Sueli Fumie Yamada-Ogatta, G. N. (2016). *Tópicos especiais em microbiologia*. Londrina: Embrapa Soja-Livro científico.
- Tappeiner, H. V. (1909). Die photodynamische Erscheinung. *Ergebnisse der Physiologie*, 698–741.
- Thompson, D. S. (2011). Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryotic cell*, 1173-1182.
- Thompson, D. S. (2011). Coevolution of Morphology and Virulence in *Candida* Species. *Eukaryotic cell*, 1173-1182.
- Tiphlova, O. &. (1987). Action of low-intensity laser light on transient metabolic processes in cell. *Proceedings of the USSR Academy of Sciences*, 1002-1005.
- Tolić-Nørrelykke, I. M.-S. (2004). Anomalous diffusion in living yeast cells. *Physical Review Letters*.
- Torres, S. A. (2016). *Atrapamiento y manipulación óptica para aplicaciones biológicas*. Puebla: Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica.
- Torres-Hurtado, S. A.-R.-M.-S.-J.-T.-M. (2019). Efficient in vitro photodynamic inactivation using repetitive light energy density on *Candida albicans* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 203-209.
- Tsui, C. K.-R. (2016). Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathogens and Disease*.
- Upadhy, A. Z. (2019). Structured Back focal plane interferometry. *Scientific Reports*.

- Vazquez, J. A. (2003). Invasive oesophageal candidiasis: current and developing treatment options. *Drugs*, 971-989.
- Wainwright, M. (1998). Photodynamic antimicrobial chemotherapy . *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 13–28.
- Weisstein, E. (2023, 06 1). *Wolfram MathWorld*. Obtenido de Wolfram MathWorld: <https://mathworld.wolfram.com/Wiener-KhinchinTheorem.html>
- Wolf, M. B. (1986). *Principles of Optics*. New York.
- Wright, G. D. (2005). Measuring fungal growth forces with optical tweezers. *Optical Trapping and Optical Micromanipulation I*, 101-107.
- Wright, G. D. (2007). Optical tweezer micromanipulation of filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 1-13.
- Y. Chan, C. L. (2003). Bactericidal effects of different laser wavelengths on peridontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers in medical science*, 51-55.
- Yarbus, A. L. (2013). *Eye Movements and Vision*. Springer.

9. Apéndice

Protocolo: Inactivación fotodinámica con PO

Fundamento:

Las PO son instrumentos que ofrecen la capacidad de manipular objetos pequeños sin causar daño, lo que las convierte en una herramienta valiosa para aplicaciones en investigación, medicina y biotecnología. A partir de la década de 1980, se han utilizado en la manipulación de moléculas, virus y bacterias, así como en la manipulación de células sin causarles daño. Estas utilizan un rayo láser altamente enfocado para sostener y mover objetos microscópicos como nanopartículas, micropartículas o células.

El sistema óptico se basa en el uso de un microscopio con un objetivo sumergido en aceite, a través del cual se hace pasar un haz de luz. Esta configuración permite enfocar el haz directamente sobre el objeto que se desea capturar. De esta forma las fuerzas ejercidas por los rayos procedentes del haz permiten focalizar el haz en el objeto que se desea capturar.

Materiales:	Equipo:
<ul style="list-style-type: none">• Mechero de alcohol• Micropipeta• Puntas para micropipeta 200 y 1000 μL• PBS• Guante estéril• Cultivo de la cepa con la se trabajara (de al menos 1 día de incubación)• Frascos estériles (Por lo menos 2)• 1 filtro estéril• Cámara de Neubauer• Micro placa• Asa para cultivo	<ul style="list-style-type: none">• Laser• Pinzas ópticas Elliot scientific E3500• Microscopio• Horno de incubación• Cámara Neubauer

<ul style="list-style-type: none"> • Placas para sembrar (medio agar dextrosa Sabouraud) • Papel Parafilm 	
---	--

Procedimiento:

- Limpiar el área de trabajo con alcohol y colocar por 2 minutos los mecheros y siempre permanecer en el área estéril.
- En un frasco estéril colocar 5 ml de PBS y tomar 200 μL de la suspensión del microorganismo del cultivo en microplaca con 24 horas de crecimiento.
- Realizar el conteo en cámara de Neubauer y hacer las diluciones necesarias para obtener una concentración de 12×10^5 o mayor (C1).
- Colocar 50 μl de la solución C1 bien mezclado y 50 μl de fotosensibilizador en los pozos a radiar (Imagen 1 diodo rojo)

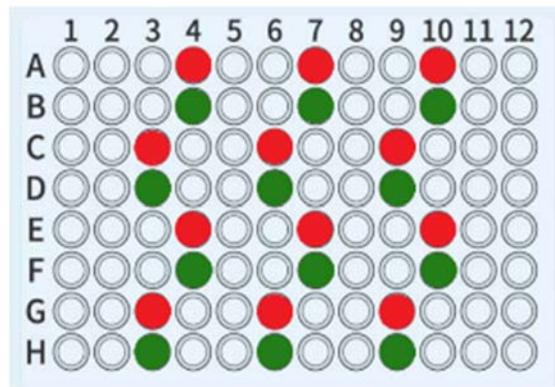


Imagen 1. Microplaca con ubicaciones de los pozos a radiar. Círculos rojos: Terapia fotodinámica con led rojo para el fotosensibilizador azul de metileno.

- Incubar antes de radiar, por 30 min, en este caso se debe de tapar la micro placa con aluminio flameado (se rocía alcohol en el papel aluminio y se acerca al fuego esperar a que el fuego se consuma).
- No irradiar los controles ya que son la referencia del experimento así que se siembran después de la incubación en placas Petri.
- Después de radiar tomar los 100 μl de cada pozo y sembrarlos en placa Petri por estría masiva.

- Tomar 30 μl de cada un pozo radiado y colocarlo en un cubreobjetos con cinta doble cara (Imagen 2).

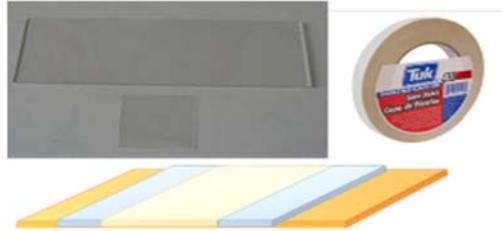


Imagen 2. Materiales necesarios para las muestras utilizadas en pinzas ópticas.

- Ubicar el cubreobjetos boca abajo en el objetivo de microscopio de las pinzas y proceder a la observación y atrapamiento (Imagen 3).

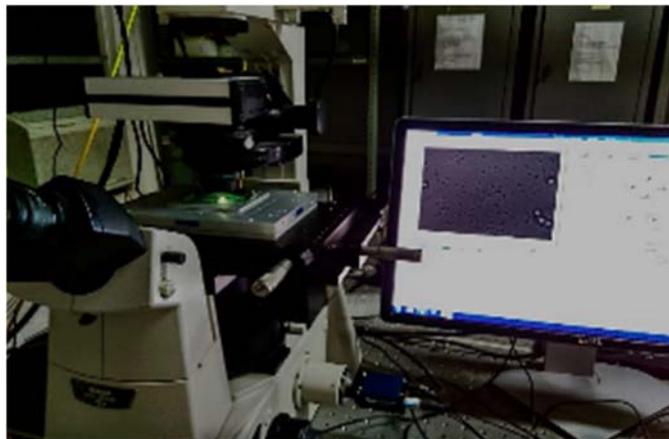


Imagen 3. Sistema de pinzas ópticas.