



**I  
N  
A  
O  
E**

# **ATRAPAMIENTO Y MANIPULACIÓN ÓPTICA PARA APLICACIONES BIOLÓGICAS**

por

**M. C. Susana Alejandra Torres Hurtado**

Tesis sometida como requisito parcial  
para obtener el grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS  
EN LA ESPECIALIDAD DE ÓPTICA**

en el

**Instituto Nacional de Astrofísica,  
Óptica y Electrónica  
Diciembre de 2016  
Tonantzintla, Puebla**

Supervisada por:

**Dr. Rubén Ramos García**  
Investigador Titular del INAOE

**©INAOE 2016**

Derechos reservados

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



## **DEDICATORIA:**

A las guerreras de la familia que lucharon por su vida, mi hermana *Ana Gabriela* y mi sobrinita *Flor del Carmen*. Demostraron al mundo que se puede seguir adelante a pesar de las adversidades.

## AGRADECIMIENTOS:

A mis padres, *Manuel Torres* y *Francisca Hurtado*, por su amor incondicional. Papis, gracias por compartir conmigo el día de mi examen de doctorado, ¡son los mejores! A mis hermanas, *Karla María*, *Lilia Lucía*, *Ana Gabriela* y *Teresa Guadalupe “Jesús”*, por su cariño y por motivarme para seguir adelante. A mis sobrinos, *Manuel* y *Flor del Carmen*, por toda la felicidad que nos han dado. Familia: gracias por creer en mí y por todo el apoyo que me han brindado durante estos años fuera de casa.

A mi novio *Jorge A. Zavala S.*, por ser una de las personas más importantes de mi vida y motivarme a seguir creciendo personal y profesionalmente. ¡Gracias por leer mi tesis!

Al *Dr. Rubén Ramos*, por guiarme durante todos estos años y por su tiempo para asesorar mi trabajo de doctorado. A mis sinodales, *Dr. Héctor Hugo Cerecedo Núñez*, *Dr. Roger Chiu Zárate*, *Dr. Ulises Ruiz Corona*, *Dr. Julio César Ramírez San Juan*, y en especial, a la *Dra. Teresita Spezzia Mazzocco*, por tomarse el tiempo de contribuir en mi tesis.

Al *INAOE* y al *CONACyT*, por permitir que siguiera estudiando el doctorado y así superarme profesionalmente, sin su apoyo no lo habría logrado. También a la *Universidad de California, Irvine*, por abrirme las puertas durante mi estancia en el laboratorio del Departamento de Biología Celular y del Desarrollo. Al *Dr. Steven Gross*, por su asesoría durante mi estancia, y al *Dr. Babu Reddy*, por su paciencia y el apoyo brindado. En general, a todo el personal de las instituciones participantes para el desarrollo de mi tesis.

A mis amigos y compañeros de grupo de trabajo, por formar parte de mis aventuras, por ayudarme y aconsejarme en momentos difíciles de dudas existenciales o académicas.

Finalmente, quiero agradecer a *Dios* por darme la oportunidad de convertirme en Doctora en Ciencias en la Especialidad de Óptica, y a cada una de las personas que puso en mi camino para lograr este sueño.

## RESUMEN

Las pinzas ópticas son un mecanismo de captura y manipulación óptica no invasiva que se han convertido en una herramienta muy versátil en biología y medicina. Un sistema de pinzas ópticas es capaz de clasificar, direccionar y transportar cualquier objeto nano/microscópico, el cual generalmente utiliza potencias bajas y un rango de longitud de onda de ~750-1200 nm, para evitar daño en materiales biológicos.

Este trabajo se enfocó en el análisis de los efectos de pinzas ópticas en presencia de efectos térmicos y aplicaciones con material biológico. Primero, se trabajó en el atrapamiento y manipulación óptica de micropartículas, por corrientes de convección causadas por la absorción de un haz en una película de a-Si:H. Por debajo de 3 mW las micropartículas son atrapadas en el centro del haz, entre 3 y 11 mW se juntan alrededor del haz formando un anillo por la competencia de dos fuerzas: Stokes y termoforética, y por arriba de 12 mW se forma una burbuja de vapor capaz de atraparlas alrededor de ella.

Después, se trabajó en el estudio de la proteína K560 unida a una nanopartícula, dentro de una celda de flujo con microtúbulos y partículas de 800 nm (como referencia para encontrar una distancia aproximada de la nanopartícula respecto al microtúbulo, usando el método 'template matching'), adheridas a la superficie. Con esto, se determinó el tiempo que le toma a la proteína unirse al microtúbulo, dependiendo de la distancia a la que se encuentra la nanopartícula de él.

Y por último, se trabajó con hongos dermatofitos de la especie *Trichophyton mentagrophytes*, tratados con terapia fotodinámica antimicrobiana (aPDT), usando azul de metileno como colorante y un láser HeNe como fuente de luz. El hongo fue irradiado con 60 J/cm<sup>2</sup>. Después se analizó el crecimiento, cambios morfológicos y elasticidades, utilizando pinzas ópticas, en hongos sanos y en hongos tratados con aPDT.

## ABSTRACT

Optical tweezers are a noninvasive optical trapping and manipulation mechanism that have become a powerful tool, in biology and medicine. An optical tweezers system is capable of sort, guide and transport nano/microparticles, which generally uses low power and a wavelength range of ~750-1200 nm, in order to avoid damage in biological materials.

This work was focused on the analysis of optical tweezers in presence of thermal effects and applications with biological material. First, we worked on optical trapping and manipulation of microparticles, by convection currents caused by the absorption of a beam in an a-Si:H film. Below 3 mW, the microparticles are trapped in the center of the beam, between 3 and 11 mW accumulate around the beam forming a ring by competition of two forces: Stokes and thermophoretic, and above 12 mW a gas bubble is formed and it is able to trap them around it.

Then, we worked on the study of K560 protein bound to a nanoparticle, inside a flow cell with microtubules and particles of 800 nm (as reference to find an approximate distance from the nanoparticle to the microtubule, using the 'template matching'), attached to the surface. In this way, we determined the time that the protein takes to bind to the microtubule, depending on the distance from which the nanoparticle is located.

Finally, we worked with dermatophyte fungi of the family *Trichophyton mentagrophytes*, treated with antimicrobial photodynamic therapy (aPDT), by using methylene blue as a colorant and a HeNe laser as a light source. The fungus was irradiated with 60 J/cm<sup>2</sup>. Growth, morphological changes and elasticity were analyzed using optical tweezers, in both healthy fungi and treated fungi with aPDT.

# ÍNDICE GENERAL

<b>Resumen</b> .....	<b>i</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>ii</b>
<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>vii</b>
<b>Índice de Tablas</b> .....	<b>x</b>
<b>Nomenclatura</b> .....	<b>xi</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
Objetivo general.....	3
Objetivos específicos .....	3
Organización de la tesis .....	4
<b>Capítulo 1. Mecanismos de captura y manipulación óptica</b> .....	<b>6</b>
1.1 Pinzas ópticas .....	6
1.1.1 Fuerzas que actúan sobre la partícula .....	7
1.1.1.1 Régimen de rayos ópticos, $dp \gg \lambda$ .....	7
1.1.1.2 Régimen de Rayleigh, $dp \ll \lambda$ .....	8
1.1.2 Métodos de medición de fuerza.....	9
1.1.2.1 Método de fuerza de arrastre.....	10
1.1.2.2 Teorema de Equipartición.....	11
1.1.2.3 Método pasivo de densidad espectral de potencia .....	12
1.1.2.4 Método activo de densidad espectral de potencia.....	13
1.1.2.5 Método de cambio de momento de la luz .....	14
1.2 Captura electrocinética .....	15
1.2.1 Fuerza dielectroforética .....	17
1.2.2 Campo eléctrico de carga espacial.....	18
1.3 Termoforesis.....	20
1.3.1 Fuerzas termoforética .....	21
1.3.2 Corrientes de convección.....	22

1.4	Otras técnicas de manipulación.....	25
1.4.1	Pinzas optoelectrónicas.....	25
1.4.2	Magnetoforesis.....	25
1.4.3	Electroosmosis.....	25
1.4.4	Microfluídica.....	26
1.4.5	Optofluidos.....	26

**Capítulo 2. Corrientes de convección y fotoforesis generados por láser ..... 27**

2.1	Materiales y métodos.....	28
2.1.1	Celda utilizada en los experimentos.....	28
2.1.1.1	Micropartículas de óxido de silicio.....	28
2.1.1.2	a-Si:H.....	28
2.1.2	Arreglo experimental.....	29
2.2	Resultados.....	31
2.2.1	Captura de una sola micropartícula.....	31
2.2.2	Captura y manipulación de múltiples micropartículas.....	32
2.2.2.1	Captura por corrientes de convección.....	32
2.2.2.2	Captura por corrientes de convección y fotoforesis.....	33
2.2.2.3	Manipulación de micropartículas.....	35
2.2.3	Captura mediante una burbuja de vapor.....	35
2.2.4	Manipulación mediante un anillo de luz generado con un SLM.....	36
2.3	Simulaciones.....	38
2.3.1	COMSOL Multiphysics.....	38
2.3.2	Transferencia de calor.....	40
2.3.3	Ecuaciones de Navier-Stokes.....	44
2.3.4	Seguimiento de la trayectoria de partículas.....	48
2.4	Discusión y conclusiones.....	51

**Capítulo 3. OT en motores moleculares: estudio *in vitro* de la proteína K560.... 53**

3.1	Antecedentes.....	54
3.2	Materiales y métodos.....	58

3.2.1	Proteína K560.....	58
3.2.2	Celda de flujo.....	58
3.2.2.1	Colocación de los microtúbulos en la celda.....	59
3.2.2.2	Solución de la proteína K560.....	59
3.2.3	Arreglo experimental.....	60
3.2.4	Motilidad activa <i>in vitro</i> de la proteína K560.....	62
3.3	Resultados.....	64
3.3.1	Proteína K560 individual moviendo la nanopartícula.....	64
3.3.2	Motilidad de la proteína K560 variando la distancia al microtúbulo ....	66
3.3.3	Relación de la distancia de la proteína K560 al microtúbulo .....	70
3.4	Discusión y conclusiones .....	72
<b>Capítulo 4. aPDT en dermatofitos: efectos sobre <i>T. mentagrophytes</i> .....</b>		<b>74</b>
4.1	Antecedentes .....	75
4.1.1	Dermatofitos .....	77
4.1.2	aPDT .....	79
4.2	Materiales y métodos.....	80
4.2.1	Dermatofito.....	80
4.2.2	Proceso aPDT .....	80
4.2.2.1	Fuente de luz .....	81
4.2.2.2	PS .....	81
4.2.3	Sistema de OT.....	82
4.2.3.1	Monitoreo del crecimiento de <i>T. mentagrophytes</i> .....	84
4.2.3.2	Evaluación <i>in vitro</i> de los efectos de la aPDT .....	84
4.3	Resultados .....	85
4.3.1	Monitoreo del crecimiento de <i>T. mentagrophytes</i> .....	85
4.3.2	Evaluación de los efectos de la aPDT en <i>T. mentagrophytes</i> .....	87
4.3.2.1	Cambios en la morfología.....	87
4.3.2.2	Cambios en las propiedades viscoelásticas.....	89
4.4	Discusión y Conclusiones .....	90



<b>Capítulo 5. Conclusiones generales .....</b>	<b>93</b>
<b>Trabajo a futuro.....</b>	<b>95</b>
Efectos térmicos en pinzas ópticas .....	95
Efectos de la proteína tau en el transporte intracelular .....	95
Efectos de la aPDT en microorganismos .....	96
<b>Trabajo derivado del proyecto de tesis .....</b>	<b>97</b>
Publicaciones .....	97
Proceedings .....	97
Memorias .....	98
Estancia en el extranjero .....	98
<b>Apéndice A. Velocidad de la micropartícula .....</b>	<b>99</b>
A.1 Seguimiento de la partícula.....	99
A.2 Cálculo de la velocidad .....	100
<b>Apéndice B. Preparación de la celda de flujo con la proteína K560 .....</b>	<b>104</b>
B.1 Limpieza de los cubreobjetos .....	104
B.2 Recubrir los cubreobjetos con poli-L-lisina .....	105
B.3 Componentes base para la elaboración de las soluciones .....	106
B.4 Protocolo para la preparación de microtúbulos .....	108
B.5 Protocolo para recubrir nanopartículas con Anti-His.....	109
B.6 Protocolo para el ensayo con la proteína K560.....	110
<b>Apéndice C. Análisis de los datos de LabVIEW para la proteína K560.....</b>	<b>112</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>117</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIG. 1.1.</b> Primera observación experimental sobre pinzas ópticas .....	6
<b>FIG. 1.2.</b> Diagrama de fuerzas sobre la partícula situada fuera de eje.....	8
<b>FIG. 1.3.</b> Las OT actúan como un resorte de Hook lineal.....	10
<b>FIG. 1.4.</b> Principio básico de los fenómenos de electroforesis y dielectroforesis.....	16
<b>FIG. 1.5.</b> Comportamiento del factor de Clausius-Mossotti. ....	18
<b>FIG. 1.6.</b> Modelo de banda de transporte en un cristal fotorrefractivo .....	19
<b>FIG. 1.7.</b> Etapas del proceso de creación de campo eléctrico de carga espacial.....	20
<b>FIG. 1.8.</b> Corrientes de convección en un líquido de altura $h$ .....	23
<b>FIG. 1.9.</b> Transferencia de momento molécula-partícula en un fluido .....	24
<b>FIG. 2.1.</b> Esquema de las componentes de la celda de agua con micropartículas ....	28
<b>FIG. 2.2.</b> Esquema del arreglo óptico.....	29
<b>FIG. 2.3.</b> Arreglo óptico modificado.....	30
<b>FIG. 2.4.</b> Atrapamiento de una sola micropartícula. ....	31
<b>FIG. 2.5.</b> Velocidad en función a la distancia al spot para varias potencias .....	32
<b>FIG. 2.6.</b> Atrapamiento de múltiples micropartículas (1 mW de potencia).....	33
<b>FIG. 2.7.</b> Atrapamiento de micropartículas usando potencias arriba de 3 mW .....	34
<b>FIG. 2.8.</b> Manipulación de micropartículas usando una potencia de 7 mW .....	35
<b>FIG. 2.9.</b> Atrapamiento de micropartículas con una burbuja de vapor, usando 13 mW .....	36
<b>FIG. 2.10.</b> Atrapamiento de micropartículas mediante un haz en forma de anillo ....	37
<b>FIG. 2.11.</b> Atrapamiento dinámico mediante un haz en forma de anillo. ....	37
<b>FIG. 2.12.</b> Geometría del modelo en COMSOL .....	39
<b>FIG. 2.13.</b> Intensidad óptica que llega a la celda con 5 mW.....	41
<b>FIG. 2.14.</b> Temperatura obtenida a partir de la ecuación (2.1) .....	42
<b>FIG. 2.15.</b> Temperatura en función a la potencia láser .....	43
<b>FIG. 2.16.</b> Perfil de velocidad del flujo dentro de la celda de agua .....	45
<b>FIG. 2.17.</b> Velocidad en función a la potencia láser en diferentes puntos de $z$ . ....	46

<b>FIG. 2.18.</b> Velocidad en función a la distancia al spot para diferentes potencias .....	47
<b>FIG. 2.19.</b> Trayectoria de partículas.....	50
<b>FIG. 3.1.</b> Motores moleculares .....	54
<b>FIG. 3.2.</b> Dos motores moleculares moviendo un cargo sobre el microtúbulo .....	56
<b>FIG. 3.3.</b> Motores moviendo un cargo sobre un microtúbulo con tau. ....	57
<b>FIG. 3.4.</b> Esquema de la cinesina. ....	58
<b>FIG. 3.5.</b> Diagrama de la celda de flujo .....	59
<b>FIG. 3.6.</b> Esquema del arreglo de OT utilizando un microscopio invertido. ....	61
<b>FIG. 3.7.</b> Proteína K560 unida a la nanopartícula, a través del anticuerpo Y. ....	62
<b>FIG. 3.8.</b> Score en función de altura.....	63
<b>FIG. 3.9.</b> Movimiento de la nanopartícula unida a la cinesina sobre el microtúbulo	64
<b>FIG. 3.10.</b> Fracción de nanopartículas unidas al microtúbulo.....	65
<b>FIG. 3.11.</b> Fuerza motora en función del tiempo .....	66
<b>FIG. 3.12.</b> Fuerza motora en función del tiempo para el análisis de 3 nanopartículas. .....	67
<b>FIG. 3.13.</b> Score en función del tiempo .....	67
<b>FIG. 3.14.</b> Análisis en MATLAB: Fuerza de una cinesina en función del tiempo. ...	68
<b>FIG. 3.15.</b> Tiempo que pasa la proteína K560 desprendida y unida al microtúbulo..	69
<b>FIG. 3.16.</b> Promedio del tiempo de la proteína K560 desprendida del microtúbulo .	69
<b>FIG. 3.17.</b> Análisis del cambio de score cuando la montura se mueve 20 nm.....	70
<b>FIG. 3.18.</b> Tiempo de la proteína K560 desprendida del microtúbulo.....	71
<b>FIG. 3.19.</b> Tiempo que le toma a la proteína K560 unirse al microtúbulo en función de la distancia de la nanopartícula .....	72
<b>FIG. 4.1.</b> Proceso de germinación de una espora .....	75
<b>FIG. 4.2.</b> Formación de una colonia a partir de la germinación de la espora.....	76
<b>FIG. 4.3.</b> Esporas de los tres géneros de dermatofitos. ....	78
<b>FIG. 4.4.</b> Infecciones causadas por hongos dermatofitos.....	78
<b>FIG. 4.5.</b> Ilustración esquemática de la aPDT.....	79
<b>FIG. 4.6.</b> Esquema del arreglo experimental para la aPDT.....	81
<b>FIG. 4.7.</b> Coeficiente de absorción del MB en función de la longitud de onda .....	82

<b>FIG. 4.8.</b> Arreglo de OT para el análisis de los efectos de la aPDT en <i>T. mentagrophytes</i> .....	83
<b>FIG. 4.9.</b> Crecimiento de <i>T. mentagrophytes</i> .....	86
<b>FIG. 4.10.</b> Tasa de crecimiento de <i>T. mentagrophytes</i> .....	87
<b>FIG. 4.11.</b> <i>T. mentagrophytes</i> después de la aPDT .....	87
<b>FIG. 4.12.</b> Aplicación del haz IR a 1.2 W sobre <i>T. mentagrophytes</i> sin tratar .....	88
<b>FIG. 4.13.</b> <i>T. mentagrophytes</i> después de haber sido irradiado por 35 minutos .....	88
<b>FIG. 4.14.</b> Crecimiento de <i>T. mentagrophytes</i> .....	89
<b>FIG. 4.15.</b> Aplicación de las OT para estirar <i>T. mentagrophytes</i> utilizando dos haces de luz.....	90
<b>FIG. A.1.</b> Desplazamiento $x$ de la partícula en función del tiempo. ....	101
<b>FIG. A.2.</b> Velocidad promedio de la partícula en función de la distancia al spot....	102
<b>FIG. A.3.</b> Velocidad promedio de la partícula en función de la distancia al spot....	103

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 2.1.</b> Propiedades de los materiales: agua y a-Si:H .....	39
<b>TABLA 2.2.</b> Expresión para la temperatura en relación a la potencia láser. ....	43
<b>TABLA 2.3.</b> Expresión para la velocidad en relación a la potencia láser. ....	46
<b>TABLA 3.1.</b> Promedios de tiempo y score de la cinesina desprendida. ....	70
<b>TABLA 4.1.</b> Valores de TC reportados en la literatura. ....	76
<b>TABLA 4.2.</b> Clasificación de los hongos patógenos [84]. ....	77
<b>TABLA B.1</b> Componentes base para la elaboración de las soluciones .....	107

## NOMENCLATURA

La simbología para representar los términos y/o fórmulas utilizadas en esta tesis se presentan a continuación, en orden de aparición.

OT	Pinzas ópticas	$\xi(t)$	Fuerza de Langevin
$F_{\text{scat}}$	Fuerza de esparcimiento	$f_c$	Frecuencia de corte
$F_{\text{grad}}$	Fuerza de gradiente	$D$	Coeficiente de difusión
$d_p$	Diámetro de la partícula	$G(f)$	Espectro de potencia
$\lambda$	Longitud de onda	$f_{\text{drive}}$	Frecuencia de excitación de la celda
$q$	Carga neta de la partícula	$A$	Amplitud de la celda
$E$	Campo eléctrico	$x_{\text{drive}}$	Posición de la celda
$p$	Momento de un dipolo	$\dot{x}_{\text{drive}}$	Velocidad de la celda
$d$	Distancia entre dos cargas	$V$	Voltaje medido en el detector
$\alpha$	Polarizabilidad de la partícula	$\beta$	Factor de conversión de voltaje a nanómetros
$r_p$	Radio de la partícula	$W_{\text{th}}$	Pico teórico del espectro de potencia
$n_p$	Índice de refracción de la partícula	$W_{\text{ex}}$	Pico experimental del espectro de potencia
$n_m$	Índice de refracción del medio	$D_{\text{volt}}$	Constante de difusión experimental
$I$	Intensidad óptica del haz incidente	$\theta$	Ángulo con el que se difracta la luz
$c$	Velocidad de la luz	$dp$	Cambio de momento de la luz
$x$	Desplazamiento en eje $x$	$P$	Potencia del láser
$k_{\text{OT}}$	Constante de rigidez de la trampa	$R_D$	Radio del detector
$F_{\text{drag}}$	Fuerza de arrastre	$\psi$	Eficiencia del detector
$\Gamma$	Coeficiente de arrastre	$f'$	Distancia focal del condensador
$\eta$	Viscosidad dinámica del fluido	$\alpha$	Constante de conversión de V a pN
$v$	Velocidad del fluido	$F_{\text{elec}}$	Fuerza electrocinética
$h_p$	Distancia de la superficie de la celda al centro de la partícula	$Q$	Momento cuadrupolar
$k_B$	Constante de Boltzmann	$\mathcal{P}$	Polarización inducida
$T$	Temperatura absoluta	$\epsilon_m$	Constante dieléctrica del medio

$\epsilon_p$	Constante dieléctrica de la partícula	SLM	Modulador de luz espacial
$\epsilon_m^*$	Permitividad compleja del medio	HWP	Retardador de media onda
$\epsilon_p^*$	Permitividad compleja de la partícula	BS	Cubo divisor de haz polarizado
$\sigma_m$	Conductividad del medio	SPH	Holograma sintético de fase
$\sigma_p$	Conductividad de la partícula	$f$	Distancia focal de la lente
$\omega$	Frecuencia del campo eléctrico	$k_0$	Frecuencia espacial
$K(\omega)$	Factor Clausius-Mossotti	$r$	Coordenada radial
$F_{DEP}$	Fuerza dielectroforética	$r_0$	Radio del anillo
$h\nu$	Energía de la luz	$\alpha_a$	Coefficiente de absorción
$e^-$	Electrones	$Q_{hs}$	Fuente de calor
$E_a$	Energía de activación de los $e^-$	$I_{agua}$	Intensidad óptica en el agua
$N_D$	Impurezas donadoras	$I_{aSi}$	Intensidad óptica en el a-Si:H
$N_D^+$	Impureza ionizada	$T_{net}$	Transmisión neta en las interfaces vidrio-agua-a-Si:H
$N_A^-$	Aceptores ionizados	$T_{aire-vidrio}$	Transmisión en la interfaz aire-vidrio
Kn	Número de Knudsen	$T_{vidrio-agua}$	Transmisión en la interfaz vidrio-agua
$L$	Camino medio libre del fluido	$T_{agua-aSiH}$	Transmisión en la interfaz agua-a-Si:H
$F_{th}$	Fuerza termoforética	$w$	Radio del haz
$v_{th}$	Velocidad termoforética	$w_0$	Radio de la cintura
$\rho$	Densidad	$z_0$	Posición de la cintura del haz
$\nu$	Viscosidad cinemática	$p_r$	Presión
$k_{f,p}$	Conductividad térmica del fluido	$F_v$	Fuerza volumétrica
$k_{f,p}$	Conductividad térmica de la partícula	$\rho_0$	Densidad a temperatura ambiente
$h$	Espesor de la celda de fluido	ATP	Adenosín trifosfato
$g$	Gravedad	ADP	Adenosín difosfato
$R_a$	Número de Rayleigh	aPDT	Terapia fotodinámica antimicrobiana
$M_a$	Número de Marangoni	PS	Sustancia fotosensibilizadora
$P_r$	Número de Prandtl	AOD	Deflector acusto-óptico
$\gamma$	Coefficiente de expansión térmica	PDA	Agar papa-dextrosa
$\kappa$	Difusividad térmica	SDA	Agar Sabouraud dextrosa
$c_p$	Capacidad calorífica		
S	Tensión superficial		

# INTRODUCCIÓN

La óptica es una disciplina que se encarga del estudio de la interacción luz-materia y por lo tanto conlleva a importantes aplicaciones prácticas [1]. La biofotónica, una de sus ramas que se encarga de la interacción de luz y material biológico, ha tenido un gran impacto para entender procesos biológicos a nivel molecular, celular y hasta en tejidos. Esto ha permitido hacer mejores diagnósticos, detección y tratamientos de enfermedades [2] [3]. Las herramientas más importantes que han permitido tales avances incluyen la terapia fotodinámica, microscopía confocal y todas sus variantes, espectroscopía, sistemas de imagenología, pinzas ópticas, entre otros. En los últimos años se ha realizado un gran número de investigaciones utilizando herramientas de captura y manipulación óptica, ya que permiten clasificar, direccionar y transportar cualquier objeto nano/microscópico. Además de manipulación y captura basadas en pinzas ópticas [4], existen otras técnicas como captura electrocinética [5], pinzas fotovoltaicas [6], termoforesis [7], pinzas optoelectrónicas [8], magnetoforesis [9], electroosmosis [10], microfluídica [11], optofluidos [12], plasmones [13], entre otras, que presentan características únicas, cada una con sus ventajas y desventajas, dependiendo de su aplicación.

En particular, este trabajo se enfocó en técnicas de manipulación y captura con pinzas ópticas. Así mismo, se analizaron los efectos y aplicaciones de pinzas ópticas en presencia de efectos térmicos. Las pinzas ópticas se basan en la captura de micropartículas mediante haces fuertemente enfocados, por ejemplo, con un objetivo de microscopio 100x. Esta técnica fue implementada por Arthur Ashkin en 1970 [14]. Desde entonces, un gran auge en investigación teórica y experimental se desató para entender los conceptos de confinamiento y captura a tal nivel que ahora las pinzas ópticas se han convertido en una herramienta estándar en laboratorios de biología, medicina y otras áreas tan diversas como física, microfluídica y química, por mencionar algunas. Se han utilizado en la manipulación de células vivas [15],



átomos y moléculas [16], virus y bacterias [17], por ser una herramienta no invasiva de gran precisión, y poder manipular una sola partícula y separarla de un conjunto sin dañarla [4]. Esto a su vez limita el número de partículas que pueden ser atrapadas al mismo tiempo ya que requiere un haz altamente enfocado [18]. Si bien se han implementado técnicas alternativas para producir múltiples puntos de confinamiento, como holografía en moduladores espaciales de luz, el número de partículas que se pueden manipular sigue siendo limitado a una o dos docenas, en el mejor de los casos.

Generalmente, los efectos térmicos resultado de la absorción de la luz en el medio o en el espécimen a confinar, son efectos secundarios indeseados, ya que el calor producido puede ocasionar daño (en el caso de microorganismos), o aumentar su energía cinética dificultando su confinamiento o incluso generar corrientes de convección. Cabe mencionar que estos efectos han sido poco estudiados porque generalmente se tratan de evitar estas complicaciones. Cuando se produce un gradiente de temperatura en la celda de confinamiento, se crean corrientes de convección; el líquido en las regiones más calientes se mueve hacia arriba donde se encuentran el líquido más frío, estableciéndose corrientes por la fuerza boyante. Estas corrientes pueden cancelarse si la celda se hace muy delgada (unas cuantas micras). Aun en esta configuración, otro fenómeno interesante sigue presente: termoforesis. Debido a que en las zonas calientes las moléculas del líquido tienen mayor energía cinética que aquellas en las zonas más frías, se produce una fuerza neta dirigida, generalmente, de la zona caliente hacia la fría. Termoforesis se puede utilizar en la purificación y análisis de biomoléculas [7] [19], o para controlar selectivamente la transferencia de masa en soluciones macromoleculares o dispersiones coloidales [20].

Dado que existen muy pocos trabajos donde se estudien pinzas ópticas, termoforesis y corrientes de convección, se abre un nicho de oportunidad para investigar estos fenómenos. Así mismo, el interés del grupo de biofotónica es la manipulación de material biológico, por lo que se usaron las pinzas ópticas para estudiar el comportamiento de la proteína K560 unida a una nanopartícula de

poliestireno, variando su distancia al microtúbulo para determinar el tiempo que le toma a la proteína unirse al microtúbulo dependiendo de la distancia a la que se encuentre la nanopartícula de él. Continuando con las aplicaciones de pinzas ópticas, se estudiaron los cambios morfológicos, en crecimiento y propiedades elásticas de hongos dermatofitos de la especie *Trichophyton mentagrophytes*, tratados con terapia fotodinámica antimicrobiana (aPDT).

## **Objetivo general**

Estudiar el efecto de temperatura en pinzas ópticas y aplicaciones en material biológico, específicamente, en la proteína K560 y en hongos dermatofitos de la especie *Trichophyton mentagrophytes*.

## **Objetivos específicos**

- Describir los mecanismos generados en una celda con agua de 100  $\mu\text{m}$  de espesor, por la absorción láser de 532 nm de una película delgada de a-Si:H.
- Atrapar y manipular múltiples micropartículas de sílice de 2.5  $\mu\text{m}$  de diámetro dentro de una celda de agua.
- Comparar resultados experimentales y numéricos sobre captura por corrientes de convección y fotoforesis.
- Encontrar la concentración de proteína K560 para el estudio de motores individuales unidos a una nanopartícula de poliestireno.
- Hacer mediciones *in vitro* de la proteína K560 caminando con la nanopartícula sobre el microtúbulo, moviendo la montura de la celda cada 20 nm en el eje z.

- Realizar un código en MATLAB para encontrar la relación del tiempo que camina la proteína K560 unida a la nanopartícula sobre el microtúbulo respecto a la distancia a la que se encuentra.
- Monitorear microscópicamente el crecimiento del *T. mentagrophytes*.
- Evaluar cambios en las propiedades viscoelásticas y morfológicas del *T. mentagrophytes*.
- Establecer un protocolo para el análisis de los efectos de la terapia fotodinámica antimicrobiana en el hongo *T. mentagrophytes*.

## Organización de la tesis

En el Capítulo 1 se presentan diversos mecanismos de atrapamiento y manipulación óptica, enfocado principalmente en pinzas ópticas, captura electrocinética, y termoforesis. En pinzas ópticas se describen las fuerzas que actúan sobre la partícula y los métodos para medir fuerzas. En captura electrocinética se explican los fenómenos de electroforesis y dielectroforesis, y se da la expresión de la fuerza electroforética y dielectroforética. En la parte de termoforesis se hace un análisis de corrientes de convección que actúan en conjunto a este fenómeno y se dan los parámetros que actúan en estos procesos. Por último, se da una breve explicación de otros mecanismos alternativos de manipulación y confinamiento.

El Capítulo 2 muestra el atrapamiento de micropartículas debido a corrientes de convección inducidas por un haz gaussiano enfocado (532 nm) sobre una película de a-Si:H. Dependiendo de la potencia del láser, las micropartículas quedan atrapadas alrededor del haz formando un anillo, por el fenómeno de fotoforesis o mediante una burbuja de vapor. Finalmente, la manipulación en tiempo real de múltiples micropartículas en un haz en forma de anillo, usando un modulador espacial de luz.

En el Capítulo 3 se describe el trabajo realizado con la proteína K560 usando pinzas ópticas con un láser de 980 nm. Para ello se trabajó con un sólo motor unido a

una partícula de poliestireno de 500 nm. Para medir la fuerza se implementó el método de cambio de momento de la luz y con ayuda de un código computacional se determinó el tiempo que le toma a la proteína motora unirse al microtúbulo, dependiendo de la distancia a la que se encuentra la nanopartícula.

El Capítulo 4 presenta un análisis de los efectos generados en hongos dermatofitos, particularmente en el estudio del *T. mentagrophytes*, tratados con aPDT, con azul de metileno como colorante y un láser He-Ne como fuente de luz, irradiando la muestra con  $60 \text{ J/cm}^2$ . Para analizar el crecimiento, los cambios morfológicos y la elasticidad de hongos sanos y hongos después de la terapia, se utilizaron pinzas ópticas.

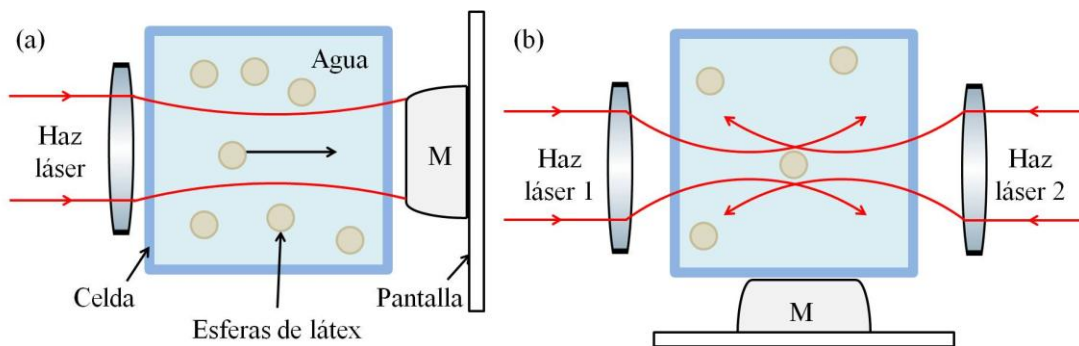
En el Capítulo 5 se dan las conclusiones generales de los resultados obtenidos en los Capítulos 2, 3 y 4 y se describe un trabajo a futuro. Finalmente, aparece una sección de Apéndices que describe el análisis para llegar a los resultados obtenidos, mediante códigos computacionales o bien, los procedimientos que se siguieron para la elaboración de soluciones, cuando se trabajó con material biológico.

## Capítulo 1.

# MECANISMOS DE CAPTURA Y MANIPULACIÓN ÓPTICA

### 1.1 Pinzas ópticas

La primera observación experimental sobre pinzas ópticas surgió en 1970 en los laboratorios Bell, cuando el científico Arthur Ashkin planteó la posibilidad de atrapar micropartículas de manera estable utilizando presión de radiación [14]. Los experimentos los realizó usando un láser de HeNe con potencia de décimas de miliwatts y un microscopio de baja potencia para observar el confinamiento de partículas de látex disueltas en agua (esferas de 0.59, 1.31 y 2.68  $\mu\text{m}$  de diámetro) contenidas en una celda de vidrio, como la mostrada en la FIG. 1.1(a). Cuando enfocó el láser sobre las partículas comenzaron a moverse a velocidades dadas por la ley de Stokes. Si el haz del láser golpeaba a una partícula cerca del borde del haz, la partícula era atraída hacia la cintura y después se movía a la pared de salida de la celda, en la dirección de propagación del láser.



**FIG. 1.1.** Primera observación experimental sobre pinzas ópticas. (a) Movimiento de una partícula enfocada en un haz láser utilizando un microscopio de baja potencia, M. (b) La partícula permanece estable si se colocan dos haces en direcciones opuestas con la posición de la cintura del haz en modo  $\text{TEM}_{00}$ .

Después, reemplazó el microscopio M por un segundo haz láser y enfocó en dirección opuesta al primer haz de luz (y simétricamente localizado en un punto central), con lo que pudo desplazar la partícula a otro punto dependiendo de la razón de intensidad entre los haces, generando una fuerza restauradora que regresó a la partícula al punto de equilibrio, FIG. 1.1 (b), logrando hacer una captura en 3D y dando origen a las Pinzas Ópticas (OT por sus siglas en inglés) [3].

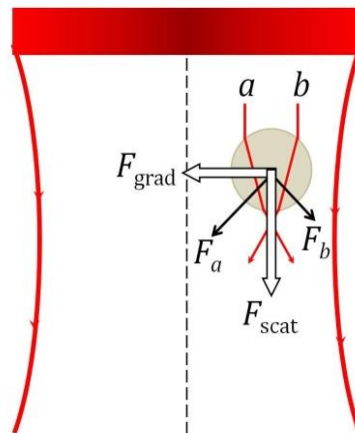
### 1.1.1 Fuerzas que actúan sobre la partícula

Existen dos fuerzas que se originan de la transferencia del momento de la luz incidente a la partícula esférica: la fuerza neta en dirección de la luz incidente, llamada fuerza de esparcimiento ( $F_{\text{scat}}$ ) y una fuerza adicional transversal, llamada fuerza de gradiente ( $F_{\text{grad}}$ ) [3]. Dependiendo del tamaño relativo del diámetro de la partícula ( $d_p$ ) y la longitud de onda ( $\lambda$ ) del láser utilizado se pueden encontrar soluciones analíticas a tales fuerzas o no [21] [22].

#### 1.1.1.1 Régimen de rayos ópticos, $d_p \gg \lambda$

En este régimen se hace un análisis geométrico donde se descompone el rayo total de luz en rayos individuales, cada uno con su propia intensidad, dirección y estado de polarización, que se propaga en línea recta en los medios de índice de refracción uniforme. Se consideran los rayos  $a$  y  $b$  de la FIG. 1.2, que inciden sobre una partícula esférica con índice de refracción mayor a la del medio, situada fuera de eje. La mayor parte del rayo se refracta a través de la partícula dando origen a las fuerzas  $F_a$  y  $F_b$  en dirección al cambio de momento. La fuerza  $F_a$  es mayor a la fuerza  $F_b$  debido a que la intensidad del rayo  $a$  es mayor a la del rayo  $b$ . Para  $n$  rayos que incidan sobre la partícula, existirán  $n$  fuerzas dando lugar a la fuerza de esparcimiento  $F_{\text{scat}}$ , debido al esparcimiento del momento de la luz, y a la fuerza de gradiente  $F_{\text{grad}}$ , proveniente del gradiente de intensidad transversal a la dirección de

propagación que apunta hacia las zonas de mayor intensidad. La fuerza  $F_{\text{grad}}$  sólo aparece cuando la partícula está fuera de eje, ya que cuando la partícula se encuentra en el eje del haz gaussiano  $\text{TEM}_{00}$ ,  $F_a = F_b$  en dirección transversal y la componente neta de gradiente no existe. Si los rayos  $a$  y  $b$  pasan a través de una lente para enfocar el haz, cuando inciden sobre la partícula, por refracción, se genera un cambio en el momento de la luz, y por conservación de momento, la partícula también experimentará un cambio de momento igual pero en sentido contrario, entonces surgirá una fuerza total  $F$ , que atrae a la partícula hacia la zona de enfoque, es decir, hacia la cintura del haz. Este proceso se repite para los  $n$  rayos del haz enfocado, por lo que la fuerza neta se obtiene al sumar la fuerza para cada uno de los rayos. En el límite que  $n \rightarrow \infty$ , la suma se convierte en una integral, que generalmente se resuelve de forma numérica.



**FIG. 1.2.** Diagrama de fuerzas sobre la partícula situada fuera de eje. Análisis de rayos ópticos: la partícula experimenta una fuerza que la atrae hacia el centro del haz y a su vez es empujada en la dirección de propagación.

### 1.1.1.2 Régimen de Rayleigh, $d_p \ll \lambda$

En este caso las partículas se consideran como dipolos eléctricos que se polarizan en presencia de un gradiente de intensidad. Un dipolo en un campo eléctrico experimenta la fuerza de Lorentz la cual se describe como  $\mathbf{F} = q\mathbf{E}$ , donde  $q$  es la carga neta de la partícula y  $\mathbf{E}$  es el campo eléctrico. El momento de un dipolo es

$\mathbf{p} = q\mathbf{d}$ , donde  $\mathbf{d}$  es la distancia entre las dos cargas, la cual es muy pequeña por lo que se toma como  $d\mathbf{x}$ . Tomando en cuenta el momento del dipolo la fuerza se puede reescribir como  $\mathbf{F} = \mathbf{p} \cdot \nabla \mathbf{E}$ . Si la partícula dieléctrica no presenta efectos no lineales, entonces el momento se toma como  $\mathbf{p} = \alpha \mathbf{E}$ , donde  $\alpha$  es la polarizabilidad de la partícula. Utilizando la igualdad vectorial  $(\mathbf{E} \cdot \nabla) \mathbf{E} = \nabla \left( \frac{1}{2} \mathbf{E}^2 \right) - \mathbf{E} \times (\nabla \times \mathbf{E})$ , con  $\nabla \times \mathbf{E} = 0$  [23], la fuerza queda como

$$\mathbf{F} = \frac{1}{2} \alpha \nabla \mathbf{E}^2. \quad (1.1)$$

Esta ecuación indica que la fuerza que se aplica a una partícula dieléctrica, considerada como un dipolo puntual, es proporcional al gradiente de la intensidad del haz y la partícula es atraída [22]. En general, para una partícula de radio  $r_p$ , la fuerza gradiente,  $F_{\text{grad}}$ , se escribe como

$$\mathbf{F}_{\text{grad}} = \frac{2\pi n_m r_p^3}{c} \left[ \frac{(n_p/n_m)^2 - 1}{(n_p/n_m)^2 + 2} \right] \nabla I, \quad (1.2)$$

donde  $n_p$  es el índice de refracción de la partícula y  $n_m$  el índice de refracción del medio.

La fuerza de esparcimiento,  $F_{\text{scat}}$ , como

$$\mathbf{F}_{\text{scat}} = \frac{128\pi^5 n_m r_p^6}{3c\lambda^4} \left[ \frac{(n_p/n_m)^2 - 1}{(n_p/n_m)^2 + 2} \right]^2 \mathbf{I}, \quad (1.3)$$

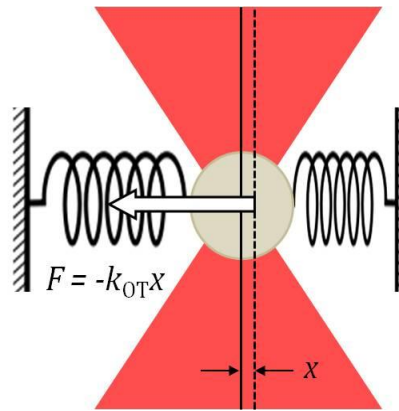
donde  $I$  es la intensidad óptica del haz incidente y  $c$  es la velocidad de la luz.

### 1.1.2 Métodos de medición de fuerza

Las OT, pueden medir de forma no invasiva la posición y la fuerza del orden de piconewtons. Debido a que la partícula confinada en el campo óptico actúa como un oscilador armónico, la fuerza,  $F$ , que actúa sobre ella es proporcional al desplazamiento ( $x$ ) del objeto a través de una constante elástica o de rigidez ( $k_{\text{OT}}$ ),



como se muestra en la FIG. 1.3 [24] [25]. El desplazamiento  $x$  se puede medir directamente de dos maneras: con ayuda de una cámara de video para monitorear el movimiento de la partícula o recurriendo a un detector de posición de alta resolución para medir la deflexión del haz láser y obtener la relación entre la señal de voltaje producida por el detector y la posición de la partícula respecto al centro de la trampa óptica. La rigidez de la trampa se puede calcular de varias maneras, la cual dependerá de la longitud de onda, la potencia del láser utilizado y del índice de refracción del medio circundante [24] [26] [27].



**FIG. 1.3.** Las OT actúan como un resorte de Hook lineal. Cuando la partícula experimenta pequeños desplazamientos  $x$  del centro de la trampa óptica, la fuerza restauradora es igual a su desplazamiento por una constante de rigidez, es decir,  $F = -k_{OT}x$ .

### 1.1.2.1 Método de fuerza de arrastre

Este método mide el desplazamiento de la partícula atrapada en la trampa dentro de una celda, causada por el equilibrio de la fuerza de arrastre aplicada por el flujo y la fuerza restauradora de la trampa. Para una partícula esférica la fuerza de arrastre  $F_{\text{drag}}$  está dada como

$$F_{\text{drag}} = \Gamma v, \quad (1.4)$$

donde  $\Gamma = 6\pi\eta r_p$ , es el coeficiente de arrastre,  $\eta$  es la viscosidad dinámica del fluido y  $v$  la velocidad del fluido.

Si la partícula está muy cerca de la superficie de la celda, la fuerza experimentará efectos de frontera que deben ser corregidos por la ley de Faxen [28]. Dado que la constante elástica es igual a  $F/x$  se tiene que

$$k_{OT} = \frac{\Gamma v/x}{\left[1 - \frac{9}{16} \left(\frac{r_p}{h_p}\right) + \frac{1}{8} \left(\frac{r_p}{h_p}\right)^3 - \frac{45}{256} \left(\frac{r_p}{h_p}\right)^4 - \frac{1}{16} \left(\frac{r_p}{h_p}\right)^5\right]}, \quad (1.5)$$

donde  $h_p$  es la distancia de la superficie de la celda al centro de la partícula. Como se observa, la rigidez de la trampa depende del tamaño y forma de la partícula y de la viscosidad del medio que lo rodea [27] [26].

### 1.1.2.2 Teorema de Equipartición

Un segundo método es basado en el teorema de equipartición, que establece que un objeto en una solución se mueve constantemente debido a la energía térmica. En un oscilador armónico, cada grado de libertad tiene una energía dada por  $k_B T/2$ , donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann y  $T$  es la temperatura absoluta. Las fluctuaciones térmicas permiten relacionar el desplazamiento cuadrático medio de la posición de la partícula atrapada y la posición de equilibrio,  $\bar{x}$ , como

$$\frac{1}{2} k_B T = \frac{1}{2} k_{OT} \langle (x - \bar{x})^2 \rangle, \quad (1.6)$$

donde la temperatura es el único parámetro necesario para determinar la constante elástica [24] [27]. Con este método no se necesita tener información del medio (viscosidad), pero el tamaño y forma de la partícula influyen en la calibración de la posición por lo que se deben tomar dos consideraciones [26]: Primero, el ancho de banda analógico del sistema de detección debe ser considerable, ya que se puede subestimar el valor de  $\langle (x - \bar{x})^2 \rangle$ , y obtener un error en el valor de  $k_{OT}$ . Segundo, es un método muy sensible a cualquier fuente de ruido lo cual llevará también a un error en el valor estimado de  $k_{OT}$ .

### 1.1.2.3 Método pasivo de densidad espectral de potencia

Este método es el más usado para calibrar un sistema de OT por considerarse el más fiable [24]. El movimiento de una partícula atrapada en un sistema sobreamortiguado con un coeficiente de arrastre conocido es descrito por el movimiento browniano en un potencial, mediante la ecuación de Langevin, de la siguiente forma

$$k_{OT}x(t) + \Gamma\dot{x}(t) = \sqrt{2\Gamma k_B T}\xi(t), \quad (1.7)$$

donde el primer término es la fuerza de la trampa, el segundo término es la fuerza de arrastre,  $F_{drag}$ , proporcional a la velocidad de la partícula con respecto a la celda, y  $\xi(t)$  es la fuerza de Langevin, que satisface  $\langle \xi(t) \rangle = 0$  y  $\langle \xi(t)\xi(t') \rangle = \delta(t - t')$ .

Definiendo la frecuencia de corte,  $f_c$ , y el coeficiente de difusión,  $D$ , como

$$f_c = k_{OT}(2\pi\Gamma)^{-1}, \quad (1.8a)$$

$$D = k_B T / \Gamma, \quad (1.8b)$$

y proponiendo como solución  $x(t) = u(t)\exp(-2\pi f_c t)$ , de la ecuación (1.7) se encuentra que

$$x(t) = \sqrt{2D} \int_{-\infty}^t \exp[-2\pi f_c(t - t')] \xi(t') dt'. \quad (1.9)$$

A través de la transformada de Fourier de la ecuación (1.9) puede obtenerse el espectro de potencia de las fluctuaciones de la partícula atrapada como:

$$G(f) = \frac{2|\hat{x}(f)|^2}{t_{msr}} = \frac{D}{\pi^2(f_c^2 + f^2)}, \quad (1.10)$$

donde  $t_{msr}$  es el tiempo de medición. Este método requiere que el objeto atrapado sea esférico y de radio conocido. Aquí del parámetro  $D$ ,  $T$  es conocido,  $\Gamma$  y  $f_c$  pueden ser obtenidos haciendo un ajuste del espectro a una Lorentziana. Suponiendo que la temperatura local de la partícula es igual a la temperatura del medio, se puede determinar la constante elástica a partir de la ecuación (1.8a) [24] [27].

#### 1.1.2.4 Método activo de densidad espectral de potencia

Otro método de calibración de OT fue presentado por Tolić-Nørrelykke et al. [29] y se basa en que la partícula atrapada en la OT se encuentra en una celda, montada en un piezoeléctrico, que se mueve de forma sinusoidal con una frecuencia de excitación,  $f_{\text{drive}}$  y amplitud  $A$ . La posición de la celda en función del tiempo será  $x_{\text{drive}}(t) = A \sin(2\pi f_{\text{drive}} t)$ . La velocidad del fluido también se verá afectada por la velocidad de la celda,  $\dot{x}_{\text{drive}}$ , por lo que la ecuación de Langevin, se reescribe como

$$k_{\text{OT}}x(t) + \Gamma[\dot{x}(t) - \dot{x}_{\text{drive}}(t)] = \Gamma\sqrt{2D}\xi(t). \quad (1.11)$$

En este caso, la solución puede obtenerse mediante la suma de dos soluciones, un primer término debido a las fluctuaciones térmicas de la partícula atrapada obtenido como en el método anterior, ver ecuación (1.9), y un segundo término debido al movimiento sinusoidal de la celda, por lo que la solución general queda de la siguiente manera,

$$x(t) = \sqrt{2D} \int_{-\infty}^t \exp[-2\pi f_c(t-t')] \xi(t') dt' + \frac{x_{\text{drive}}(t - t_{\text{lag}})}{\sqrt{1 - (f_c/f_{\text{drive}})^2}}, \quad (1.12)$$

donde  $t_{\text{lag}} = \frac{\arctan(f_{\text{drive}}/f_c) - \pi/2}{2\pi f_{\text{drive}}}$ . Por lo tanto, el espectro de potencia es la suma de los espectros de potencia de cada solución, es decir,

$$G(f) = \frac{D}{\pi^2(f_c^2 + f^2)} + \frac{A^2}{2[1 + (f_c/f_{\text{drive}})^2]} \delta(f - f_{\text{drive}}), \quad (1.13)$$

donde el último término es el pico de la función  $\delta$  para la frecuencia de excitación.

El desplazamiento,  $x$ , de la partícula atrapada en la trampa óptica es determinada como función de voltaje,  $V$ , del detector de posición de alta resolución que mide la deflexión del haz láser, como  $x = \beta V$ , donde  $\beta$  es el factor de conversión de voltaje a nanómetros. El factor de conversión se obtiene de  $\beta = \sqrt{W_{\text{th}}/W_{\text{ex}}}$ , donde  $W_{\text{th}} = A^2/[2 + 2(f_c/f_{\text{drive}})^2]$  es estimado con los parámetros  $A$  y  $f_{\text{drive}}$ , ya conocidos,  $f_c$ , obtenido experimentalmente, y  $W_{\text{ex}}$  es obtenido experimentalmente de la altura del pico del espectro de potencia (Lorentziana originada del movimiento

browniano de la partícula atrapada en el potencial parabólico). Ver referencias [24] [29]. De las ecuaciones (1.8a) y (1.8b), usando  $D = \beta^2 D_{\text{volt}}$ , donde  $D_{\text{volt}}$  es la constante de difusión obtenida experimentalmente se tiene que

$$\beta^2 = \frac{k_B T}{\Gamma D_{\text{volt}}}, \quad (1.14a)$$

$$k_{\text{OT}} = \frac{2\pi k_B T f_c}{\beta^2 D_{\text{volt}}}. \quad (1.14b)$$

Con este método se determinan  $\beta$  y  $k_{\text{OT}}$  simultáneamente, y no requiere conocimiento sobre la partícula o el medio, ni de la altura del objeto atrapado respecto a la superficie de la celda.

### 1.1.2.5 Método de cambio de momento de la luz

El método para medir la fuerza a través de cambio de momento de la luz, propuesto por Smith et al. en el 2003 y después desarrollado por Farré en el 2006 [30]. Consiste en medir el cambio de momento de la luz dispersada causado por la fuerza aplicada sobre la partícula atrapada. Dado que se mide la luz dispersada por el objeto, y no hay luz adicional, se puede medir la fuerza de la OT sin necesidad de conocer el objeto atrapado o las características del medio en el que se encuentra, por lo que es ideal para mediciones *in vivo* [24].

El haz que interactúa con la partícula atrapada se difracta un ángulo  $\theta$ . La fuerza ejercida sobre la partícula es  $F = -dp/dt$ , donde  $dp = (n_m P/c)dt$  es el cambio de momento de la luz dispersada de la partícula,  $dt$  es el cambio en el tiempo y  $P$  es la potencia del láser. Si no hay partícula atrapada, el detector recibe un perfil del láser simétrico en cero y una señal igual a cero debido al cambio de momento, por lo que la fuerza se puede resumir como

$$F = \frac{R_D V}{\psi f' c} = \alpha V, \quad (1.15)$$

donde  $R_D$  es el tamaño del detector,  $\psi$  es la eficiencia del detector, y  $f'$  es la distancia focal del condensador. Ver referencias [30] [31]. La constante de conversión de V a pN,  $\alpha$ , se encuentra calibrando el sistema de OT con algún método conocido, así la fuerza se reescribe como

$$F = k_{OT}x = k_{OT}\beta V = \alpha V. \quad (1.16)$$

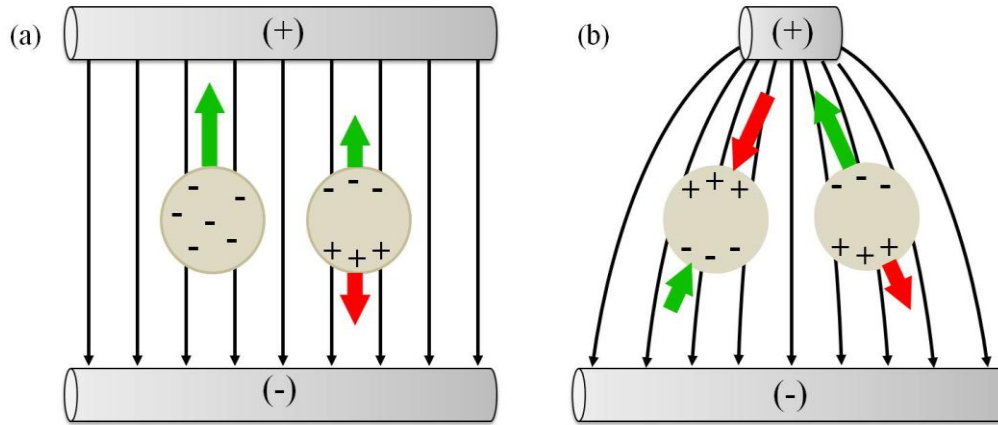
donde  $\alpha$  es una función de  $\beta$  y  $k_{OT}$  [24].

## 1.2 Captura electrocinética

La captura electrocinética se ha aplicado en la selección de partículas, que aunque pierde la habilidad de atrapar individualmente tiene la ventaja de atrapar de manera simultánea un conjunto grande de partículas [18]. Esta herramienta de captura y manipulación incluye dos mecanismos: electroforesis y dielectroforesis. El fenómeno de electroforesis describe el movimiento de partículas con carga eléctrica superficial, en relación con la solución que lo rodea, inducido por un campo eléctrico uniforme o no uniforme [5], y el fenómeno de dielectroforesis, movimiento de partículas, sin carga pero polarizables por un campo eléctrico no uniforme [32] [33]. Estos mecanismos han demostrado ser muy eficaces en la separación de biopartículas, tales como células, bacterias, virus y proteínas [34].

La FIG. 1.4 muestra el principio básico de los fenómenos de electroforesis y dielectroforesis [35] [36]. Se consideran dos partículas, una partícula cargada (-) y una partícula neutra colocadas en un campo eléctrico uniforme, como en la FIG. 1.4(a). La partícula cargada se moverá hacia los electrodos de polaridad eléctrica opuesta (+) debido a la fuerza de Coulomb. La aplicación del campo eléctrico sobre la partícula neutra induce un dipolo dentro de ella y una acumulación de carga superficial, es decir, la partícula se polariza y tiene centros de carga positivos y negativos, de igual magnitud pero signo contrario. Como el campo eléctrico es uniforme entonces existe una fuerza de Coulomb sobre las cargas en ambos lados de

la partícula, iguales y opuestos, por lo que se anulan y la fuerza neta aplicada en la partícula es cero. Si el campo eléctrico no es uniforme, como en la FIG. 1.4(b), entonces la fuerza de Coulomb de cada lado no será igual y existirá una fuerza neta sobre la partícula. La dirección de la fuerza dependerá de la polarizabilidad de la partícula y del medio en el que se encuentre.



**FIG. 1.4.** Principio básico de los fenómenos de electroforesis y dielectroforesis. (a) Electroforesis que experimenta una partícula cargada negativamente y una partícula neutra colocadas bajo un campo eléctrico uniforme. (b) Dielectroforesis en dos partículas neutras que se encuentra en un campo eléctrico no uniforme.

La fuerza que experimenta una partícula que se encuentra en un campo eléctrico está dada por

$$\mathbf{F}_{\text{elec}} = q\mathbf{E} + (\mathbf{p} \cdot \nabla)\mathbf{E} + \frac{1}{6}\nabla(\mathbf{Q} \cdot \nabla\mathbf{E}) + \dots, \quad (1.17)$$

donde el primer término expresa la interacción coulombiana de la carga  $q$  de la partícula con el campo eléctrico  $\mathbf{E}$  aplicado y representa la fuerza electroforética. Los otros términos son la fuerza debido a contribuciones dipolares,  $\mathbf{p}$ , cuadrupolares,  $\mathbf{Q}$ , y demás, donde las contribuciones dipolares pueden explicar la fuerza dielectroforética [5] [18].

### 1.2.1 Fuerza dielectroforética

El momento dipolar de una partícula esférica en un campo no uniforme, se calcula multiplicando la polarización inducida,  $\mathcal{P}$ , por unidad de volumen de la partícula [37],

$$\mathbf{p} = \frac{4}{3}\pi r_p^3 \mathcal{P}, \quad (1.18)$$

donde la polarización se relaciona con el campo eléctrico mediante la expresión  $\mathcal{P} = [3\epsilon_m(\epsilon_p^* - \epsilon_m^*)\mathbf{E}]/(\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*)$ . Aquí,  $\epsilon_m$  es la permitividad del medio, y  $\epsilon_{m,p}^*$  son las constantes dieléctricas complejas del medio y de la partícula, respectivamente, dadas como  $\epsilon_{m,p}^* = \epsilon_{m,p} - i\sigma_{m,p}/\omega$ , donde  $\sigma_{m,p}$  es la conductividad y  $\omega$  es la frecuencia angular del campo eléctrico.

Con lo anterior, la ecuación (1.18) se reescribe como

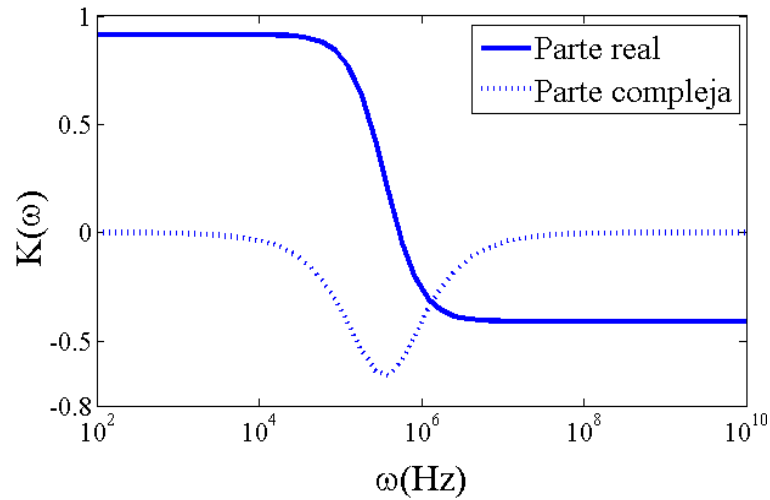
$$\mathbf{p} = 4\pi r_p^3 \epsilon_m K(\omega) \mathbf{E}, \quad (1.19)$$

donde  $K(\omega) = (\epsilon_p^* - \epsilon_m^*)/(\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*)$  es el factor de Clausius-Mossotti. Utilizando la ecuación (1.19), y el término de fuerza dielectroforética de la ecuación (1.17), la expresión general para la fuerza de dielectroforesis ( $F_{\text{DEP}}$ ) que actúa sobre una partícula polarizable en un campo eléctrico no uniforme [37], puede escribirse como

$$\mathbf{F}_{\text{DEP}} = 2\pi r_p^3 \epsilon_m \text{Re}[K(\omega)] \nabla E^2, \quad (1.20)$$

donde  $F_{\text{DEP}}$  puede cambiar de signo controlando la frecuencia del campo, a diferencia de la fuerza ejercida sobre la partícula usando OT, donde la polarizabilidad de las partículas es constante. El comportamiento del factor de Clausius-Mossotti es mostrado en la FIG. 1.5, donde se utilizaron como parámetros de la partícula  $\epsilon_p = 4\epsilon_0$  y  $\sigma_p = 10^{-4}$  S/m, y para el medio  $\epsilon_m = 8\epsilon_0$  y  $\sigma_m = 3 \times 10^{-6}$  S/m. Si la constante dieléctrica de la partícula es mayor a la del medio, presentará dielectroforesis positiva ( $F_{\text{DEP}} > 0$ ) y será atraída hacia la región de mayor intensidad del campo eléctrico, en caso contrario presentará dielectroforesis negativa ( $F_{\text{DEP}} < 0$ ) y se alejará de la región de alta intensidad [38].





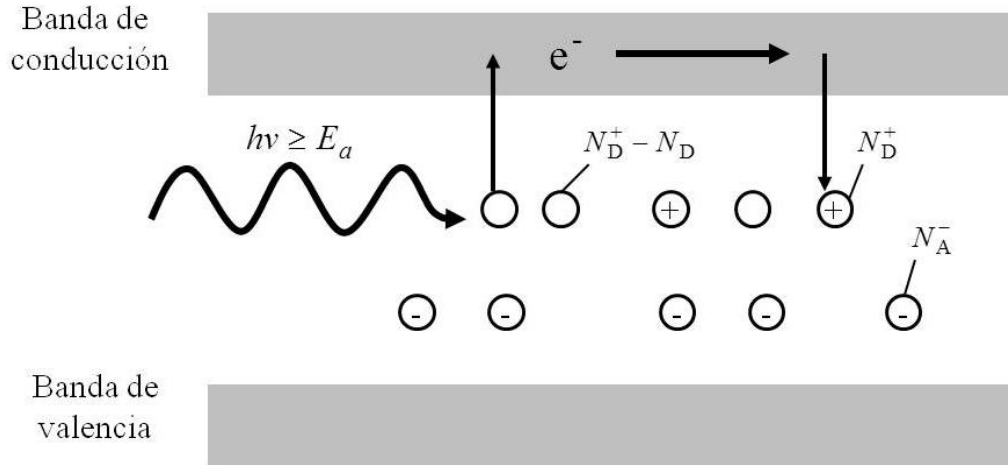
**FIG. 1.5.** Comportamiento del factor de Clausius-Mossotti. La línea continua indica la parte real y la línea punteada la parte compleja. Se observa el cambio del signo del factor de Clausius-Mossotti.

## 1.2.2 Campo eléctrico de carga espacial

En general, la captura electrocinética requiere de campos eléctricos externos pero se pueden utilizar cristales fotorrefractivos para generar un campo eléctrico de carga espacial y formar gradientes de campo eléctrico [18] [39] [40]. Un cristal fotorrefractivo es un material fotoconductor y electroóptico, con portadores móviles (electrones y/o huecos) e impurezas, y nivel de energía en algún lugar de la banda prohibida. Algunos ejemplos de estos son el titanato de bario ( $\text{BaTiO}_3$ ), niobato de litio ( $\text{LiNbO}_3$ ) y óxido de silicio de bismuto (BSO).

La FIG. 1.6 muestra que al incidir luz en un cristal fotorrefractivo, con energía  $h\nu$ , igual o mayor que la energía de activación de los electrones ( $e^-$ ) de las impurezas donadoras ( $N_D$ ),  $E_a$ , esta excita a los electrones y pasan a la banda de conducción. Al mismo tiempo crean una impureza ionizada ( $N_D^+$ ). Los electrones que se encuentran en la banda de conducción pueden recombinarse con impurezas ionizadas y/o difundirse en las zonas de mayor a menor densidad donde finalmente se recombinaran en aceptores ionizados ( $N_A^-$ ). Los donantes y aceptores ionizados son

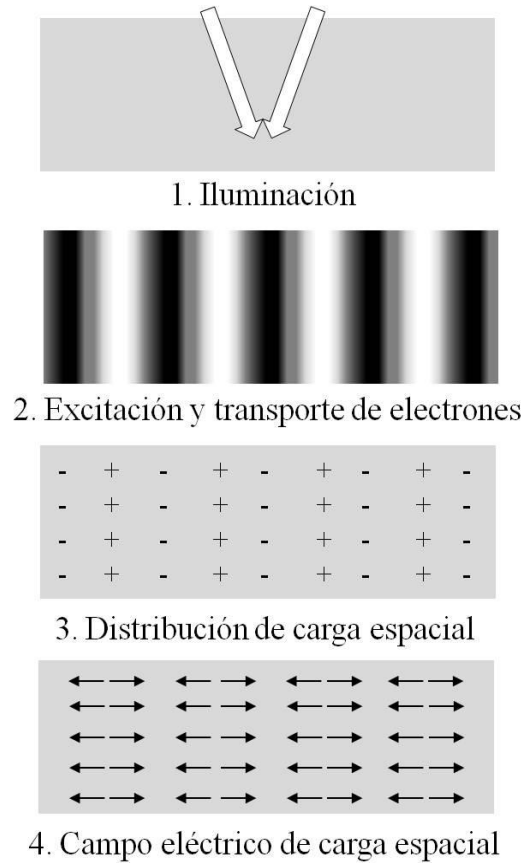
inmóviles, y debido a la separación de carga aparecerá un campo eléctrico de carga espacial [40].



**FIG. 1.6.** Modelo de banda de transporte en un cristal fotorrefractivo. Los electrones  $e$  excitados de las impurezas no ionizadas  $N_D^+ - N_D$ , pasan a la banda de conducción antes de recombinarse con otras impurezas  $N_D^+$ . Los aceptores ionizados  $N_A^-$  siempre permanecen inactivos.

La FIG. 1.7 muestra el proceso para la creación del campo eléctrico, donde se utiliza la interferencia de un par de haces para producir una distribución espacial sinusoidal: se ilumina el cristal fotorrefractivo con dos haces para crear un patrón de interferencia, el cual producirá la excitación y el transporte de los electrones y una distribución de carga espacial que llevará a la creación del campo eléctrico. Algunos cristales fotorrefractivos experimentan un proceso de transferencia de carga asimétrica que hace que los portadores excitados se muevan en una dirección preferencial, generalmente en la dirección del eje óptico (eje  $c$ ) del cristal [40] [41], dando lugar a campos eléctricos capaces de proveer fuerzas para manipular partículas. Este fenómeno es conocido como efecto fotovoltaico, y puede obtener campos eléctricos más grandes que los generados por difusión o arrastre de carga en presencia de un campo eléctrico. Las técnicas de captura electrocinética que presentan este efecto se les denomina pinzas fotovoltaicas. La captura a través del

efecto fotovoltaico ha abierto una nueva área en el campo de manipulación óptica por campos eléctricos evanescentes [6].



**FIG. 1.7.** Etapas del proceso de creación de campo eléctrico de carga espacial. La iluminación con dos haces sobre el cristal fotorrefractivo (1) creará un patrón de interferencia, el cual producirá excitación y transporte de electrones (2) y una distribución de carga espacial (3) que llevará a la creación del campo eléctrico (4).

### 1.3 Termoforesis

Termoforesis, descubierto por Carl Ludwig en 1856 [42], es un fenómeno que ocurre cuando un gradiente de temperatura se presenta en un fluido y no sólo induce un flujo de calor, sino también un flujo de moléculas [43], las cuales tienden a moverse hacia las regiones de baja temperatura debido al gradiente de temperatura [44] [45]. El

mecanismo de termoforesis es capaz de manipular múltiples partículas a lo largo de gradientes de temperatura, generalmente de caliente a frío [7] [19]. Cuando los gradientes de temperatura son producidos por un láser, el efecto se llama fotoforesis. Típicamente es órdenes de magnitud mayor a la fuerza  $F_{\text{grad}}$ , incluso puede llegar a opacarla completamente [14].

La fuerza ejercida por el gradiente de temperatura se llama fuerza termoforética y muchas veces es contrarrestada por la fuerza de arrastre,  $F_{\text{drag}}$  [46]. La fuerza termoforética induce migración de partículas en dirección opuesta al gradiente de temperatura, de la zona más caliente a la más fría. Si hay muchas partículas en el fluido causa una distribución de partículas no uniforme. Entre mayor sea la fuerza termoforética, mayor es el gradiente de concentración y por tanto la distribución de partículas será menos uniforme [47].

### 1.3.1 Fuerzas termoforética

La fuerza termoforética en un gas es fuertemente dependiente del número de Knudsen,  $\text{Kn} = L/r_p$ , donde  $L$  es el camino medio libre del gas [44] [46]. Hay tres regímenes dependiendo del valor de  $\text{Kn}$ : Régimen continuo, cuando  $\text{Kn} \ll 1$  (partículas grandes), régimen de transición ( $0.1 < \text{Kn} < 10$ ) y régimen de moléculas libres, para  $\text{Kn} \gg 1$  (partículas pequeñas).

El régimen  $\text{Kn} \ll 1$  es considerado para encontrar una expresión para la fuerza termoforética, que está dado por  $\mathbf{F}_{\text{th}} = 6\pi\eta r_p \mathbf{v}_{\text{th}}$ , donde  $\mathbf{v}_{\text{th}}$ , llamada velocidad termoforética [44], es la velocidad con la que la partícula es expulsada de la zona caliente por lo que dependerá del gradiente de temperatura del gas y está dada por la ecuación de Epstein como

$$\mathbf{v}_{\text{th}} = -\frac{3}{2} \frac{k_f}{2k_f + k_p} \frac{\nu}{T} \nabla T, \quad (1.21)$$

donde  $\nu = \eta/\rho$  es la viscosidad cinemática,  $\rho$  es la densidad,  $k_f$  y  $k_p$  son la conductividad térmica del gas y de la partícula, respectivamente y  $\nabla T$  es el gradiente de temperatura del gas. Así, la fuerza termoforética se reescribe como

$$\mathbf{F}_{\text{th}} = -\frac{9\pi\eta^2 r_p}{\rho T} \frac{k_f}{2k_f + k_p} \nabla T. \quad (1.22)$$

No existe una expresión para la fuerza termoforética en un líquido, pero hay reportes donde han calculado la velocidad termoforética en líquidos, y para el caso de partículas de látex de 1.011 y 0.790  $\mu\text{m}$ , en agua, se ha encontrado una expresión muy similar a la de la ecuación (1.21), donde la velocidad en los líquidos es aproximadamente 17% la predicha por la velocidad en un gas [48], es decir,

$$\mathbf{v}_{\text{th}} = -0.26 \frac{k_f}{2k_f + k_p} \frac{\nu}{T} \nabla T. \quad (1.23)$$

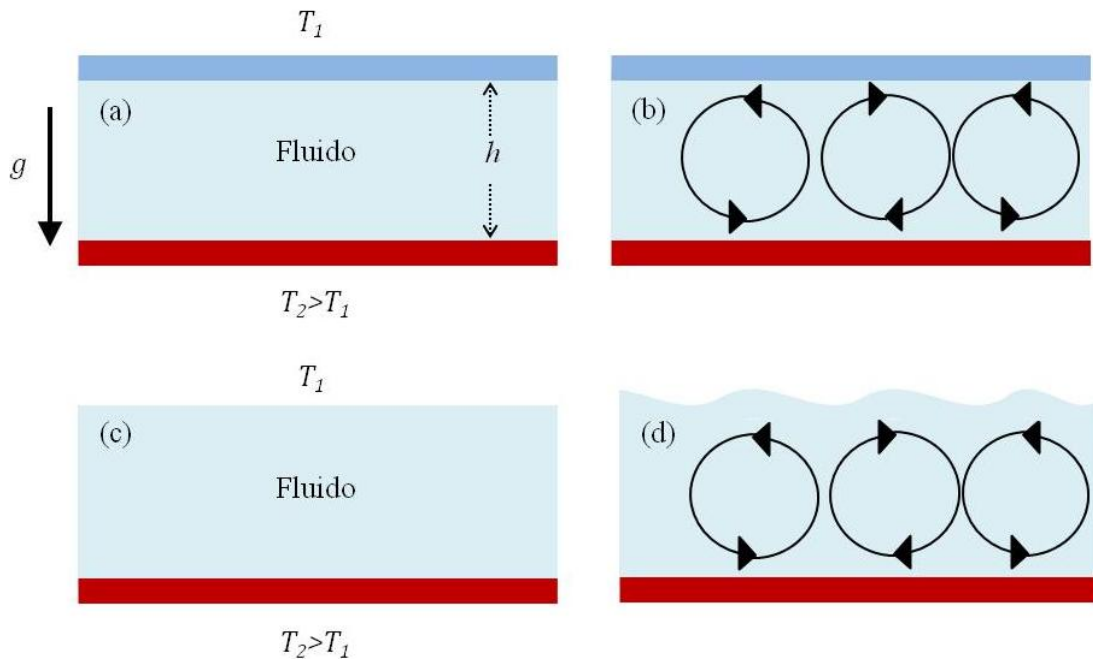
### 1.3.2 Corrientes de convección

Generalmente, las condiciones para medir termoforesis ignoran el flujo que hay en el fluido, pero la combinación de termoforesis y corrientes de convección en el fluido pueden generar captura de partículas a lo largo de grandes rangos, por ejemplo captura de biomoléculas [7] o concentración de DNA [19].

La FIG. 1.8 muestra una película delgada de fluido de espesor  $h$ , donde la parte superior tiene una temperatura  $T_1$  y la pared inferior una temperatura  $T_2 > T_1$ , la gravedad  $g$  va en la misma dirección al gradiente de temperatura. Cuando el fluido está contenido entre dos paredes rígidas a diferentes temperaturas, como en la FIG. 1.8(a), las corrientes son llamadas corriente de convección de Rayleigh-Bénard (RBC) [49] [50]. El fluido cerca de la pared a temperatura  $T_2$  se vuelve más ligero, se eleva para enfriarse y se convierte en un flujo que forma una célula de convección, FIG. 1.8(b). Las corrientes RBC llevan este nombre en honor a Henri Bernard quien observó por primera vez el fenómeno, y a Lord Rayleigh quien fue el primero en

resolver el problema [51], además demostró que un fluido estacionario en el estado inicial se vuelve inestable cuando se aplica una diferencia de temperatura [52].

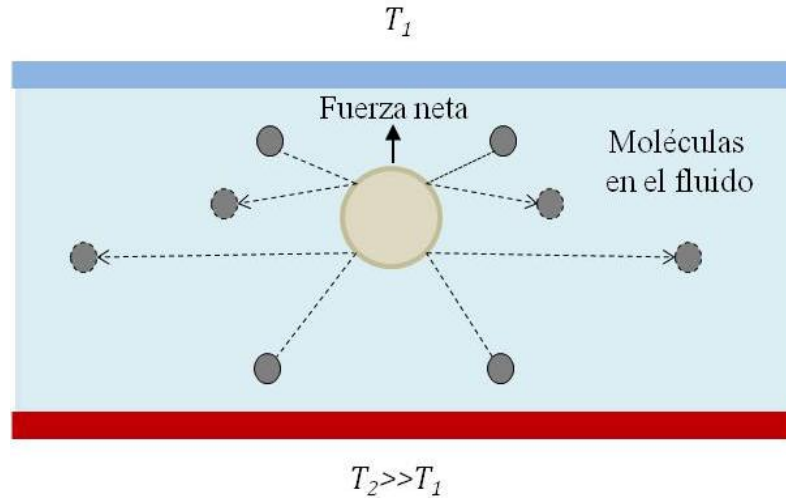
En cambio, los líquidos sujetos a gradientes de temperatura en superficies libres, FIG. 1.8(c), pueden generar corrientes de convección debido a la tensión superficial dependiente de la temperatura. Este efecto es conocido como efecto Marangoni [9]. En este caso, el gradiente de temperatura genera una disminución local en la tensión superficial provocando un gradiente de tensión superficial que conducirá al flujo que forma una célula de convección y deforma la superficie, FIG. 1.8(d).



**FIG. 1.8.** Corrientes de convección en un líquido de altura  $h$ . (a) Dentro de una celda de paredes rígidas, (b) con una temperatura mayor en la pared inferior, lo que provocará un patrón celular de corrientes RBC. (c) Cuando tiene la superficie libre, (d) con una temperatura menor a la pared inferior creará un patrón de corriente de Marangoni que deformará la superficie del líquido. Imagen tomada de [53].

Si  $T_2 \gg T_1$ , las moléculas del fluido que están en las zonas más calientes pueden golpear con mayor momento, a partículas, que las moléculas del fluido que se

encuentran en zonas más frías [45], como se muestra en la FIG. 1.9, así el fluido experimentará la fuerza  $F_{th}$ .



**FIG. 1.9.** Transferencia de momento molécula-partícula en un fluido. Las moléculas del fluido que vienen de las zonas calientes transfieren momento a las partícula, mientras que las que vienen de zonas frías adquieren momento. Como resultado, las partículas experimentan una fuerza neta que las mueve fuera del gradiente de temperatura.

Los parámetros que describen la convección son el número de Rayleigh,  $R_a$ , número de Marangoni,  $M_a$ , y número de Prandtl,  $P_r$ :

$$R_a = \frac{\gamma g h^3 \Delta T}{\nu \kappa}, \quad (1.24a)$$

$$M_a = -\frac{\partial S}{\partial T} \frac{h \Delta T}{\eta \kappa}, \quad (1.24b)$$

$$P_r = \frac{\nu}{\kappa} \quad (1.24c)$$

donde  $\gamma$  es el coeficiente de expansión térmica y  $\kappa = k_f / (\rho c_p)$  es la difusividad térmica, con  $c_p$  como la capacidad calorífica.  $\partial S / \partial T$  es el gradiente de tensión superficial [54].

## **1.4 Otras técnicas de manipulación**

### **1.4.1 Pinzas optoelectrónicas.**

Las pinzas optoelectrónicas son una novedosa técnica propuesta por P.Y. Chiou y colaboradores en el 2005 [8], que complementa las tecnologías de manipulación existentes [55] y requiere 100 mil veces menos intensidad que las OT. Es una técnica que utiliza patrones de luz directamente sobre una superficie fotoconductor para crear dielectroforesis de alta resolución y manipular paralelamente partículas individuales. Se han utilizado en partículas de poliestireno, la bacteria *E. coli*, glóbulos blancos y rojos, diferentes tipos de células y protozoarios. También se ha implementado en la manipulación de semiconductores y nanocables metálicos [55].

### **1.4.2 Magnetoforesis.**

Magnetoforesis describe el comportamiento de una partícula magnética moviéndose a través de un medio viscoso bajo la influencia de un campo magnético externo. Bajo condiciones bien controladas puede servir para separar células en su medio natural, de manera muy eficaz y a bajo costo, por lo que se pueden estudiar células biológicas individuales, como glóbulos blancos y rojos, que son de gran interés en biomedicina y en diagnóstico y terapia clínica [56] [57]. En conjunto con otras áreas se aplica en la separación de células biomagnéticas y detección de impurezas paramagnéticas en muestras diamagnéticas en fluidos [56].

### **1.4.3 Electroosmosis**

En 1921 von Smoluchowski consideró el movimiento de líquido adyacente a una superficie de un electrodo bajo la influencia de un campo eléctrico aplicado paralelo a la interfaz solución-electrodo [58]. Si el electrodo estaba cargado negativamente, había un exceso de iones positivos en el líquido adyacente que se movían en el campo



eléctrico aplicado y se arrastraban a lo largo del líquido. Electroosmosis describe el flujo de un líquido iónico bajo la acción de un campo eléctrico aplicado con respecto a una superficie cargada. Sus aplicaciones se encuentran en genómica [59], proteómica [60], química analítica [61], y se ha utilizado para purgar contaminantes, por ejemplo en arcilla saturada [10].

#### **1.4.4 Microfluídica**

La microfluídica es un campo dedicado a la manipulación de fluidos. Los fluidos se pueden utilizar para transportar sustancias a analizar a través de circuitos microfotónicos altamente sensibles [11]. La fuerza en los canales de los microfluidos puede utilizarse para mantener células en su lugar para formación de imágenes o bien, para centrar biomoléculas en la región de detección y mejorar el límite de detección [62].

#### **1.4.5 Optofluidos**

Optofluidos es una combinación de la fotónica con microfluidos [12]. Dado que los fluidos cuentan con propiedades ópticas únicas, se pueden modificar para crear sistemas ópticos sintonizables, reconfigurables y adaptativos [11]. Sus aplicaciones caen dentro de las mismas que microfluídica, por lo que se usa en química analítica, síntesis de materiales y biotecnología.

## **Capítulo 2.**

# **CORRIENTES DE CONVECCIÓN Y FOTOFORESIS GENERADOS POR LÁSER**

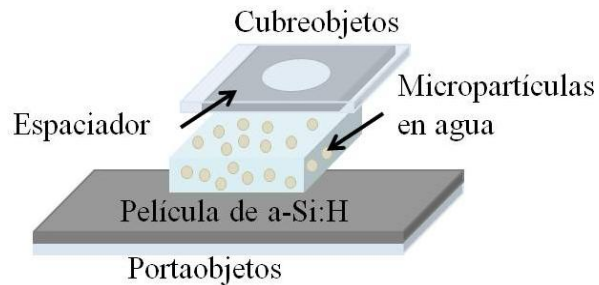
Las corrientes de convección inducidas por láser han sido un método alternativo para manipulación de objetos de 1 a 500  $\mu\text{m}$  en un medio líquido. La absorción del láser crea gradientes de temperatura que generan corrientes de Rayleigh-Bénard y de Marangoni, los cuales son capaz de atrapar micropartículas [63]. Se ha demostrado que burbujas de gas en aceite pueden ser manipuladas por fuerzas termocapilares debido a gradientes de temperatura producidos por la absorción de un láser semiconductor, de 635 nm y 10 mW de potencia, en un semiconductor delgado de a-Si:H [64]. También se ha mostrado que al utilizar un láser de 532 nm y una potencia  $>100$  mW sobre un sustrato metálico se pueden crear burbujas de gas que, junto con las corrientes de convección, permiten atrapar micropartículas diluidas en agua alrededor de la zona de la burbuja, produciendo un atrapamiento en forma de anillo [65].

En este capítulo se describe la captura y manipulación de micropartículas en un gradiente de temperatura dentro de una celda con agua. Se demuestra que al introducir una película absorbente aparecen tres fenómenos debido al gradiente de temperatura: corrientes de convección, fotoforesis y burbujas de vapor. El gradiente de temperatura generado por la absorción láser de una película de a-Si:H, hace que el líquido en la zona caliente se mueva hacia la zona más fría, provocando corrientes por una fuerza boyante, y dependiendo de la potencia del láser también se presenta fotoforesis y la creación de una burbuja de vapor. Como ya se mencionó, en las zonas calientes las moléculas del líquido tienen mayor energía cinética por lo que se produce una fuerza neta que va de la zona caliente hacia la fría.

## 2.1 Materiales y métodos

### 2.1.1 Celda utilizada en los experimentos

La celda se creó mediante la colocación de agua con micropartículas (2.5  $\mu\text{m}$  de diámetro) sobre una película delgada de a-Si:H de 1  $\mu\text{m}$  de espesor depositada en un portaobjetos, como se muestra en la FIG. 2.1. Con ayuda de un cubreobjetos y un espaciador se creó una alberca de agua de  $h \sim 100 \mu\text{m}$ .



**FIG. 2.1.** Esquema de las componentes de la celda de agua con micropartículas.

#### 2.1.1.1 Micropartículas de óxido de silicio

Se trabajó con micropartículas de óxido de silicio, también conocido como sílice (Polysciences, Inc), en su presentación de 2.5 +/- 0.15  $\mu\text{m}$  de diámetro (composición de 10% sílice y 90% agua) [66] [67]. Es un material fácil de manejar y cuenta con propiedades como: composición  $\text{SiO}_2$ , no porosa; índice de refracción de  $\sim 1.43-1.46$  (para 589 nm); constante dieléctrica de 3.8 y resistencia a temperaturas hasta 1000  $^{\circ}\text{C}$ .

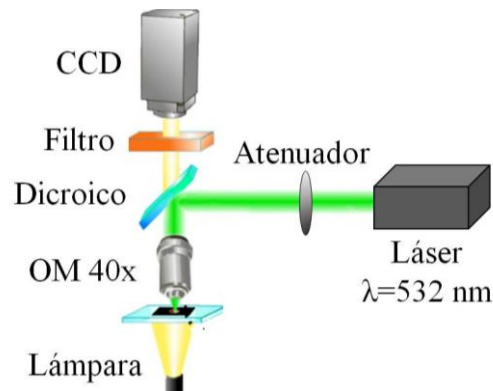
#### 2.1.1.2 a-Si:H

Se utilizó una película de a-Si:H, de alto coeficiente de absorción ( $\alpha_a \sim 2.77 \times 10^6 \text{ m}^{-1}$  para  $\lambda = 532 \text{ nm}$ ), que al absorber la luz láser sirvió como fuente de calor para generar los gradientes de temperatura y las corrientes de convección. El a-Si:H se caracteriza por [68] [69]: ser un semiconductor de producción barata, poderse

depositar en películas con diferentes diseños y/o estructuras, en grandes áreas y absorber la mayor parte de la energía que se le incide.

### 2.1.2 Arreglo experimental

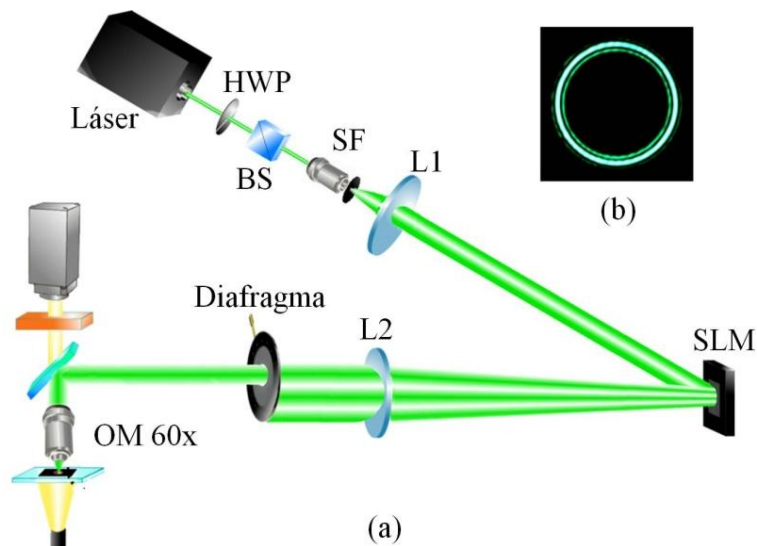
La FIG. 2.2 muestra el arreglo experimental. Se utilizó un láser Nd:YAG de doble frecuencia (Klasech,  $\lambda = 532 \text{ nm}$  de 1 W). Se colocó un atenuador a la salida del láser para controlar la potencia de incidencia en la celda y un espejo dicróico 50/50 para dirigir el haz a la entrada de un objetivo de microscopio 40x (N.A. 0.65), que transmitía el 85% de la luz. Se enfocó el haz gaussiano con un spot de  $10 \mu\text{m}$  de diámetro sobre la superficie del a-Si:H, colocada en una montura con desplazamiento en 3D. Las partículas atrapadas fueron iluminadas con una lámpara de luz blanca y fueron monitoreadas con ayuda del mismo objetivo de microscopio y con una cámara CCD (30 fps, CoHU 4815). Se agregó un filtro óptico frente a la cámara para bloquear la luz verde reflejada y evitar saturación.



**FIG. 2.2.** Esquema del arreglo óptico. El láser pasa a través del atenuador (A), el espejo dicróico (D) y el objetivo de microscopio (OM) 40x. Para el monitoreo de partículas se utiliza la fuente de luz blanca y la cámara CCD. Se coloca el filtro óptico (F) para bloquear la luz del láser y no saturar la cámara.

La FIG. 2.3(a) muestra la modificación del arreglo óptico para implementar un modulador de luz espacial (SLM, por sus siglas en inglés) y hacer atrapamiento

dinámico usando un haz en forma de anillo. En este caso, la potencia láser se controló con ayuda de un retardador de media onda (HWP) y un cubo divisor de haz polarizado (BS). El haz láser se filtró con un objetivo de microscopio 10x y un pinhole de  $25\ \mu\text{m}$ , y se colimó con una lente (L1) de distancia focal  $f = 10\ \text{cm}$ , el cual se direccionó hacia el SLM de solo fase (Holoeye PLUTO-VIS), con un ángulo de incidencia menor a  $10^\circ$  para asegurar una modulación de fase óptima. Un holograma sintético de fase (SPH), desplegado en el SLM, en el que se codifica la fase binaria de un haz Bessel de orden cero,  $\text{sign}[J_0(2\pi k_0 r)]$ , donde la función sign toma los valores de fase  $0$  o  $\pi$ ,  $k_0$  es la frecuencia espacial y  $r$  es la coordenada radial, al obtener su transformada de Fourier utilizando la lente L2 ( $f = 75\ \text{cm}$ ), se obtiene un anillo de radio  $r_0 = \lambda f k_0$  [70]. Un diafragma ayudó a seleccionar el haz de primer orden para después enfocararlo sobre la celda mediante un objetivo de microscopio 60x (N.A. 0.85), colocado a la distancia focal de la lente. La FIG. 2.3(b) muestra una imagen experimental del haz en forma de anillo.

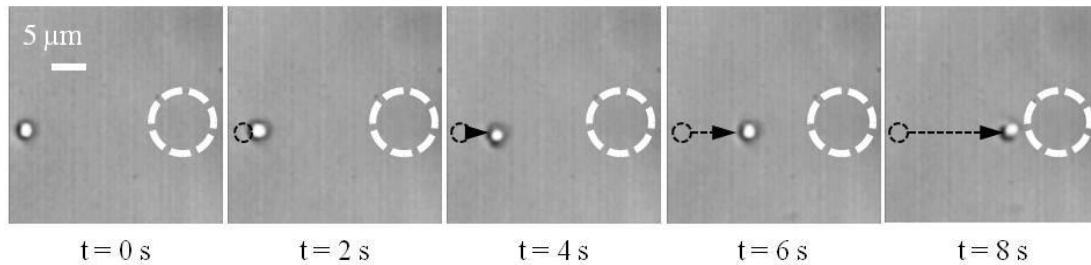


**FIG. 2.3.** Arreglo óptico modificado [71]. La potencia del láser es controlado con el retardador de media onda (HWP) y el cubo divisor de haz polarizado (BS). El haz es filtrado (SF), colimado y dirigido al SLM, que obtiene el anillo mediante la transformada de Fourier por la lente de  $f = 75\ \text{cm}$ . Se selecciona el haz de primer orden con el diafragma. (b) Imagen experimental del haz en forma de anillo proyectado sobre la película de a-Si:H.

## 2.2 Resultados

### 2.2.1 Captura de una sola micropartícula

Para determinar la magnitud de la velocidad de las corrientes de convección se realizó el estudio de una sola micropartícula a diferentes distancias del spot utilizando diferentes potencias. El spot incidente sobre la superficie del a-Si:H generó el movimiento del agua por corrientes de convección, debido al diseño de la muestra (celda de la FIG. 2.1), y se observó cómo la micropartícula comenzó a ser arrastrada hacia la zona del spot. La FIG. 2.4 muestra un ejemplo del desplazamiento de un micropartícula, utilizando una potencia de 5 mW. Esta micropartícula se encontraba colocada aproximadamente a  $17\ \mu\text{m}$  del borde del spot y se fue moviendo hacia el spot en un tiempo de 8 segundos.



**FIG. 2.4.** Atrapamiento de una sola micropartícula. Con una potencia de 5 mW, la micropartícula que se encontraba a  $17\ \mu\text{m}$  del spot se movió a una velocidad de  $2.4\ \mu\text{m/s}$ . El círculo punteado blanco indica la posición del spot y el círculo punteado negro la posición inicial de la micropartícula.

Para obtener las velocidades de la micropartícula se utilizó un código de MATLAB que realizaba el seguimiento de la micropartícula (Apéndice A.1) y se obtuvo la posición de la partícula en  $x$  y  $y$ , en función del tiempo,  $t$ . Para obtener la velocidad promedio se tomó en cuenta que la partícula se aceleraba en el eje  $x$  conforme se acercaba al haz, por lo que se hizo un ajuste  $x = at^2 + bt + c$  para tener una velocidad  $v = 2at + b$  (más detalles en el Apéndice A.2). En el caso de la micropartícula de la FIG. 2.4, la velocidad promedio fue de  $2.4\ \mu\text{m/s}$ . Se realizaron

experimentos usando potencias de 2, 5, 8 y 11 mW, y colocando la micropartícula a 8, 12, 16 y 20  $\mu\text{m}$  del spot (distancias aproximadas, pues la partícula tendía a moverse por movimiento browniano). El seguimiento de la micropartícula se realizó hasta que se encontraba en la orilla del spot, o se veía que era rebotada. La gráfica de la FIG. 2.5 muestra las velocidades promedio de la micropartícula dependiendo de la distancia a la que se encontraba del spot, usando diferentes potencias láser.

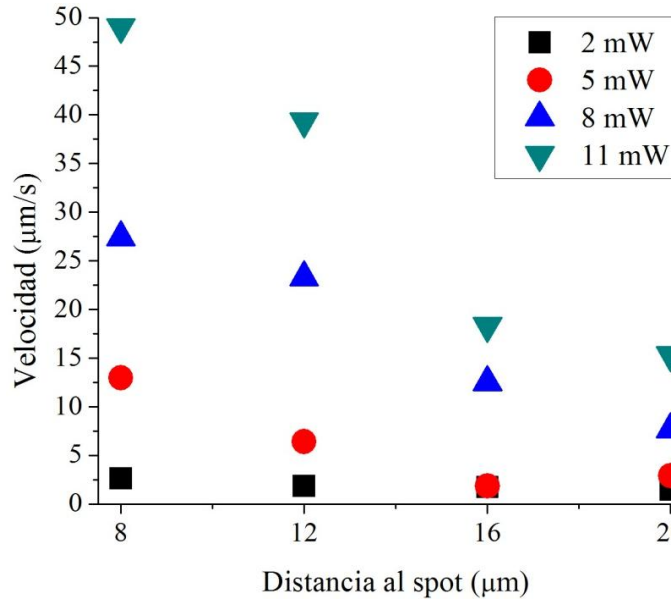


FIG. 2.5. Velocidad en función a la distancia al spot para varias potencias.

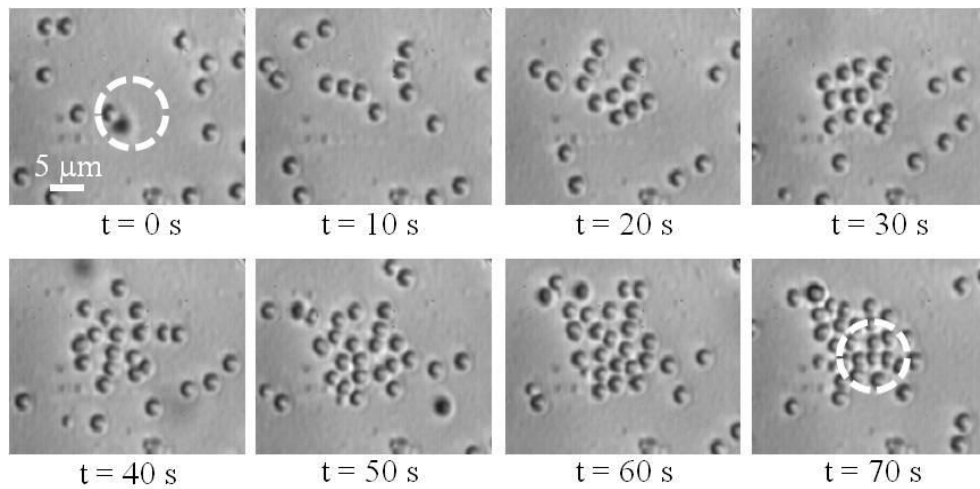
## 2.2.2 Captura y manipulación de múltiples micropartículas

Se realizaron captura y manipulación de micropartículas usando diferentes potencias (1 – 11 mW). Dependiendo de la potencia utilizada se observó atrapamiento por corrientes de convección o por la combinación de corrientes de convección y fotoforesis.

### 2.2.2.1 Captura por corrientes de convección

Utilizando baja potencia ( $<3$  mW), las micropartículas son arrastradas desde grandes distancias (las micropartículas entran al campo de visión de la cámara) y se van

acumulando de manera simétrica a la zona donde se localiza el spot, durante todo el tiempo que el láser esté incidiendo sobre la película de a-Si:H, esto es debido a las corrientes de convección generadas por el láser. La FIG. 2.6 muestra un atrapamiento usando 1 mW de potencia, que aunque atrapa muchas micropartículas al mismo tiempo, a una velocidad promedio de  $2 \mu\text{m/s}$ , el tiempo que se requiere para atraparlas es largo, alrededor de 1 minuto. Al aumentar la potencia láser, el tiempo de captura es menor pero aparece una nueva fuerza que modifica la forma de atrapamiento, como se verá a continuación.



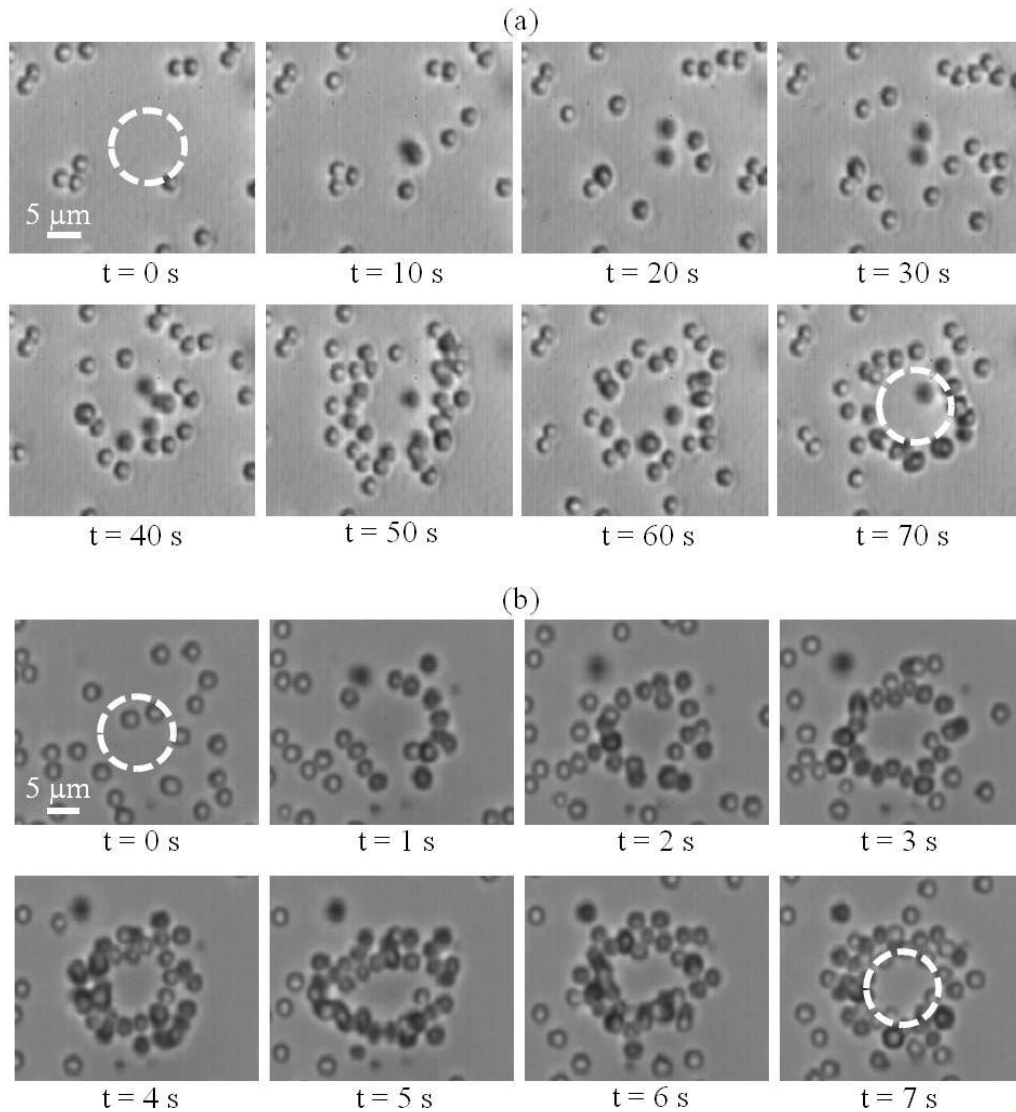
**FIG. 2.6.** Atrapamiento de múltiples micropartículas (1 mW de potencia). Las micropartículas son acumuladas en la zona del spot (círculo punteado).

### 2.2.2.2 Captura por corrientes de convección y fotoforesis

Cuando se utilizan potencias arriba de 3 mW, el comportamiento de las micropartículas atrapadas es diferente. Para una potencia de 4 mW, FIG. 2.7(a), el tiempo de atrapamiento (definido como el tiempo en que la partícula es arrastrada desde su posición inicial hasta que está dentro o en la orilla del haz gaussiano) es menor que usando 1 mW y se observa que aunque las micropartículas se van acumulando no hay atrapadas en el centro del spot, ya que la fuerza termoforética ocasiona que las micropartículas que están en la zona del spot sean expulsadas a las zonas más frías. Para potencias más altas, por ejemplo 6 mW como en la FIG. 2.7(b),



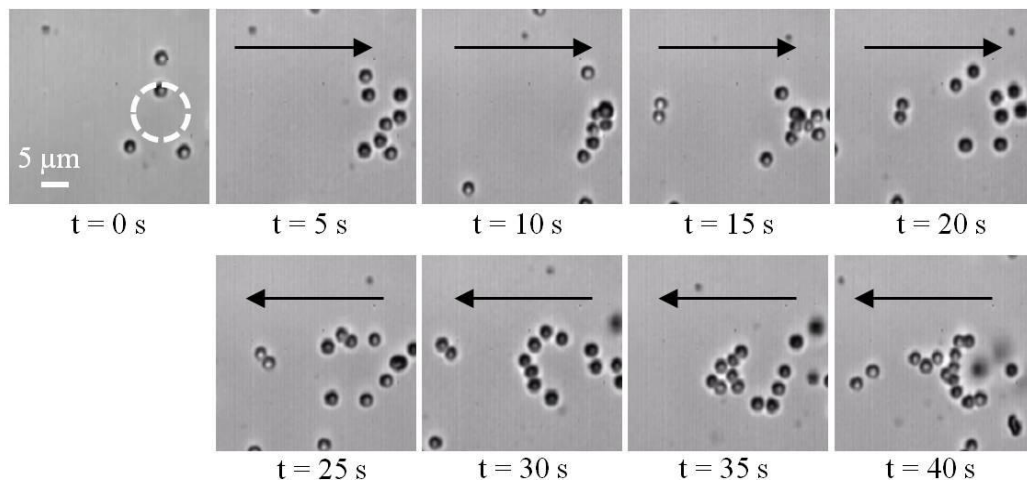
el tiempo de atrapamiento es menor y la fuerza termoforética es mayor, por lo que las micropartículas son repelidas del centro del spot más rápido. En este caso (potencias  $>3$  mW), las micropartículas se mueven dentro y fuera del foco rápidamente (más visible en potencias más altas) por la competencia de dos fuerzas: fuerza de arrastre que acarrea micropartículas hacia el spot y fuerza termoforética que las expulsa de la zona caliente, formando así un anillo de micropartículas atrapadas alrededor del spot.



**FIG. 2.7.** Atrapamiento de micropartículas usando potencias arriba de 3 mW. Se observa que micropartículas lejanas son arrastradas hacia el spot (círculo punteado) pero a su vez, las que están en la zona del spot son expulsadas, quedando atrapadas alrededor del spot. Se aplicó una potencia de (a) 4 mW y (b) 6 mW.

### 2.2.2.3 Manipulación de micropartículas

También se puede lograr la manipulación de múltiples micropartículas moviendo la montura 3D en los ejes  $x$  y  $y$ . La manipulación es mejor entre 5 y 10 mW porque el tiempo de captura es solo de pocos segundos. La FIG. 2.8 muestran la manipulación a 7 mW de potencia donde se fue moviendo la celda de izquierda a derecha y después de derecha a izquierda. Se observa cómo se van arrastrando las micropartículas, y a la vez, se van acumulando del lado del spot hacia donde se mueve la celda, como si el spot las estuviera atrayendo a lado contrario.

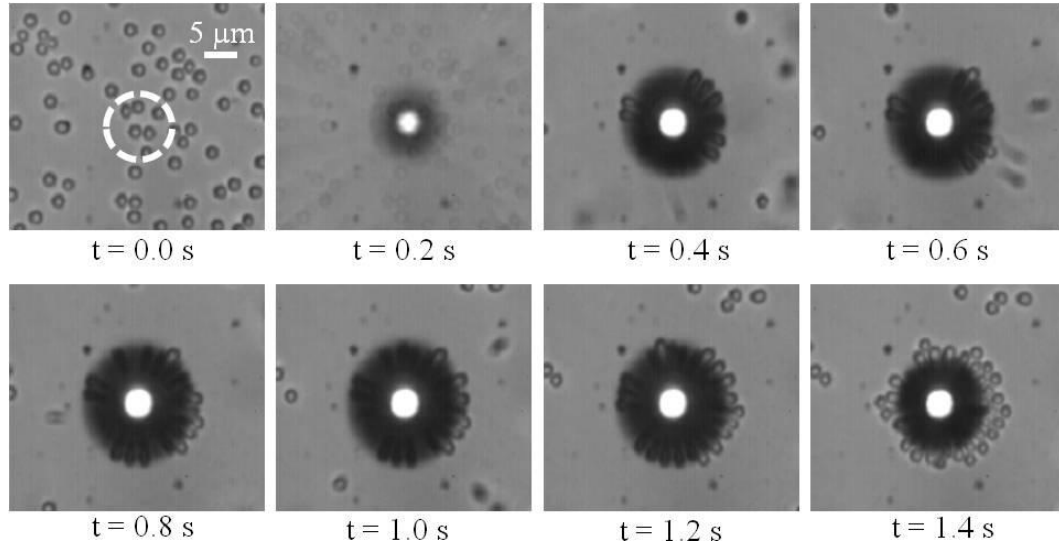


**FIG. 2.8.** Manipulación de múltiples micropartículas usando una potencia de 7 mW. La flecha negra indica la dirección del movimiento de la celda y el círculo punteado la posición del spot, el cual permaneció fijo.

### 2.2.3 Captura mediante una burbuja de vapor

Cuando se enfoca el haz láser sobre el a-Si:H usando potencias más altas ( $>12$  mW), la temperatura del agua alcanza el punto de ebullición y puede producir una burbuja de vapor, como se ha reportado en [65]. Las corrientes de convección y la superficie de la burbuja también producen atrapamiento en forma de anillo, la cual logra que las micropartículas sean atrapadas a velocidades muy altas (para 13 mW de potencia,  $\sim 300$   $\mu\text{m/s}$ , como se muestra en la FIG. 2.9). Aunque las burbujas de vapor se pueden aplicar para la clasificación de micropartículas por tamaño, en general, en los

mecanismos de captura, la formación de burbujas es un efecto indeseable (es preferible trabajar a  $T < 40^{\circ}\text{C}$  en muestras biológicas para evitar daño).

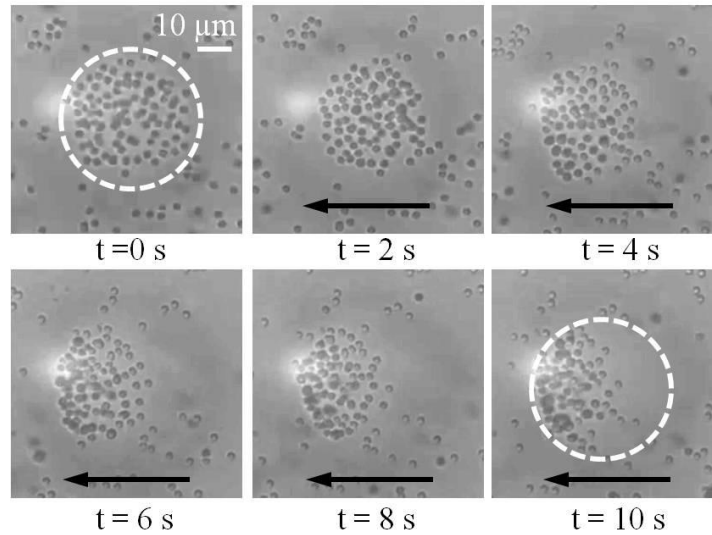


**FIG. 2.9.** Atrapamiento de micropartículas con una burbuja de vapor, usando 13 mW. La burbuja de vapor se forma en la posición del spot (círculo punteado) y las partículas se mueven a una velocidad de  $\sim 300 \mu\text{m/s}$ .

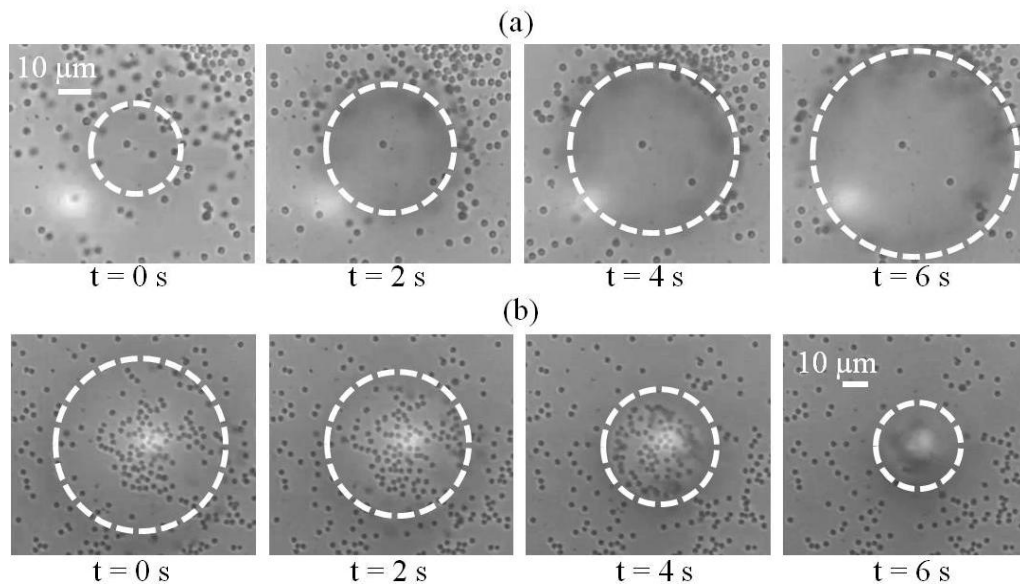
#### 2.2.4 Manipulación mediante un anillo de luz generado con un SLM

Usando el anillo de luz generado por el SLM, descrito en la sección 2.1.2 del arreglo experimental, las partículas pueden ser atrapadas simétricamente hacia el centro y por fuera del anillo. En este caso, aunque se trabajó con una potencia de hasta 20 mW, no se generó burbuja de vapor como cuando se usó el haz gaussiano enfocado directamente en el a-Si:H, pues la intensidad local era la que producía la vaporización en el agua. La FIG. 2.10 muestra una captura de múltiples micropartículas aplicando una potencia de 18 mW. La montura se fue moviendo de manera horizontal hacia la izquierda (dirección de la flecha negra) y las micropartículas se fueron arrastrando dentro del anillo. Por último, se realizó atrapamiento dinámico con anillos de luz de diferentes radios, cuando el anillo se abre (el radio del anillo va aumentando), FIG. 2.11(a), y cuando el anillo se cierra (el radio va disminuyendo), FIG. 2.11(b). Las

micropartículas cerca del centro del anillo se desenfocan debido a las corrientes de convección generadas por difusión de calor.



**FIG. 2.10.** Atrapamiento de micropartículas mediante un haz en forma de anillo. Se observa como las micropartículas se repelen hacia el centro del anillo.



**FIG. 2.11.** Atrapamiento dinámico mediante un haz en forma de anillo (círculo punteado). (a) Anillo con el radio aumentando y (b) anillo con el radio disminuyendo de tamaño.

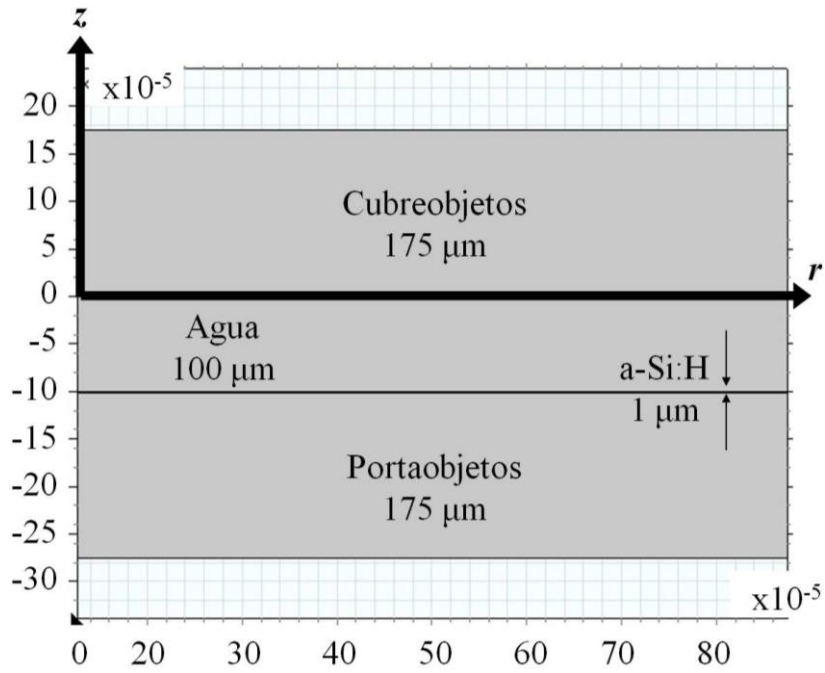
## 2.3 Simulaciones

### 2.3.1 COMSOL Multiphysics

COMSOL Multiphysics es un método de elementos finitos que compila internamente un conjunto de ecuaciones que representan todo un modelo, mediante secuencias que registran un problema desde la geometría, el mallado, el estudio (física del problema), el resolvidor, la visualización y la presentación de resultados, por lo que se puede modificar cualquier parte del modelo y volver a resolver [72]. Con ayuda de COMSOL en su versión 4.4 se simuló la celda de la FIG. 2.1, en un espacio-dimensión 2D con simetría axial, resolviendo de manera estacionaria los módulos de "Heat Transfer in Fluids" y "Laminar Flow in Single-Phase Flow", tomando como condiciones iniciales una temperatura ambiente de 293.15 K, una presión atmosférica de  $1 \times 10^5$  Pa y un fluido inmóvil ( $v = 0$  m/s).

La FIG. 2.12 muestra la geometría del modelo, donde se observa que se colocaron tres dominios (vidrio, agua y a-Si:H) de la siguiente manera: el vidrio del cubreobjetos en  $r = 0$ ,  $z = 0$ ; agua de  $h = 100$   $\mu\text{m}$  en  $r = 0$ ,  $z = -100$   $\mu\text{m}$ ; la película de 1  $\mu\text{m}$  de a-Si:H en  $r = 0$ ,  $z = -101$   $\mu\text{m}$  y vidrio del portaobjetos en  $r = 0$ ,  $z = -276$   $\mu\text{m}$ .

Las propiedades del agua y del vidrio, se encuentran disponibles en COMSOL. Los resultados numéricos mostraron que la temperatura puede alcanzar los 100°C por lo que se tomó en cuenta la dependencia de la temperatura en los parámetros del agua y además se agregaron las del a-Si:H manualmente. Los parámetros introducidos aparecen en la TABLA 2.1 [73] [74], donde  $k$  es la conductividad térmica,  $\rho$  es la densidad,  $c_p$  es la capacidad calorífica y  $\alpha_a$ : es el coeficiente de absorción.



**FIG. 2.12.** Geometría del modelo en COMSOL. Se colocaron las componentes de la celda, con espesores de 100  $\mu\text{m}$  de agua, 1  $\mu\text{m}$  de a-Si:H y 175  $\mu\text{m}$  de vidrio a los extremos, todas las componente de 1 mm de largo (en el eje  $r$ ).

**TABLA 2.1.** Propiedades de los materiales: agua y a-Si:H

Parámetros	Agua	a-Si:H
$k$ (W/mK)	$-0.87+9\times 10^{-3}T-1.6\times 10^{-5}T^2+8\times 10^{-9}T^3$	1.5
$\rho$ (kg/m <sup>3</sup> )	$838.47+1.4T-3\times 10^{-3}T^2+3.7\times 10^{-7}T^3$	2330
$c_p$ (J/kgK)	$1.2\times 10^4-80.41T+0.31T^2-5.3\times 10^{-4}T^3+3.6\times 10^{-7}T^4$	992
$\alpha_a$ (1/m), $\lambda=532$ nm	$3.5413\times 10^{-2}$	$2.77\times 10^6$

### 2.3.2 Transferencia de calor

La película de a-Si:H le transfería calor al líquido adyacente, así que se utilizó el módulo de "Heat Transfer in Fluids" que modela la ecuación de transferencia de calor de manera estacionaria

$$\rho c_p \mathbf{v} \cdot \nabla T = \nabla \cdot (k \nabla T) + Q_{hs}, \quad (2.1)$$

donde  $\mathbf{v}$  es el campo de velocidad y  $Q_{hs} = \alpha_a \mathbf{I}$  es la fuente de calor.

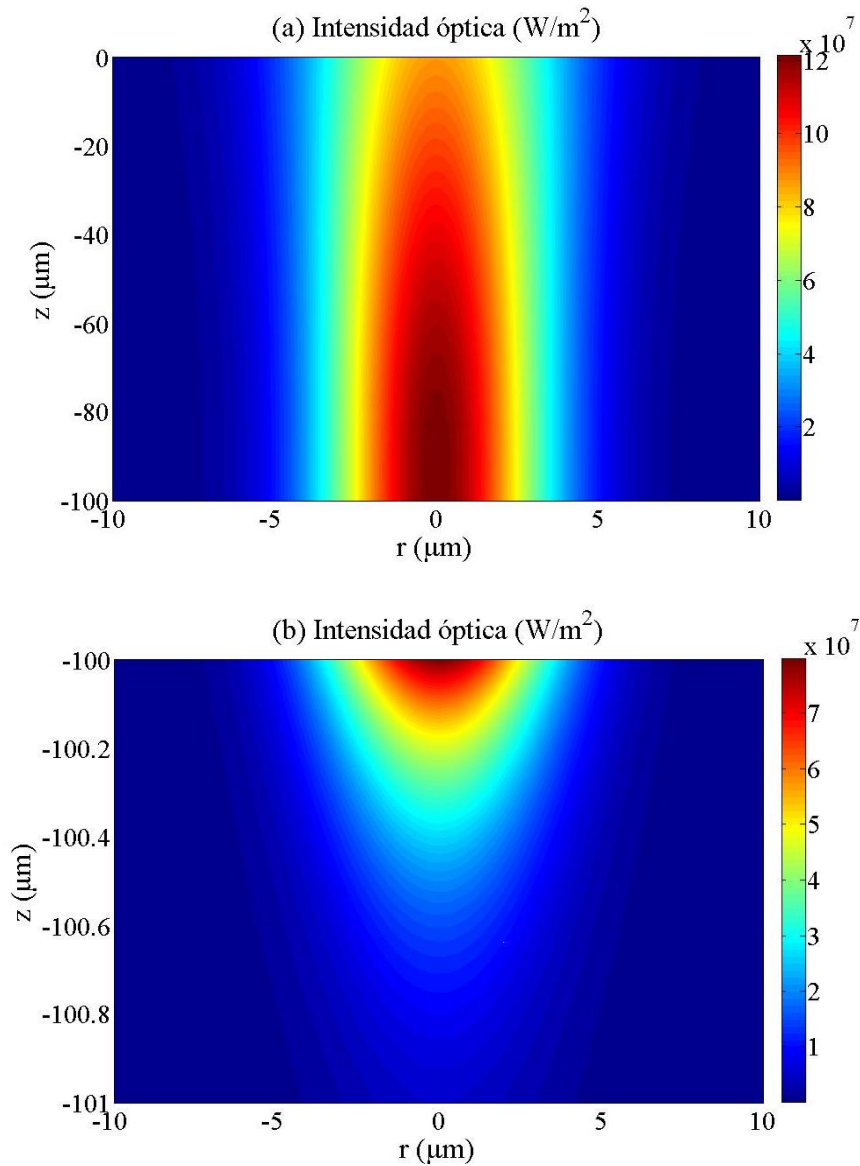
Se agregaron dos fuentes de calor, con una distribución de intensidad de haz gaussiano, en dominio del agua ( $I_{\text{agua}}$ ) y en el dominio del a-Si:H ( $I_{\text{aSi}}$ ) como

$$I_{\text{agua}} = \frac{2 * P}{\pi W^2} \exp(-\alpha_{\text{a(agua)}}|z|) \exp\left(-\frac{2r^2}{w^2}\right), \quad (2.2a)$$

$$I_{\text{aSi}} = T_{\text{net}} \frac{2 * P}{\pi W^2} \exp[-\alpha_{\text{a(agua)}}h] \exp[\alpha_{\text{a(aSi)}}(z + h)] \exp\left(-\frac{2r^2}{w^2}\right), \quad (2.2b)$$

donde  $\alpha_{\text{a(agua)}}$  es el coeficiente de absorción del agua,  $\alpha_{\text{a(aSi)}}$  es el coeficiente de absorción a-Si:H,  $T_{\text{net}} = T_{\text{aire-vidrio}} T_{\text{vidrio-agua}} T_{\text{agua-aSi}} \approx 0.63$ , es la transmisión neta que toma en cuenta todas las pérdidas de Fresnell en las interfaces aire y vidrio ( $T_{\text{aire-vidrio}}$ ), vidrio y agua ( $T_{\text{vidrio-agua}}$ ) y, agua y a-Si:H ( $T_{\text{agua-aSi}}$ ).  $w = w_0 \sqrt{1 + [\lambda(z - z_0)/\pi w_0^2]^2}$  es el radio del haz,  $w_0$  es el radio de la cintura a una posición  $z_0$ .

El coeficiente de absorción del agua es bastante pequeño en comparación con el del a-Si:H, por lo que básicamente solo el a-Si:H actúa como fuente de calor. La FIG. 2.13 muestra la intensidad óptica (escala de color) en el agua y en el a-Si:H, usando como parámetros  $w_0 = 5 \mu\text{m}$ ,  $\lambda = 532 \text{ nm}$ ,  $z_0 = -95 \mu\text{m}$  y  $P = 5 \text{ mW}$ . Se observa cómo el haz atraviesa el agua, prácticamente sin pérdidas, y al llegar a la superficie del a-Si:H (en  $z = -100 \mu\text{m}$ ) es absorbido, por esta razón se comporta como fuente de calor y le transfiere calor al agua.

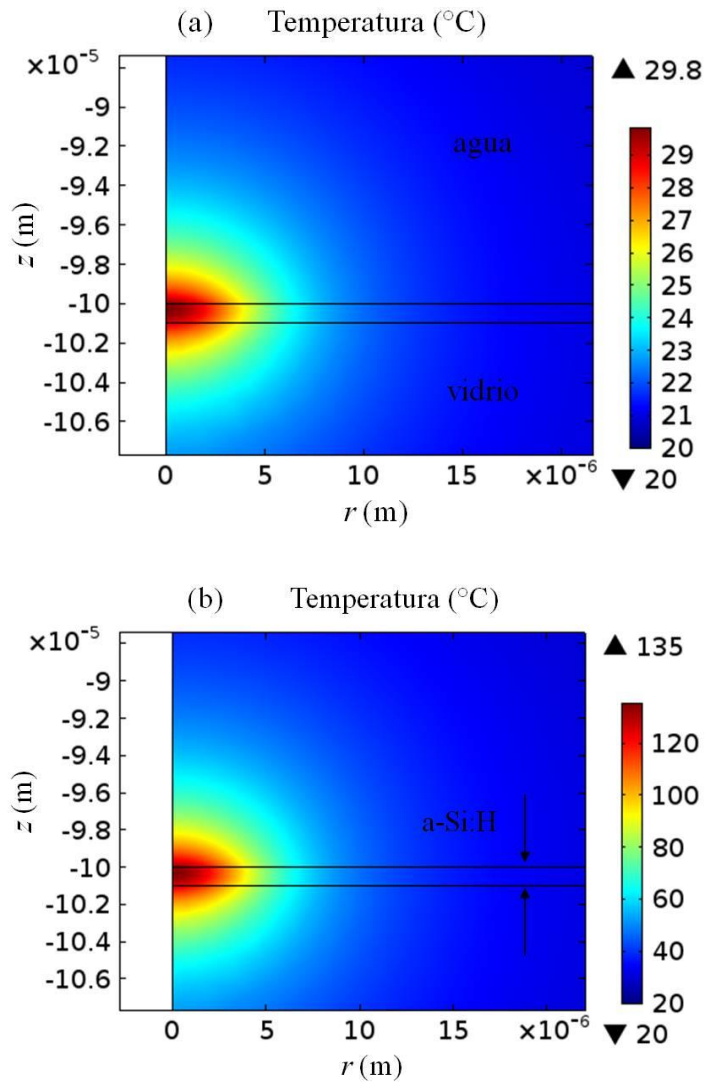


**FIG. 2.13.** Intensidad óptica que llega a la celda con 5 mW. (a) agua y (b) a-Si:H.

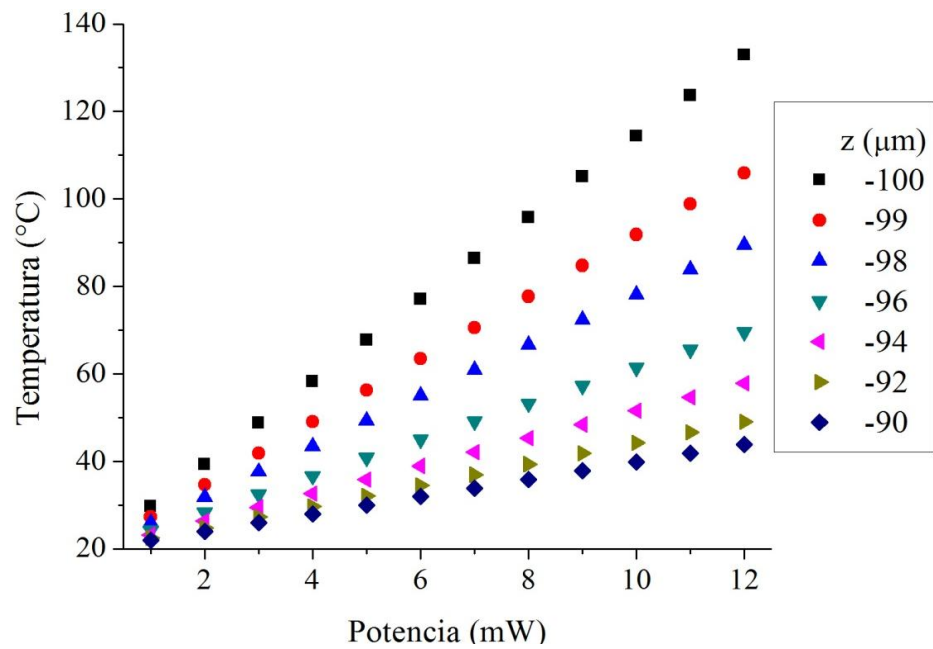
Resolviendo la ecuación (2.1), y variando la potencia del láser de 1 a 12 mW (límite en el que se comienza a formar la burbuja de vapor), se pudo encontrar la temperatura del a-Si:H y del agua (escala de color), FIG. 2.14(a-b). Para  $P > 11$  mW, la temperatura del a-Si:H llega arriba de  $120^\circ\text{C}$  y por difusión de calor, la temperatura en la zona alrededor del spot es mayor a la temperatura ambiente, y la temperatura en el agua en esta zona, llega al punto de ebullición ( $\sim 100^\circ\text{C}$ ), por lo que se pueden



formar burbujas de vapor. La temperatura del agua varía linealmente con la potencia láser,  $T(P)$ , como se muestra en la gráfica de la FIG. 2.15, donde se tomaron diferentes puntos de  $z$  con  $r = 0$ , por lo que se obtuvieron diferentes relaciones para  $T(P) = T_0 + \text{constante} * P$ , donde  $T_0$  es una temperatura inicial y la constante está dada en  $^{\circ}\text{C}/\text{mW}$ , las cuales están expresadas en la TABLA 2.2. Hay que recordar que  $z = -100 \mu\text{m}$  es la interfaz a-Si:H y agua, así que se simuló justo arriba de la superficie del a-Si:H ( $z = -99.99 \mu\text{m}$ ).



**FIG. 2.14.** Temperatura obtenida a partir de la ecuación (2.1). Con una potencia de (a)  $P = 1 \text{ mW}$  y (b)  $P = 12 \text{ mW}$ .



**FIG. 2.15.** Temperatura en función a la potencia láser. Se observa que hay una dependencia lineal que varía según la posición  $z(\mu\text{m})$ .

**TABLA 2.2.** Expresión para la temperatura en relación a la potencia láser.

$z (\mu\text{m})$	Expresión para $T(^{\circ}\text{C})$
-100	$20.62 + 9.38 * P$
-99	$20.39 + 7.15 * P$
-98	$20.25 + 5.79 * P$
-96	$20.09 + 4.13 * P$
-94	$20.02 + 3.15 * P$
-92	$19.99 + 2.42 * P$
-90	$19.98 + 1.98 * P$

### 2.3.3 Ecuaciones de Navier-Stokes

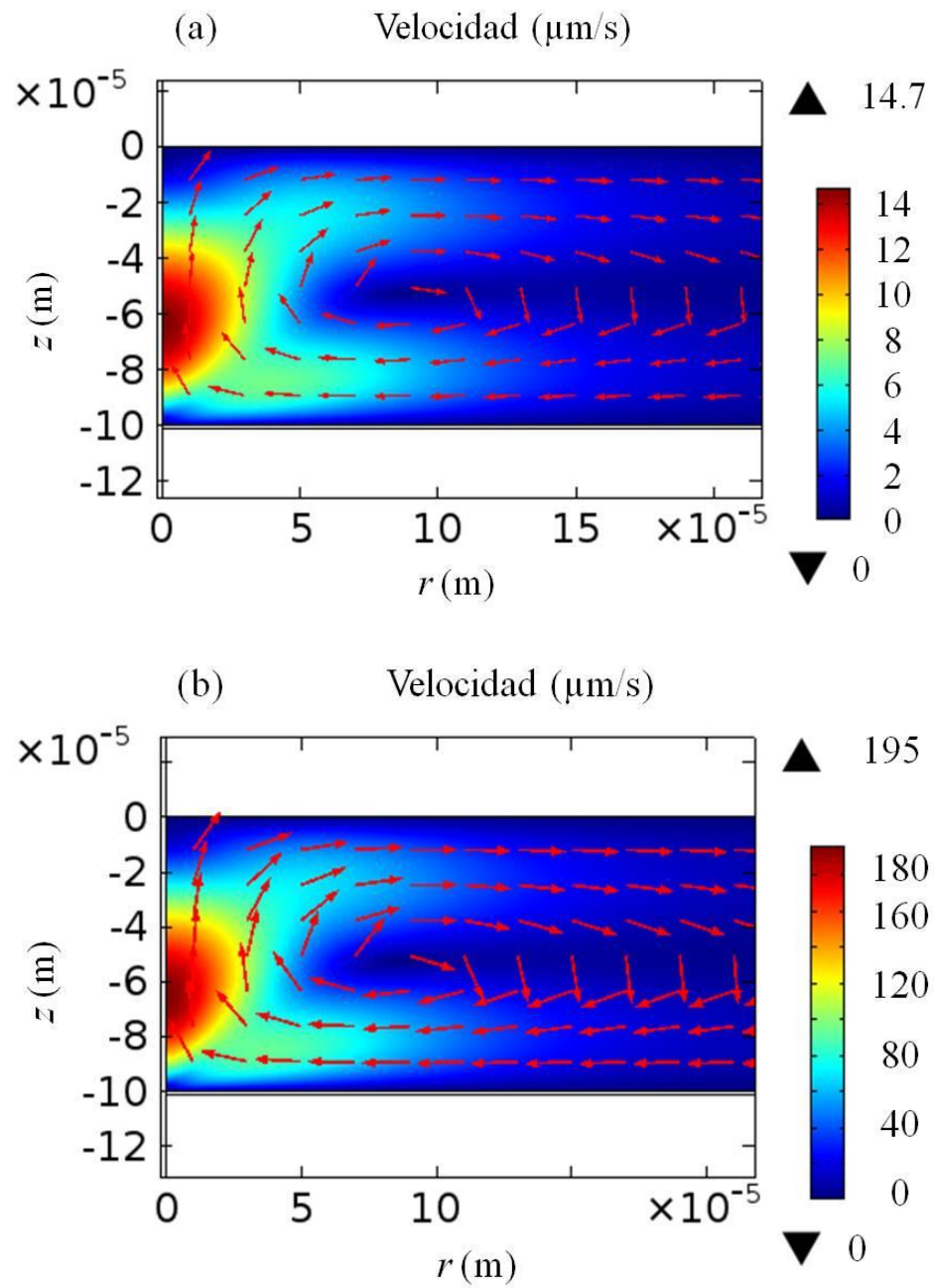
Los gradientes de temperatura en la ecuación (2.1), generan el movimiento del fluido a una velocidad  $\mathbf{v}$ , y como los parámetros del agua dependen de la temperatura se espera que aparezca una fuerza de flotabilidad y por consiguiente, corrientes de convección. Se utilizaron las ecuaciones de Navier-Stokes dentro del módulo "Laminar Flow in Single-Phase Flow", en el dominio del agua, para un fluido incompresible

$$\rho(\mathbf{v} \cdot \nabla)\mathbf{v} = \nabla \cdot [-p_r \mathbf{I} + \mu(\nabla\mathbf{v} + (\nabla\mathbf{v})^T)] + \mathbf{F}_v \quad (2.3a)$$

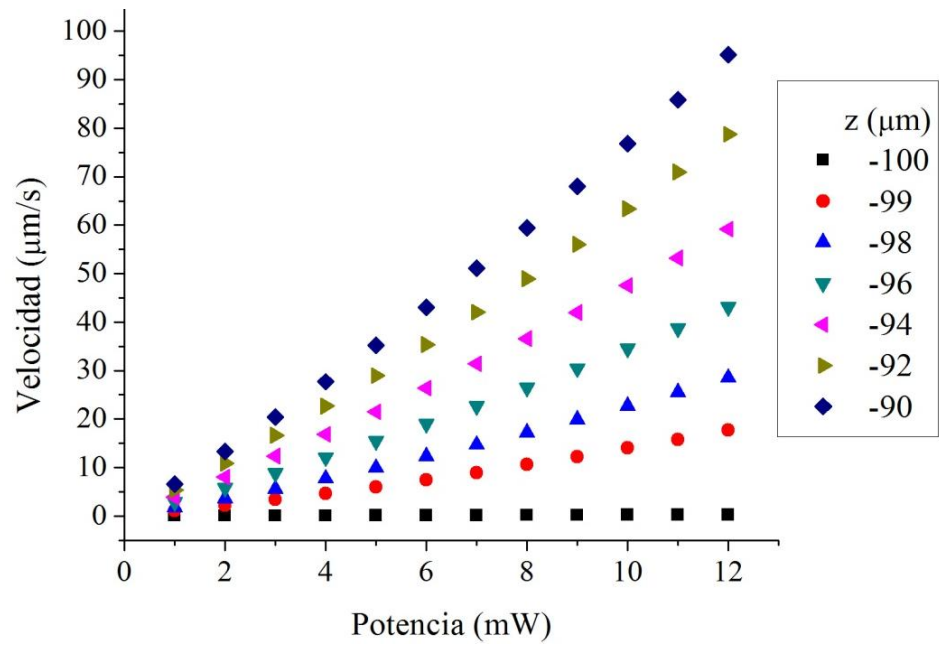
$$\rho \nabla \cdot \mathbf{v} = 0 \quad (2.3b)$$

donde  $p_r$  es la presión y  $F_v = -g(\rho - \rho_0)$  es la fuerza volumétrica (fuerza boyante generada por el agua hacia la superficie, responsable de las corrientes de convección). Aquí  $\rho$  es en función de la temperatura  $T$ , y  $\rho_0$  es un valor de densidad fijo (a temperatura ambiente  $998.3 \text{ kg m}^{-3}$ ).

Resolviendo estas ecuaciones se encontró el perfil de velocidad (escala de color) y el movimiento del fluido que forma un ciclo (marcado en flechas rojas en la FIG. 2.16(a-b)): el líquido se desplaza hacia arriba por encima del punto más caliente, alcanzando una velocidad máxima de  $14.7 \mu\text{m/s}$  para  $P = 1 \text{ mW}$  y de  $190 \mu\text{m/s}$  para  $P = 12 \text{ mW}$ , luego se mueve a lo largo de la superficie superior, después hacia abajo en los bordes y finalmente hacia el centro a lo largo de la superficie interior. Las corrientes de convección son generadas simétricamente alrededor del punto focal. Las simulaciones indican que la velocidad también varía linealmente con la potencia láser, como se muestra en la gráfica de la FIG. 2.17, para diferentes puntos de  $z$  y  $r = 0$ . La TABLA 2.3 indica las expresiones encontradas para  $v(P) = v_0 + \text{constante} * P$ , donde la constante está dada en  $\mu\text{m/s} \cdot \text{mW}$  y en este caso la velocidad inicial  $v_0 = 0$ , como era de esperarse.



**FIG. 2.16.** Perfil de velocidad del flujo dentro de la celda de agua. Las flechas rojas indican el movimiento del fluido. (a)  $P = 1$  mW y (b)  $P = 12$  mW.

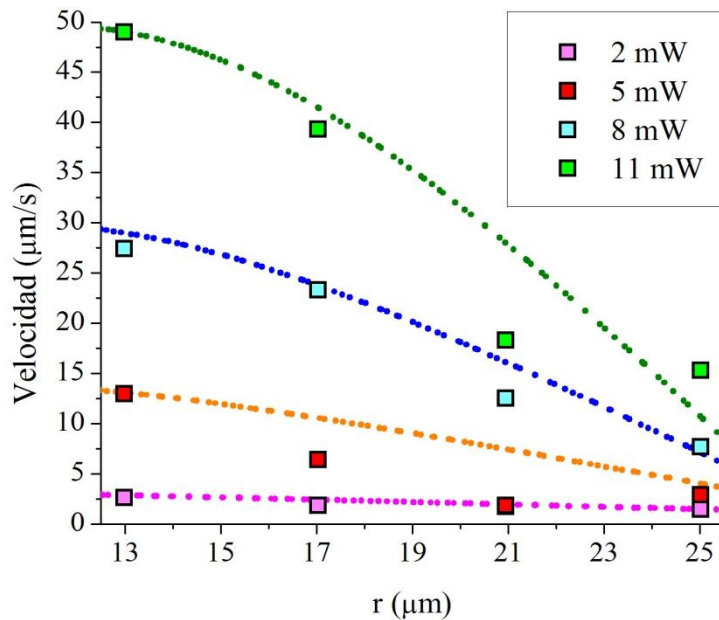


**FIG. 2.17.** Velocidad en función a la potencia láser en diferentes puntos de  $z$ .

**TABLA 2.3.** Expresión para la velocidad en relación a la potencia láser.

$z$ ( $\mu\text{m}$ )	Expresión para $v$ ( $^{\circ}\text{C}$ )
-100	$0.02 * P$
-99	$1.52 * P$
-98	$2.43 * P$
-96	$3.66 * P$
-94	$5.02 * P$
-92	$6.67 * P$
-90	$8.06 * P$

También se obtuvieron las velocidades del fluido para las mismas potencias que el análisis de una sola partícula ( $P = 2, 5, 8$  y  $11$  mW). Se consideró que la micropartícula tiene un diámetro de  $2.5 \mu\text{m}$  y el objetivo de microscopio  $40\times$  tiene una profundidad de campo de  $1 \mu\text{m}$ , por lo que se tomó la velocidad del fluido con  $z$  en un rango de  $3-4 \mu\text{m}$  y se hizo un barrido en  $r$  de  $13$  a  $25 \mu\text{m}$ , para tener las mismas distancias al spot que en los resultados experimentales (sección 2.2.1) y comparar los resultados. La FIG. 2.18 muestra la velocidad promedio en función del eje  $r$ , para las diferentes potencias. Las velocidades obtenidas coinciden con las experimentales, marcadas con cuadros. Se observa que entre más cerca de la fuente de calor, la velocidad es mayor, por lo que las micropartículas son atraídas con mayor fuerza a esa zona.

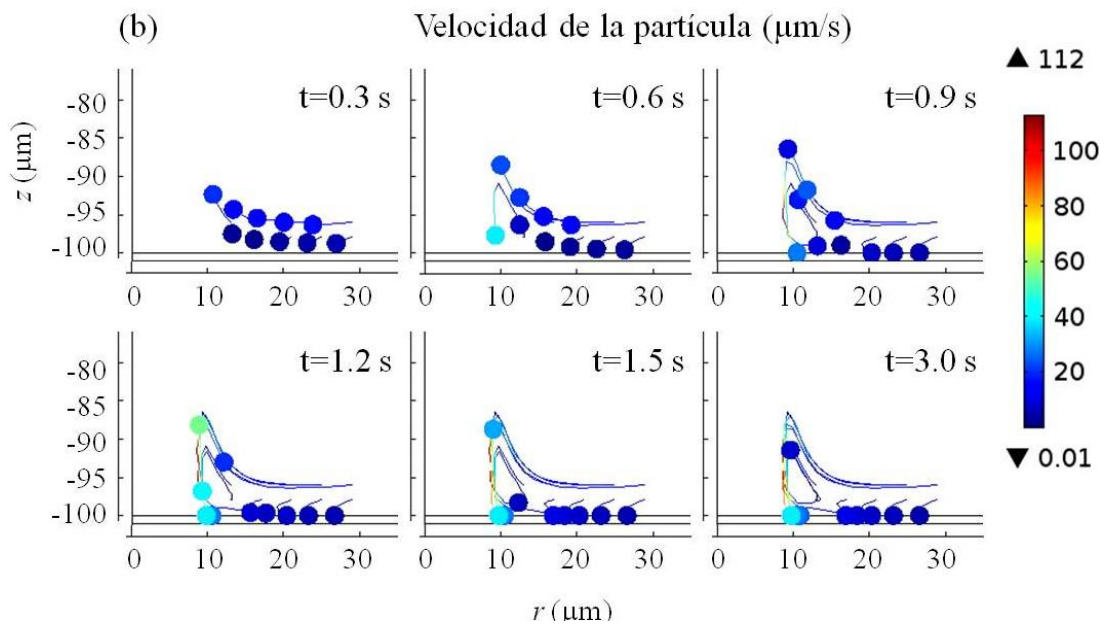
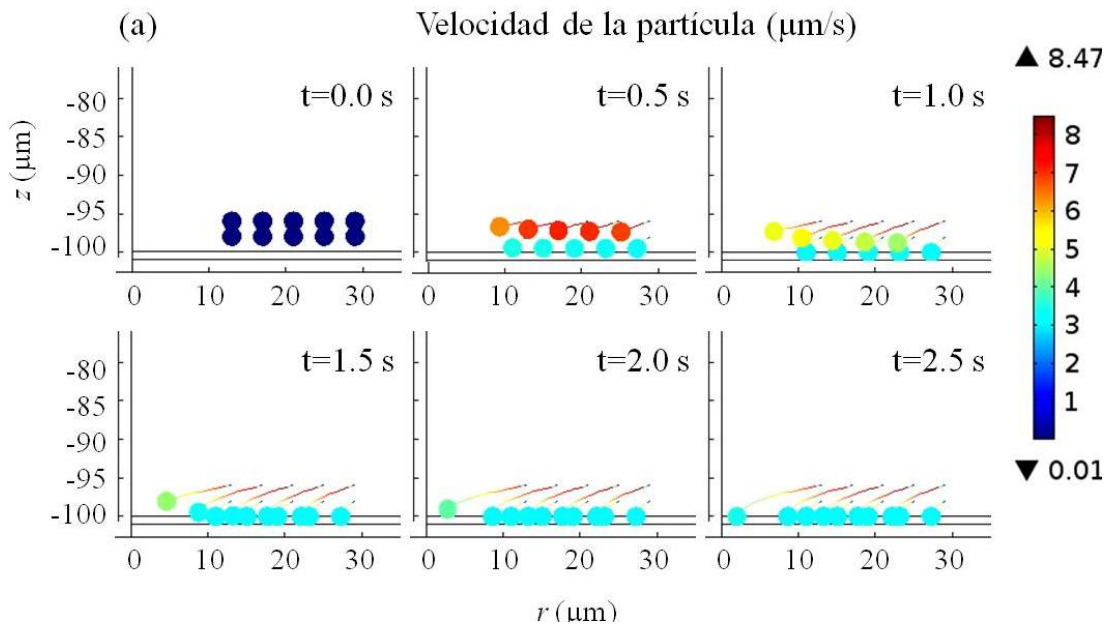


**FIG. 2.18.** Velocidad en función a la distancia al spot para diferentes potencias. Los puntos muestran los resultados obtenidos de las simulaciones y los cuadros ( $\square$ ) los resultados experimentales.

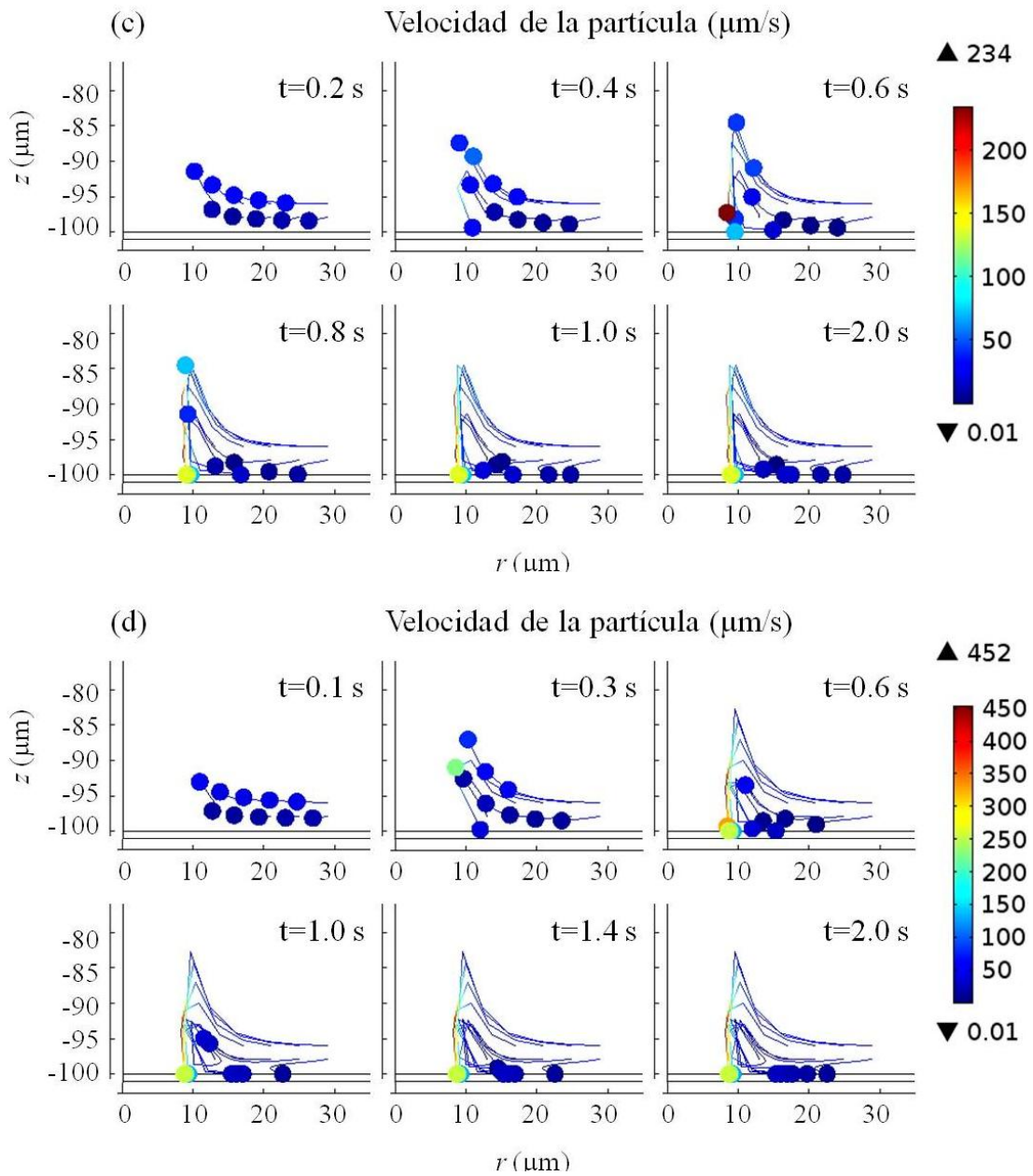
### 2.3.4 Seguimiento de la trayectoria de partículas

COMSOL Multiphysics cuenta con la opción para implementar el seguimiento de partículas donde se pueden activar y desactivar fuerzas. La fuerza termoforética que trae consigo COMSOL es para un gas y tiene la opción de escalar la fuerza mediante una constante. Si bien el modelo para gases no es válido para líquidos, se había visto anteriormente que la velocidad termoforética predicha por este modelo es muy cercana a la velocidad medida. Modificar la constante permite escalar la fuerza termoforética hasta hacerla comparable a la medida experimentalmente.

La FIG. 2.19(a) muestra el comportamiento de la partícula para  $P = 2$  mW, donde se desactivó la fuerza termoforética para observar cómo las partículas son atraídas a la zona del spot. Téngase en cuenta que las simulaciones tienen la opción de que las partículas quedan congeladas al tocar una de las paredes de la celda, por lo que ya no se mueven. Se puede cambiar esta opción pero el tiempo de simulación incrementa considerablemente (pasa de minutos a varias horas) y el comportamiento de las partículas es muy similar, solo se mueven unas cuantas micras más hacia la dirección en la que iban, así que para simplificar el tiempo de las corridas se dejó esa opción. En la FIG. 2.19 (b-d), para  $P = 5, 8$  y  $11$  mW, respectivamente, se activó la fuerza termoforética y se observa cómo las partículas son expulsadas de la zona caliente pero quedan alejadas a  $\sim 5$   $\mu\text{m}$  del borde del spot. Todas se encuentran en la misma posición en  $t=0$ , en  $r = 13, 17, 21, 25$  y  $29$   $\mu\text{m}$ , en  $z = -98$  y  $-96$   $\mu\text{m}$ . Los resultados proporcionaron una velocidad dentro del rango de las obtenidas experimentalmente, antes de llegar a  $r = 10$   $\mu\text{m}$ , de ahí en adelante las partículas adquiere velocidades muy grandes. En comparación a las velocidades calculadas experimentalmente en el seguimiento de una partícula, que eran del orden de  $0$  a  $50$   $\mu\text{m/s}$ , en las simulaciones llegan a adquirir arriba de  $100$  e incluso  $450$   $\mu\text{m/s}$ . Cabe recordar que se modificó la constante de la fuerza termoforética para hacer que las partículas se comportaran como lo hicieron experimentalmente, por lo que además las partículas son rebotadas a una distancia que es el doble del valor del radio de la cintura del haz ( $10$   $\mu\text{m}$ ), cuando en los experimentos fueron rebotadas a  $5$   $\mu\text{m}$ .







**FIG. 2.19.** Trayectoria de partículas (marcado con una línea). (a)  $P = 2 \text{ mW}$ , las partículas son atrapadas en el centro del spot. Para el caso de (b)  $P = 5 \text{ mW}$ , (c)  $P = 8 \text{ mW}$  y (d)  $P = 11 \text{ mW}$ , las partículas son expulsadas de la zona caliente pero las fuerzas de Stokes las atrae de nuevo y comienza un ciclo. En las simulaciones, cuando la partícula toca una de las paredes, en este caso el sustrato del a-Si:H, queda congelada y deja de moverse.

## 2.4 Discusión y conclusiones

Experimentalmente, usando potencias debajo de 3 mW, las micropartículas se acumulan en el centro del spot y permanecen en foco (quizás por la fuerza de gravedad y la presión de radiación). De 3 a 11 mW, las micropartículas dentro del perfil de temperatura están sujetas a fuerzas termoforéticas, por lo que son expulsadas de la región caliente pero a su vez son recolectadas por corrientes de convección donde actúa la fuerza de Stokes, quedando atrapadas alrededor del spot, formando un anillo y haciendo pequeños movimientos cíclicos (entran y salen de foco). Para comprobar que estos movimientos eran originados por el gradiente de temperatura debido a la absorción de la película de a-Si:H, se realizaron experimentos usando una celda de vidrio (sin material absorbente) usando el objetivo de microscopio 60x y sólo se logró atrapar por la fuerza gradiente, es decir, el mecanismo que actuó fue el de OT, por lo que al introducir la película absorbente aparecían los fenómenos de corrientes de convección y fotoforesis.

Las simulaciones numéricas confirman que los gradientes de temperatura son los responsables del mecanismo de atrapamiento. Los resultados numéricos en la parte de ecuación de transferencia de calor y ecuaciones de Navier-Stokes coinciden con lo experimental. Además, indican que hay una suma de fuerzas aplicadas sobre la partícula, entre ellas fuerza de esparcimiento que permite que la partícula permanezca cerca de la superficie, pues al desactivar esta fuerza, las partículas se movían conforme al flujo, por corrientes de convección. De igual manera, se modificó la constante dada por la fuerza termoforética, ya que al dejarla tal cual la da COMSOL, las partículas salían expulsadas de la zona del spot a velocidades de milímetros por segundos. Cabe mencionar que no hay una solución analítica de la fuerza de esparcimiento para partículas con un diámetro mayor al de la longitud de onda empleada por lo que se implementó la descrita para partículas con un diámetro menor, dado que al no simular la presión de radiación las partículas eran expulsadas hacia afuera del spot. Se necesita trabajar más en esta parte, que como ya se mencionó, no hay muchos estudios que tomen en cuenta tanto pinzas ópticas,

termofóresis y corrientes de convección en conjunto, por lo que aún queda mucho trabajo por hacer tanto experimental como numéricamente.

Con esto, se ha demostrado que la captura y manipulación en dos dimensiones se puede lograr mediante corrientes de convección utilizando un láser de baja potencia. La película de a-Si:H absorbe la luz láser y calienta las moléculas del agua aumentando su energía cinética, por lo que se produce un gradiente de temperatura. Las micropartículas en el agua se pueden arrastrar desde regiones muy lejanas del haz láser y quedan atrapadas dentro o alrededor de él (dependiendo de la potencia aplicada). Se encontró experimentalmente y numéricamente que la micropartícula se mueve a mayor velocidad si se encuentra más cerca de la zona del spot. Al aumentar la potencia láser, el tiempo de captura es menor (como ya se mencionó, las moléculas del líquido en la zona caliente son más energéticas y causan ese movimiento en partículas cercanas).

Finalmente, queda destacar que con esta técnica se puede iluminar un material absorbente con la superficie con cierta estructura (anillos, cuadros, líneas, etc.) o con ayuda del SML se pueden generar otro tipo de patrones dinámicos para llevar a cabo la captura, manipulación, transporte y separación de micropartículas en tiempo real.

### Capítulo 3.

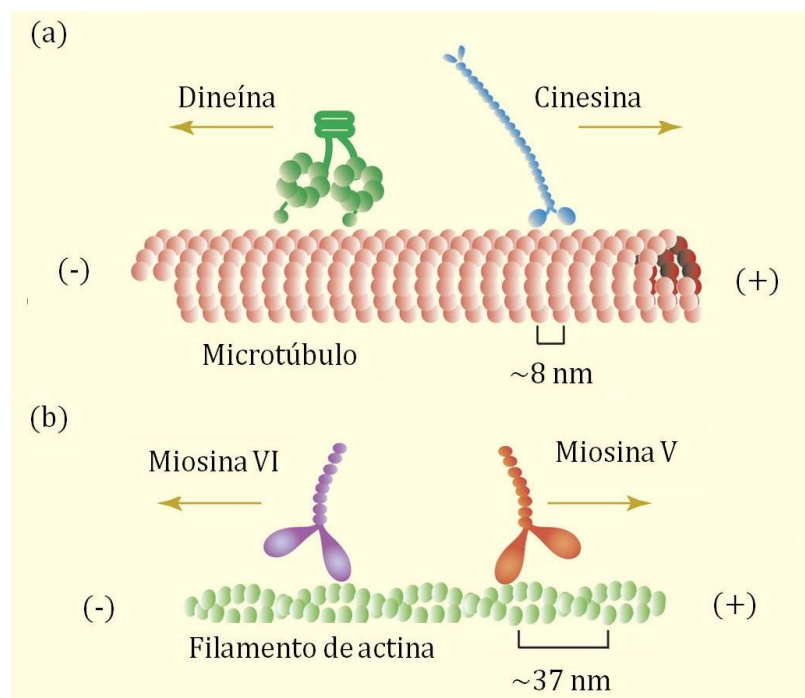
## OT EN MOTORES MOLECULARES: ESTUDIO *IN VITRO* DE LA PROTEÍNA K560

Las OT son adecuadas para el estudio de la mecánica y dinámica a nivel celular porque pueden medir fuerzas del orden de piconewtons que pueden ser muy significativas en macromoléculas, orgánulos e incluso células enteras. Por ejemplo, se puede detener el transporte de una vesícula intracelular, remolcar una bacteria a través del agua más rápido de lo que esta puede nadar, estirar, doblar o distorsionar ADN, ARN o componentes del citoesqueleto, tales como microtúbulos y filamentos de actina [75]. Se han realizado experimentos *in vitro* para conocer el movimiento y transporte intracelular, donde se usan concentraciones diluidas de proteínas motoras purificadas para trabajar con motores individuales y medir su fuerza, los pasos que da y la velocidad a la que camina. Para facilitar la captura, la proteína motora se une a una nano/microesfera (comúnmente de poliestireno o de sílice), que es manipulada por OT [24] [75]. La función motora es especialmente importante en las neuronas pues muchos trastornos neuronales están relacionados con el mal funcionamiento del transporte intracelular [76].

Este capítulo muestra el trabajo realizado en el laboratorio del Departamento Biología Celular y del Desarrollo de la Universidad de California, Irvine (UCI), bajo la dirección del doctor Steven Gross, donde se estudian los motores moleculares y el transporte intracelular. En este caso, se inició un proyecto para estudiar los efectos de la proteína asociada a los microtúbulos (MAP, por sus siglas en inglés), llamada tau. Para determinar cómo afecta la distancia a la que se encuentra la proteína del microtúbulo, se empezaron los experimentos con la proteína K560 y así, tener un control y comparar con microtúbulos con diferentes concentraciones de proteína tau.

### 3.1 Antecedentes

Una célula se compone de diferentes compartimientos: núcleo, el complejo de Golgi, el retículo endoplasmático, entre otros. Cada uno actúa como una fábrica que genera productos únicos, conocidos como "carga" (entre ellos los gránulos de pigmento, vesículas, mitocondrias y endosomas), los cuales se distribuyen dentro de la célula por medio del transporte intracelular. El transporte se produce cuando los motores moleculares, que están agrupados en tres familias de proteínas motoras: cinesinas, dineínas y miosinas, se unen a un cargo a través de su cola y, al mismo tiempo, se unen al sustrato del citoesqueleto (microtúbulos y filamentos de actina), a través de una de sus cabezas (FIG. 3.1) [77].



**FIG. 3.1.** Motores moleculares. (a) Las cinesinas y dineínas se unen a los microtúbulos y (b) las miosinas a los filamentos de actina. Imagen tomada de [76].

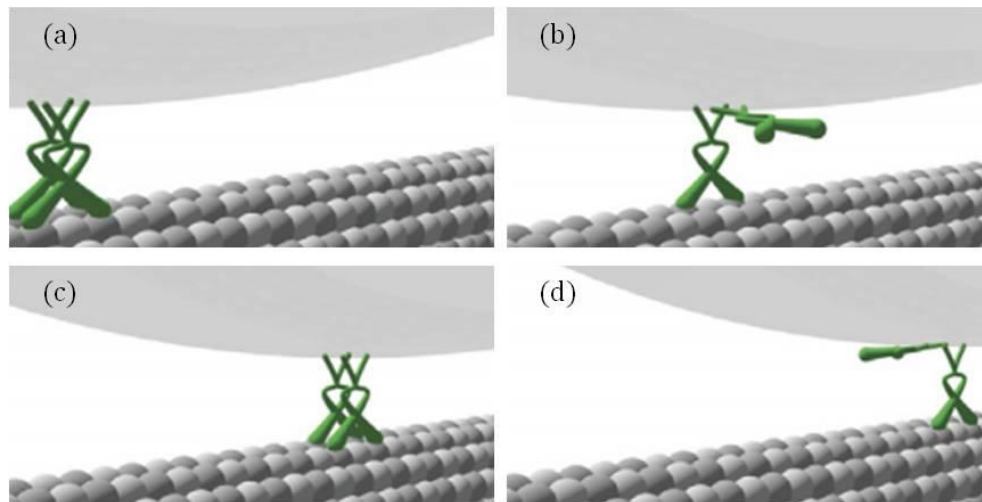
Los microtúbulos al ser polares, se organizan dentro de la célula con sus extremos negativos (-) cerca del núcleo mientras que los extremos positivos (+) se

extienden hacia fuera desde el centro. Las proteínas motoras son capaces de reconocer esta polaridad, por lo que cada una tiene una determinada dirección de transporte. Las cinesinas se mueven hacia el extremo (+) de los microtúbulos mientras que las dineínas se mueven al extremo (-). Los filamentos de actina están orientados al azar, son significativamente más cortos que los microtúbulos y sirven de transporte local en las regiones donde hay pocos microtúbulos. Al igual que los microtúbulos, los extremos (+) apuntan hacia el exterior de la célula. Las miosinas se mueven en ambas direcciones del filamento de actina, la miosina V hacia el extremo (+) y la miosina VI hacia el extremo (-). Los motores moleculares se desplazan a lo largo de los microtúbulos y filamentos de actina usando hidrólisis de ATP (adenosín trifosfato), es decir, la molécula ATP produce ADP (adenosín difosfato) + Pi (fosfato inorgánico), que transforma la energía química en trabajo mecánico, provocando el movimiento de la proteína motora en forma de pasos [76].

La mayoría de los motores moleculares son dímeros con dos cabezas conectadas entre sí en un tallo y un dominio cola. Las cinesinas y miosinas se unen directamente al sustrato del citoesqueleto con sus cabezas, por lo que son capaces de dar muchos pasos consecutivos. Los estudios *in vitro* con motores individuales, han demostrado que una sola molécula es suficiente para mover el cargo cierta distancia [77]. Por ejemplo, la cinesina puede caminar entre 800 y 1200 nm, dando pasos de 8 nm, y la miosina V entre 700 y 2100 nm, dando pasos de 37 nm, como se muestra en la FIG. 3.1(a-b). Así la cinesina puede dar uno 100 pasos antes de desprenderse del microtúbulo mientras que la miosina V de 20 a 60 pasos en el filamento de actina. Con una concentración de ~1 mM de ATP, ambas se mueven a una velocidad de 600 nm/s. La fuerza máxima que puede ejercer una cinesina (unido a un cargo) es de ~5 pN, y la miosina V de ~3 pN, y su valor es casi independiente de la concentración de ATP [76] [77]. En cambio, la dineína da pasos de ~15 nm, puede caminar hasta 1000 nm y ejerce una fuerza de 1.1 pN.

También se han realizado estudios *in vitro* que muestran que entre varios motores pueden mover un cargo distancias más largas: para más de 8  $\mu\text{m}$  dos motores

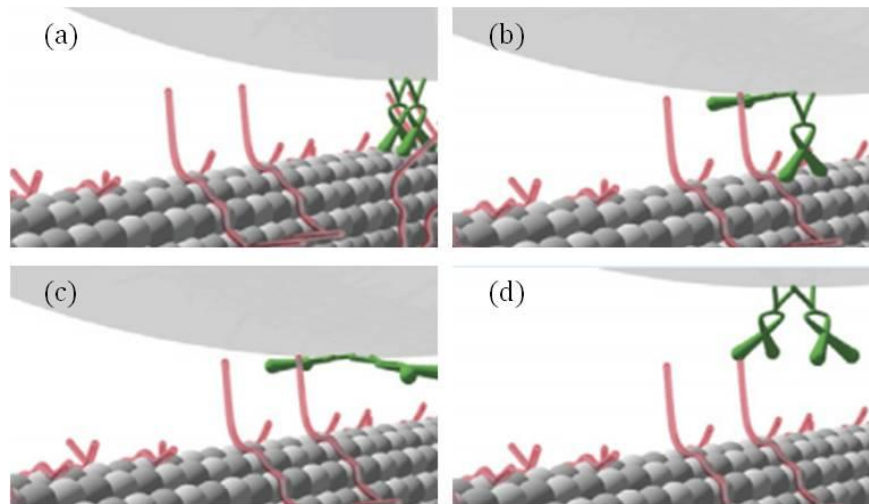
son suficientes y para más de 13  $\mu\text{m}$ , tres motores. Cuando uno de los motores se desprende del microtúbulo o filamento de actina, hay otro disponible para seguir caminando (FIG. 3.2), por lo tanto la relación del aumento de la distancia que camina con el número de motores no es lineal. Por otro lado, la fuerza se ve incrementada: una cinesina  $\sim 5$  pN, dos cinesinas generan una fuerza de de  $\sim 10$  pN, una dineína 1.1 pN y tres dineínas de  $\sim 3.3$  pN [76].



**FIG. 3.2.** Dos motores moleculares moviendo un cargo sobre el microtúbulo. (a) Los motores se encuentran unidos al microtúbulo. (b) Uno de los motores se desprende del microtúbulo y el otro sigue unido al él. (c) El primer motor se vuelve a unir al microtúbulo y los dos continúan caminando. (d) Ahora el segundo motor se desprende pero se volverá a unir y el ciclo se repite, por lo que mueven el cargo largas distancias. Imagen tomada de [76].

El transporte intracelular es crucial para el funcionamiento de una célula, sin embargo, muchos aspectos fundamentales son poco conocidos. Varias enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer, están relacionados con anomalías en el transporte intracelular en microtúbulos. La proteína tau está asociada a la estabilización y organización de los microtúbulos y existen seis isoformas en neuronas humanas, las cuales presentan diferente efecto en el transporte a base de cinesinas. Se ha demostrado *in vitro* que la proteína tau regula el número de motores

de cinesinas sobre el microtúbulo, por lo tanto, las alteraciones en los niveles de tau pueden perjudicar el transporte y dar lugar a la neurodegeneración [78]. La fuerza de cinesinas individuales no es afectada por la presencia de tau, por lo que la proteína tau no presenta grandes efectos una vez que la cinesina se une al microtúbulo. Sin embargo, el efecto de tau en motores trabajando en conjunto es más pronunciado, provocando cambios importantes en el movimiento del cargo [76] (FIG. 3.3).



**FIG. 3.3.** Motores moviendo un cargo sobre un microtúbulo con tau (filamentos rosas). (a) Los dos motores unidos al microtúbulo. (b) Uno de los motores se separa del microtúbulo y es poco probable que se vuelva a unir al microtúbulo. (c) El segundo motor también se separa del microtúbulo. (d) No hay motores moleculares moviendo el cargo por lo tanto se difunde en la distancia. Imagen tomada de [76].

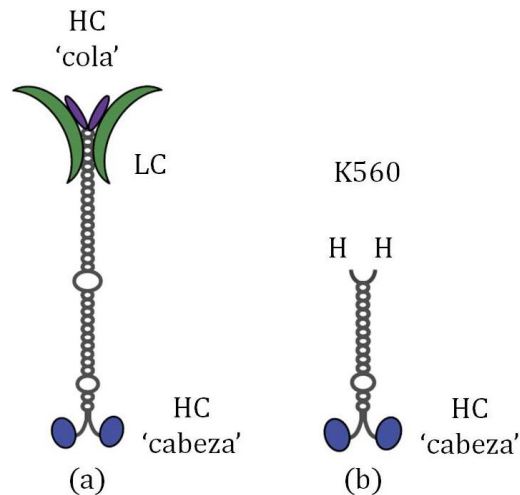
Como ya se comentó, para comprender cómo afecta la proteína tau en el transporte del motor, se determinó el tiempo que le toma a la cinesina con el cargo unirse al microtúbulo, dependiendo de la distancia a la que se encuentre de él. Para después repetir el procedimiento con diferentes tamaños de cinesinas (actualmente se está trabajando en ello), y finalmente hacer el estudio agregando la proteína tau en los microtúbulos a diferentes concentraciones. Se espera que entre más alejado se esté del microtúbulo, el tiempo sea mayor.



## 3.2 Materiales y métodos

### 3.2.1 Proteína K560

Se utilizó la proteína recombinante K560 (~60 nm de largo), que a diferencia de una cinesina I convencional (~80 nm de largo [79]), carece de la cola y de la cadena ligera [80], como se muestra en la FIG. 3.4. Para obtener la proteína K560 se hizo la purificación de la cinesina convencional donde se usó la bacteria *E. coli* y el etiquetado 6xHis como se describe en [81], a través de un procedimiento estándar. Se diluyó 50 veces en una solución buffer para obtener 25 muestras de 10  $\mu$ L cada una, y se enfriaron con nitrógeno líquido para mantenerlas almacenada a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

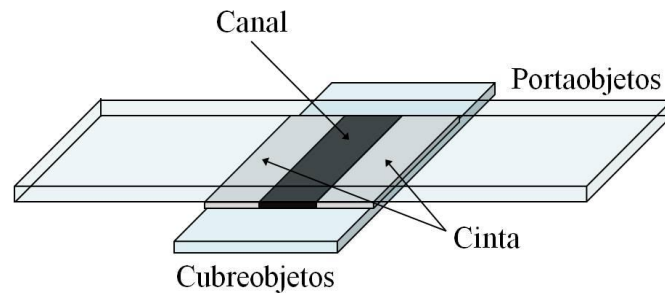


**FIG. 3.4.** Esquema de la cinesina. (a) Cinesina I convencional: Presenta dos cadenas pesadas (HC), cabeza y cola, y dos cadenas ligeras (LC). (b) Proteína K560: Presenta una HC cabeza. Cada 'H' denota el etiquetado 6xHis situado en el extremo C-terminal para obtener la proteína motora truncada. Imagen tomada de [80].

### 3.2.2 Celda de flujo

La celda de flujo es mostrada en la FIG. 3.5. Se colocaron dos piezas de cinta adhesiva en el centro de un portaobjetos para formar un canal de aproximadamente 3 – 4 mm. Un cubreobjetos previamente limpio (Apéndice B.1) y recubierto con

poli-L lisina (Apéndice B.2) es colocado sobre la parte de la cinta, perpendicular al portaobjetos. Las soluciones fueron depositadas de un lado del canal, y con un filtro de papel fueron succionadas para que fueran arrastradas hacia el otro lado.



**FIG. 3.5.** Diagrama de la celda de flujo. El canal de 3 – 4 mm es construido con un portaobjetos, dos pedazos de cinta y un cubreobjetos.

### 3.2.2.1 Colocación de los microtúbulos en la celda

Se incubaron tubulinas con taxol por 20 minutos a 37°C para obtener los microtúbulos. Con una pipeta se introdujeron 30  $\mu$ L de una solución con microtúbulos (MT/DBMT, Apéndice B.4), de ~25 nm de diámetro, a cada una de las celdas de flujo que se iban a utilizar en el día, de manera que los microtúbulos se distribuyeran paralelamente a lo largo de los cubreobjetos, con ayuda del filtro de papel. Se dejaron incubar las celdas por 20 minutos a temperatura ambiente, en una caja con un ambiente de alta humedad para permitir a los microtúbulos adherirse a los cubreobjetos con poli-L lisina. Después, se enjuagaron cada uno de los canales de flujo con 30  $\mu$ L de un buffer de caseína (CFB, Apéndice B.4) para bloquear la superficie de los cubreobjetos. Se dejaron incubar por al menos 20 minutos, antes de introducir la solución con proteínas motoras e iniciar los experimentos.

### 3.2.2.2 Solución de la proteína K560

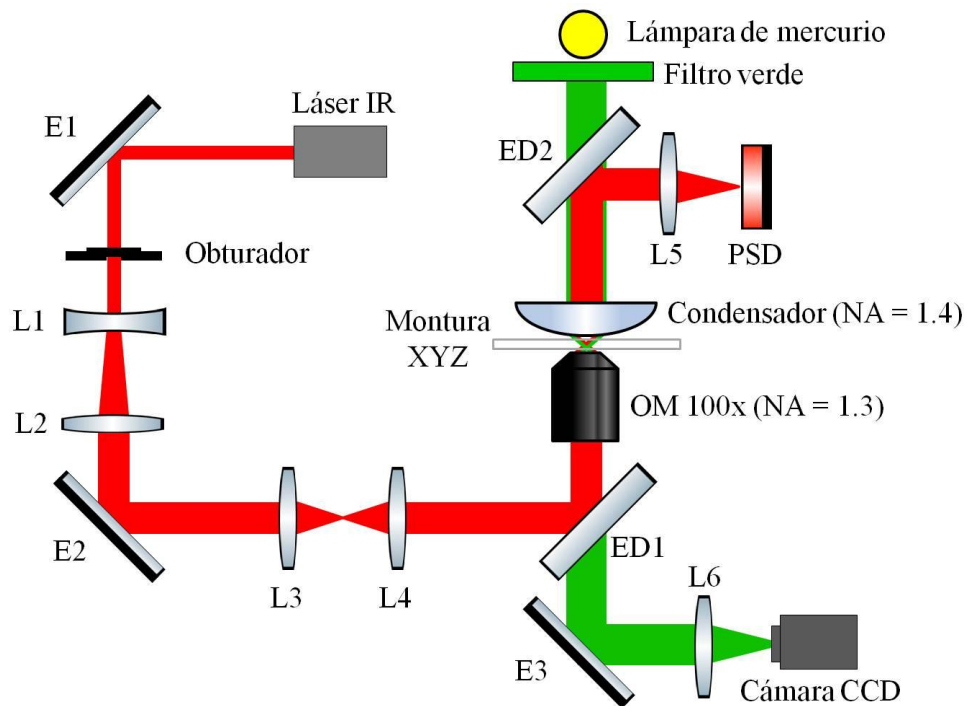
Se usaron partículas de poliestireno carboxilado de 500 nm de diámetro (Polysciences, Inc) recubiertas de anticuerpos penta-His (Apéndice B.5) de ~2 nm,

para tener un mejor control de proteínas motoras individuales [81]. Se bloqueó la superficie de la nanopartícula para evitar adsorción motora no específica o la interacción entre las nanopartículas. Se descongeló una de las muestras de 10  $\mu\text{L}$  con la proteína K560 e inmediatamente se mezcló con 30  $\mu\text{L}$  de buffer de ensayo, 1  $\mu\text{L}$  de ATP y 1  $\mu\text{L}$  de solución con nanopartículas (diluido 10 veces) y se dejó incubar a temperatura ambiente por 15 minutos (Apéndice B.6). Finalmente se inyectaron 30  $\mu\text{L}$  de esta última solución en la celda y se sellaron las orillas del canal con grasa de silicona de alto vacío. Cada vez que se iba a trabajar con una celda se tenía que usar una nueva muestra de proteína K560. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente.

### 3.2.3 Arreglo experimental

Se construyó un sistema de OT en un microscopio invertido (TE200, Nikon), como se muestra en la FIG. 3.6. El daño óptico en células ha sido investigado y se ha encontrado que un láser de 980 nm es el que ocasiona menos daño, siguiéndole uno de 830 nm y después uno de 1064 nm [82], por lo que se utilizó un láser infrarrojo de 980 nm (EM4) con perfil gaussiano ( $\text{TEM}_{00}$ ), acoplado a una fibra óptica y conectado a un colimador (PAF-X-7-B, Thorlabs). El haz colimado se expandió cinco veces con una lente cóncava ( $L1$ ,  $f = 35$  mm) y una lente convexa ( $L2$ ,  $f = 180$  mm), y se dirigió al microscopio con dos lentes convexas ( $L3$  y  $L4$ , ambas de  $f = 50$  mm). Un espejo dicróico a  $45^\circ$  (ED1) condujo el haz hacia un objetivo de microscopio de inmersión en aceite (OM) 100x con NA de 1.3. La celda de flujo fue colocada en una montura XYZ con sensor piezoeléctrico (P-517.3CL, Physik Instrumente), que se instaló en el microscopio. Se aplicó interferometría del plano focal posterior para medir la posición de la nanopartícula con precisión y medir directamente la fuerza ejercida por las OT a través del cambio de momento de la luz, como se describe en la referencia [24]. La interferencia de la luz láser y la luz esparcida por la nanopartícula, sobre el plano focal posterior del condensador, fue detectado por un dispositivo sensible a la posición (PSD) (DL100-7-PCBA3, Pacific

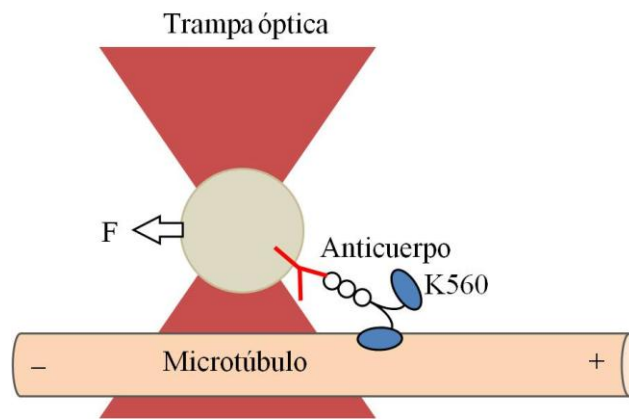
Silicon Sensor), que se colocó sobre el plano de la imagen conjugada. Otro espejo dicroico (ED2) dirigió el haz que salía del condensador hacia una lente (L5) para enfocar el haz en el centro del PDS. La muestra se iluminó con luz verde (lámpara de mercurio y filtro verde) y se monitoreó en tiempo real con una cámara CCD (30 fps, Dage-MTI-100). Un espejo (E3) y una lente (L6) fueron usados para enviar la información de la celda a la cámara. Se usó un dispositivo de adquisición de datos (PCI-6229, National Instruments) para detectar la señal, desde el PDS a la computadora, y fue analizado por un programa personalizado de LabVIEW. También se usó un obturador para dejar pasar el láser a la celda, cuando se quería atrapar la nanopartícula, y para bloquear el haz, cuando no se necesitaba. Otros dos espejos (E1 y E2) ayudaron a reducir el área de trabajo en la mesa óptica.



**FIG. 3.6.** Esquema del arreglo de OT utilizando un microscopio invertido. El láser infrarrojo fue expandido de modo que llenó la abertura posterior del objetivo del microscopio, con el fin de utilizar toda la lente y generar un mayor gradiente en el haz enfocado. E: espejo, L: lente, ED: espejo dicroico, OM: objetivo de microscopio, y PSD: dispositivo sensible a la posición.

### 3.2.4 Motilidad activa *in vitro* de la proteína K560

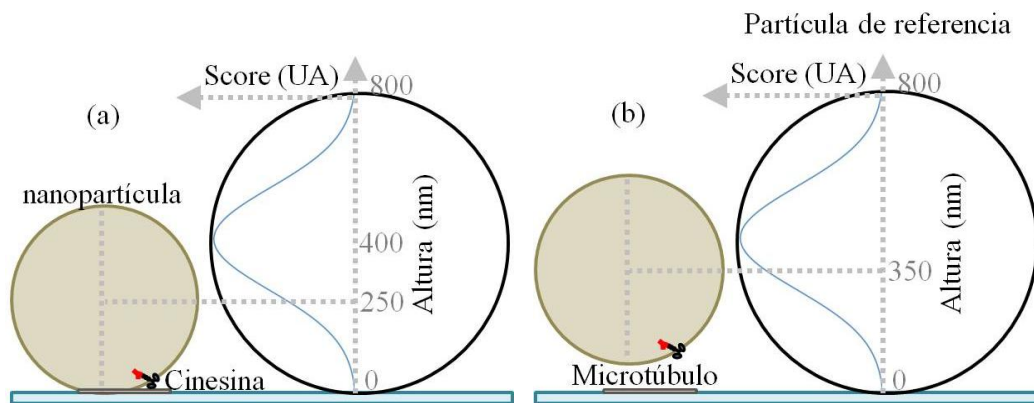
Se trabajó en el análisis de cinesinas individuales, por lo que se tuvo que encontrar la concentración de la muestra de 10  $\mu\text{L}$  de la proteína K560 para tener una sola unida a la nanopartícula. Se usó el haz láser del arreglo de OT para posicionar la nanopartícula cerca de microtúbulos durante  $\sim 30$  segundos y ver si había alguna cinesina activa presente que comenzara a desplazarse por el microtúbulo, lo que generaría una fuerza en la trampa, como se muestra en la FIG. 3.7.



**FIG. 3.7.** Proteína K560 unida a la nanopartícula, a través del anticuerpo Y. La nanopartícula es sostenida por la trampa óptica pero cuando la proteína K560 hace contacto con el microtúbulo comienza a desplazarse una distancia  $x$ , generando así una fuerza. Para fines ilustrativos las escalas no corresponden a las reales.

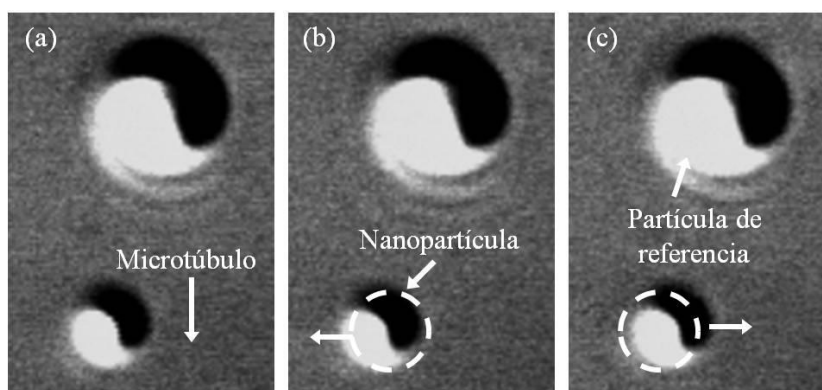
Se realizaron diferentes pruebas diluyendo la solución de proteínas K560 para producir una fracción de unión al microtúbulo (el cual se encontraba fijo en la superficie del cubreobjetos)  $< 30\%$  [81]. Después, se determinó la distancia de la nanopartícula respecto al microtúbulo, usando 'template matching'. Esta técnica crea una 'imagen de correlación' que muestra la similitud entre una imagen de referencia 'template' y la imagen actual, como se describe en [83], mediante un 'score'. Como referencia se usaron partículas de 800 nm de diámetro (que se denotará como 'partícula de referencia'), las cuales fueron inyectadas en la solución con microtúbulos para que se adhirieran al cubreobjetos, como se explica en la sección 3.2.2.1.

Para medir el tiempo que le toma a la proteína unirse al microtúbulo variando la distancia a la que se encuentra de él, se dejó fija la trampa óptica con la nanopartícula, donde hubiera un microtúbulo cerca de la partícula de referencia. Así, cuando la proteína hacía contacto con el microtúbulo se hacía la medición de fuerza motora en función del tiempo. Se fue moviendo el piezoeléctrico en el eje  $z$ , de 20 nm en 20 nm, con el programa de LabVIEW. Se movió la montura acercando el microtúbulo a la nanopartícula ( $z = +20$  nm) o alejando el microtúbulo ( $z = -20$  nm), de 4 a 5 veces. Para medir el score, el programa hizo un seguimiento de la partícula de referencia utilizando un método de correlación con la imagen template. En pocas palabras, la imagen template se superpuso con la imagen actual de la partícula de referencia y se compararon pixel por pixel para encontrar la similitud. Recordando que la nanopartícula está fija en la trampa óptica, cuando está tocando la superficie del cubreobjetos, el score correspondiente será al de la altura de 250 nm de la partícula de referencia, como se muestra en la FIG. 3.8. Cuando la montura se haya movido 5 veces hacia abajo ( $z = -100$  nm), el score correspondiente será al de 350 nm. Se podría obtener un score máximo de 1000 a una altura de 400 nm (pico de la curva azul de la FIG. 3.8) ya que en ese punto las imágenes template y actual son idénticas.



**FIG. 3.8.** Score en función de altura. Al mover la montura hay un cambio en el score porque la nanopartícula permanece fija. (a) Cuando la nanopartícula está sobre la superficie del cubreobjetos le corresponderá el score de la altura de 250 nm de la partícula de referencia. (b) Cuando la nanopartícula esté a 100 nm de la superficie, le corresponderá el score de 350 nm de la partícula de referencia.

Cada vez que se movió la montura se dejaron pasar alrededor de 2 minutos para darle tiempo a la proteína de unirse y despegarse (por la trampa óptica) del microtúbulo varias veces, como en la FIG. 3.9. Se obtuvieron videos de los experimentos, donde se trató de aprovechar el tiempo de actividad de la proteína K560 (~1 hora) para hacer el análisis de dos o tres nanopartículas por video. Los datos obtenidos por el programa de LabVIEW, mismo que controlaba el movimiento de la montura en z, fueron: la fuerza motora en x y y, la posición del cargo en x y y, la intensidad del haz y el score.



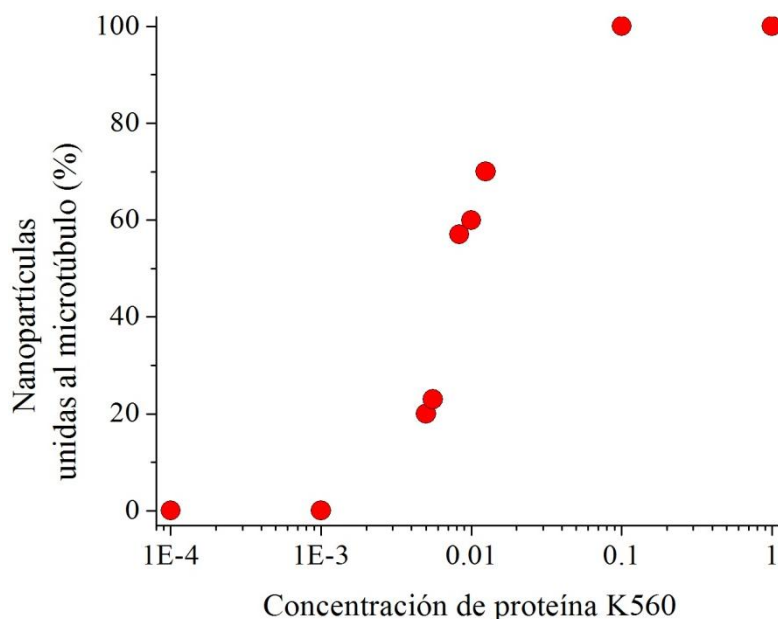
**FIG. 3.9.** Movimiento de la nanopartícula unida a la cinesina sobre el microtúbulo. (a)  $t=0$  s, la nanopartícula inicia en la trampa óptica. (b)  $t=0.4$  s, la cinesina se unió al microtúbulo y caminó sobre él una pequeña distancia, en el eje  $-x$ . (c)  $t=0.8$  s, la nanopartícula regresa a la trampa óptica. Este movimiento repetido se analizó ~2 min. La partícula de referencia genera el score, en base a la imagen de referencia.

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Proteína K560 individual moviendo la nanopartícula

Las proteínas K560 fueron específicamente reclutadas por los anticuerpos en el extremo C-terminal (etiqueta 6xHis). Primero, para verificar que las proteínas estaban activas se utilizó el 100% de la concentración de la muestra de 10  $\mu\text{L}$  de la proteína K560, denotado como concentración 1 en la FIG. 3.10. Se seleccionaron 30 nanopartículas para ver si había proteínas unidas a ellas y todas lograron caminar

sobre el microtúbulo (unión al microtúbulo 100%). Después se diluyó 10000 (0.0001) y 1000 (0.001) veces, pero no se logró ver alguna proteína activa sobre el microtúbulo, por lo que se volvió a trabajar con una concentración alta (0.1). Cuando se diluyó 100 veces se logró ver un 60% y se fue diluyendo un poco más hasta encontrar un 20 – 25% de unión al microtúbulo. Cabe señalar que cada vez que se hacía la purificación de la proteína para obtener la proteína K560, se tenía que repetir el procedimiento de diluir las veces necesarias hasta encontrar la concentración en la que hubiera un solo motor unido a la nanopartícula. En este caso se consideró trabajar con la muestra diluida 200 veces.

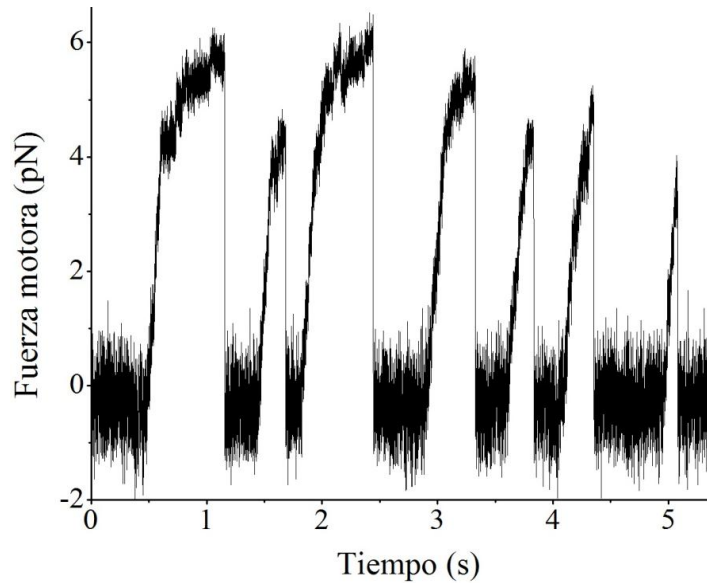


**FIG. 3.10.** Fracción de nanopartículas unidas al microtúbulo. Los anticuerpos ayudaron a que solo una o dos proteínas se unieran a la nanopartícula. Se usaron 30 nanopartículas por ensayo de concentración de proteína K560.

La FIG. 3.11 muestra la fuerza ejercida por el motor en función del tiempo. Cada pico significa que la cinesina comienza a caminar sobre el microtúbulo llevando consigo la nanopartícula y experimenta una fuerza que se opone a la trampa óptica. Cuando el motor se desprende del microtúbulo permite que la nanopartícula vuelva al centro de la trampa óptica, por lo que la fuerza se hace cero. La fuerza de un solo



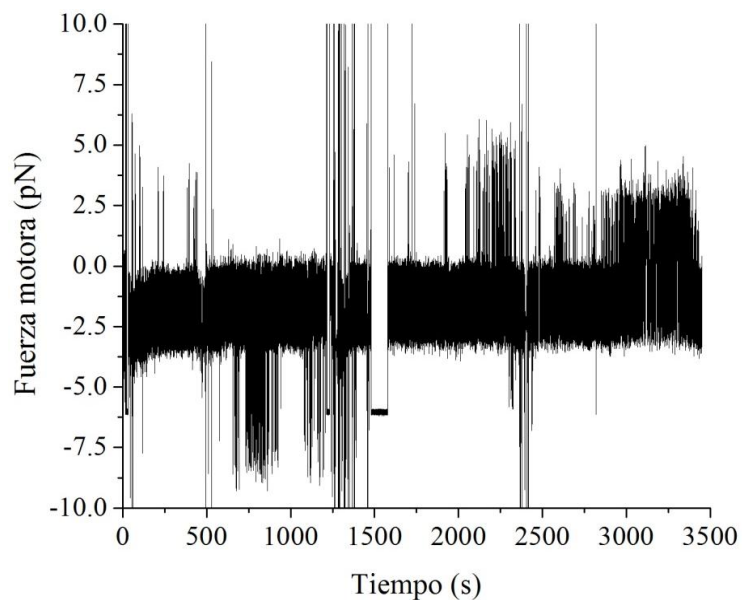
motor varió entre 4 y 6 pN, como señala la literatura. Si se observaba una fuerza superior ( $>10$  pN), era porque había una alta concentración de proteínas motoras en la solución (la nanopartícula estaba siendo movida por dos o más proteínas K560).



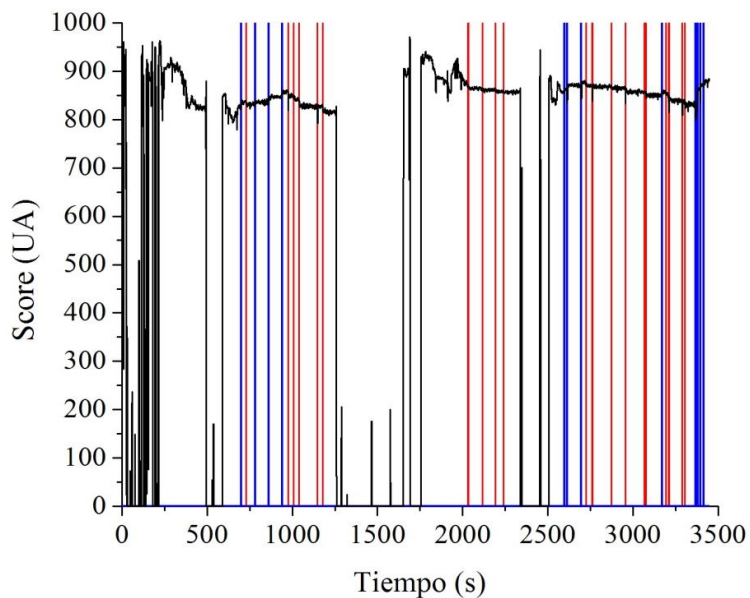
**FIG. 3.11.** Fuerza motora en función del tiempo. La cinesina camina por el microtúbulo y experimenta una fuerza. La fuerza es cero cuando el motor se desprende del microtúbulo y vuelve al centro de la trampa.

### 3.3.2 Motilidad de la proteína K560 variando la distancia al microtúbulo

Por cada corrida se obtuvieron gráficas en OriginLab como las que se muestran en la FIG. 3.12 y FIG. 3.13. En esta corrida se analizaron 3 nanopartículas, la primera aparece en un rango de tiempo de 650 – 1200 s, la segunda de 2000 – 2300 s y la tercera de 2850 – 3450 s. Para la primer nanopartícula se observa una fuerza negativa (FIG. 3.12), esto es porque la proteína K560 caminó en  $x$  negativas, es decir, el microtúbulo tenía el extremo (+) hacia la izquierda, como en la FIG. 3.8. En la FIG. 3.13 se muestra el score en relación al tiempo de corrida. Las líneas rojas indican cuando la montura se movió +20 nm y las líneas azules cuando se movió -20 nm.



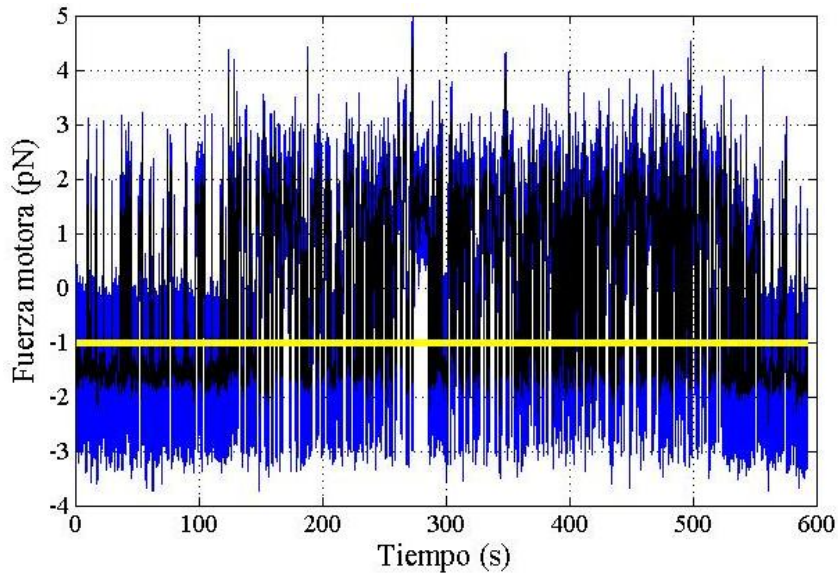
**FIG. 3.12.** Fuerza motora en función del tiempo para el análisis de 3 nanopartículas.



**FIG. 3.13.** Score en función del tiempo. Las líneas rojas indican que se acercó el microtúbulo a la cinesina y la línea azul que se alejó.

Se trabajó en un código en MATLAB (Apéndice C) para encontrar el tiempo en el que la proteína K560 permanecía unida al microtúbulo y el tiempo que le

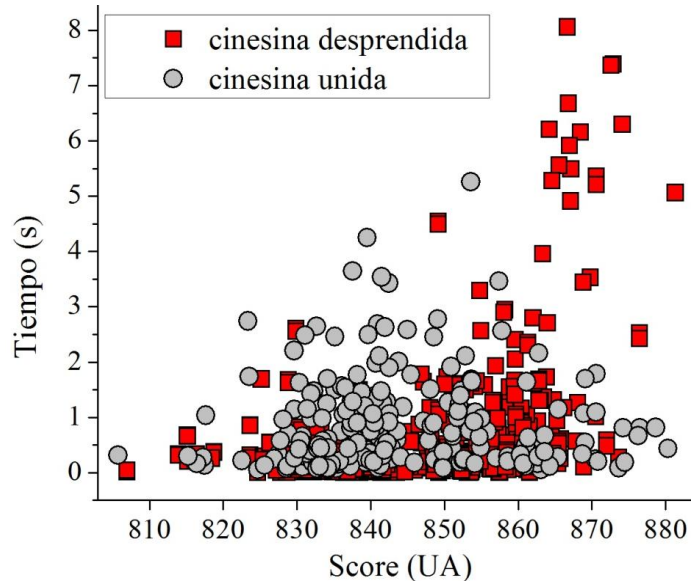
costaba volverse a unir (considerado como tiempo desprendida). Tomando como referencia los datos de la tercera nanopartícula de la FIG. 3.12, se tomó el tiempo del video en el que comienza el análisis y el tiempo en el que termina. Se utilizó un filtro para suavizar la gráfica y se definió una línea de corte para determinar el tiempo en que la partícula está desprendida (datos debajo de la línea) y el tiempo en que la partícula está unida al microtúbulo (datos arriba de la línea) como en la FIG. 3.14.



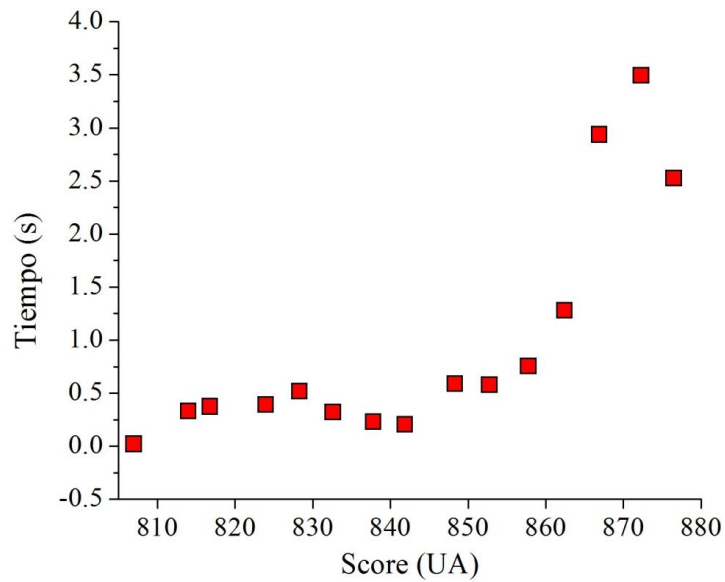
**FIG. 3.14.** Análisis en MATLAB: Fuerza de una cinesina en función del tiempo. La línea azul muestra los datos originales y la línea negra el filtro. La línea amarilla determinó los tiempos en que la proteína permaneció unida (arriba) y desprendida (abajo) del microtúbulo.

La FIG. 3.15 muestra la gráfica con los resultados obtenidos y la FIG. 3.16 el promedio de tiempo en función del score. Como el interés era ver cuánto tiempo tarda la proteína en unirse al microtúbulo, se hizo un análisis solo para el tiempo en que se encontraba desprendido del microtúbulo y su relación con el score. Se observa que el tiempo que pasa la proteína desprendida del microtúbulo cambia con el score, cuando el score es mayor el tiempo que le cuesta unirse al microtúbulo también es mayor. Se infirió que cuando el score era bajo ( $\sim 800 - 845$ ), la proteína se encontraba cerca del microtúbulo, por lo que se unió más rápido y el tiempo desprendida fue mínimo.

Cuando el score cambió a 850 o más, el tiempo de la cinesina desprendida empezó a cambiar (tomó más tiempo para unirse), porque el microtúbulo se alejaba.



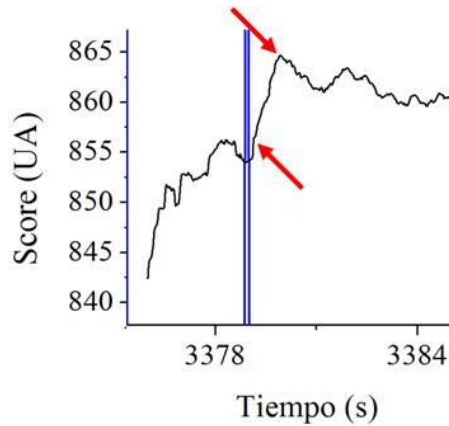
**FIG. 3.15.** Tiempo que pasa la proteína K560 desprendida (cuadro rojo) y unida (círculo gris) al microtúbulo. El score cambia cuando la montura se mueve 20 nm.



**FIG. 3.16.** Promedio del tiempo de la proteína K560 desprendida del microtúbulo. A valores bajos de score se observó que la cinesina pasó menos tiempo desprendida debido a que estaba muy cerca del microtúbulo.

### 3.3.3 Relación de la distancia de la proteína K560 al microtúbulo

De la FIG. 3.13 se calculó la diferencia de score por cada movimiento de la montura (marcado con línea roja o azul), como se muestra en la FIG. 3.17, donde en ese caso hubo un cambio de score de  $\sim 8$  unidades. Se hizo un promedio en el tiempo y un promedio en el score, por cada desplazamiento de la montura, por ejemplo, la tercer nanopartícula de la FIG. 3.12 (Nanopartícula 1) y una nanopartícula de otra corrida (Nanopartícula 2), TABLA 3.1.

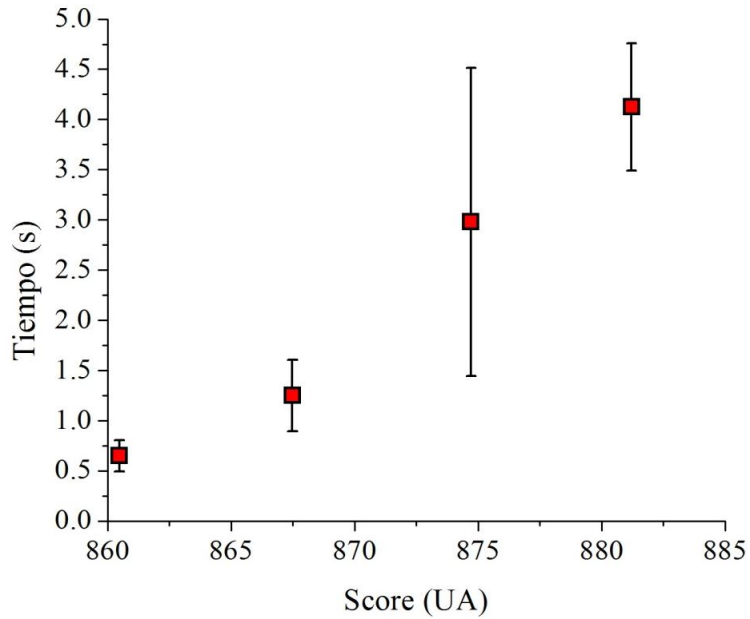


**FIG. 3.17.** Análisis del cambio de score cuando la montura se mueve 20 nm (línea azul).

**TABLA 3.1.** Promedios de tiempo y score de la cinesina desprendida.

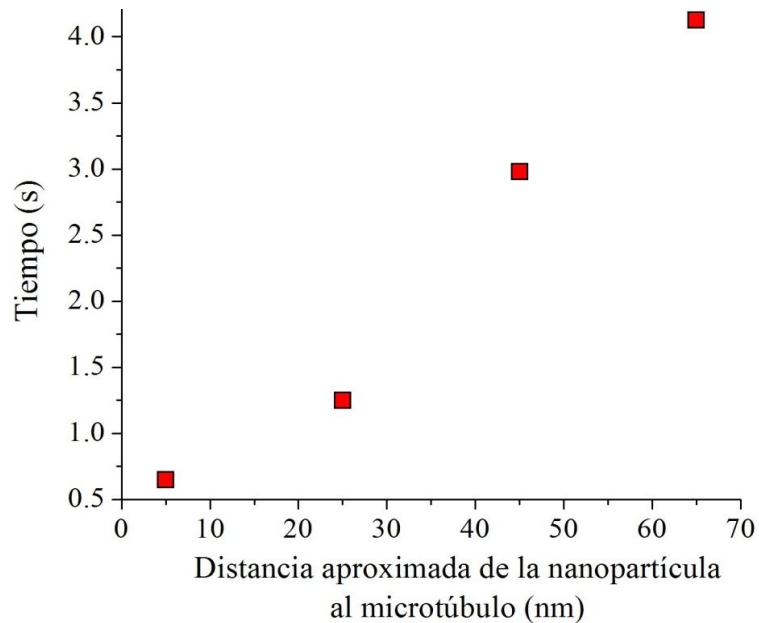
<b>Nanopartícula 1</b>		<b>Nanopartícula 2</b>	
Tiempo promedio (s)	Score promedio	Tiempo promedio (s)	Score promedio
0.5827	850.5236	0.8396	854.7306
0.7557	857.7808	1.2390	864.9906
2.1086	864.6494	2.3351	875.0819
3.4918	872.2943	4.8583	882.5542

La FIG. 3.18 muestra el promedio de todas las nanopartículas analizadas y su relación con el score. Cuando hay un desplazamiento de 20 nm hay un cambio en el score de  $\sim 7$  puntos, y el tiempo para volver a unirse aumenta el doble (para los tres primeros valores).



**FIG. 3.18.** Tiempo de la proteína K560 desprendida del microtúbulo. Promedio de todas las nanopartículas analizadas.

Es difícil encontrar la distancia exacta entre la proteína K560 y el microtúbulo pero con ayuda de estos resultados se puede determinar una distancia aproximada de la nanopartícula al microtúbulo, como se muestra en la FIG. 3.19. Se pueden decir que la nanopartícula está a 5 nm del microtúbulo para tiempos bajos (FIG. 3.16) porque la proteína estaba en contacto con la superficie o más cerca (recordando que la nanopartícula a la que está unida puede rotar en la trampa óptica). Se observa que el último dato es de  $\sim 65$  nm, porque como el tamaño de la proteína es de  $\sim 60$  nm y el del anticuerpo  $\sim 2$  nm, al colocar la nanopartícula más lejos de esa distancia no habría oportunidad de que la proteína se uniera al microtúbulo.



**FIG. 3.19.** Tiempo que le toma a la proteína K560 unirse al microtúbulo en función de la distancia de la nanopartícula.

### 3.4 Discusión y conclusiones

Era de esperarse lo obtenido en la FIG. 3.18, que cuando el score fuera mayor el tiempo que le toma a la proteína K560 unirse al microtúbulo también incrementara, basado en la FIG. 3.8, donde se observa que entre más alejado se esté del microtúbulo mayor es el score (que está en función de la altura). Lo mismo se comprueba con lo obtenido en la FIG. 3.16, que cuando la proteína unida a la nanopartícula (fija en la trampa óptica) está en la vecindad del microtúbulo (prácticamente pegado a él), la tasa de unión de la cinesina al microtúbulo es de 2 – 5 veces por segundo [80], por lo que se permiten repetidas oportunidades para el motor unirse en ese tiempo. Así, cuando se aleja de esa vecindad, el número de repeticiones disminuye, o bien, el tiempo se extiende. Por esa razón, arriba de 860 de score, se empezó a alejar de esa vecindad y el tiempo de unión al microtúbulo aumentó.

Dado que se midió la fuerza de la trampa óptica utilizando el método de cambio de momento de la luz esparcida por la nanopartícula, el cual es independiente de las propiedades de la partícula (tamaño, forma e índice de refracción), del índice de refracción del medio y la potencia del láser, es de gran ventaja para experimentos *in vivo* donde no se conocen las características del objeto a estudiar ni su medio. Con esto, se pueden determinar los tiempos en que la proteína está desprendida del microtúbulo, bien establecido para diferentes proteínas, en microtúbulos con y sin tau, y así llegar a concluir qué tipo de proteína está actuando en un experimento *in vivo* o bien, con ayuda del score determinar la distancia aproximada a la que se está colocando el cargo. En este caso, se trabajó con la proteína K560 y microtúbulos sin tau, para después repetir el procedimiento usando otras cinesinas, por ejemplo, actualmente se está trabajando con la proteína K420 (~40 nm). Por último faltaría agregar el tau a los microtúbulos y repetir los experimentos. Basado en estos resultados se puede determinar qué tanto afecta la proteína tau en el transporte de cinesinas individuales.

En el transporte y regulación intracelular, se debe considerar cómo los motores y proteínas reguladoras trabajan en conjunto para controlar la distribución del cargo pero primero es necesario entender las propiedades de motores individuales. Ya se han realizado estudios que comprueban que dos motores funcionan mejor que uno [ [76]] y se han intentado identificar en pequeños conjuntos, las propiedades que permiten que las proteínas individuales trabajen mejor con otros motores [ [77]]. Ahora, lo ideal sería hacer el estudio aquí presente usando dos o más proteínas y mezclando familias de proteínas motoras. Otras consideraciones que se deben tomar es la presencia de tau en sus diferentes isoformas, dado que se ha comprobado *in vitro* que la presencia de tau a diferentes concentraciones y de diferentes isoformas, puede controlar la velocidad de las proteínas y el número de motores presentes [81]. Por lo que los resultados aquí presentes abren la puerta a un largo camino de estudio, porque como se había mencionado, la alteración en la concentración de tau puede contribuir en la aparición de enfermedades neurodegenerativas.



## Capítulo 4.

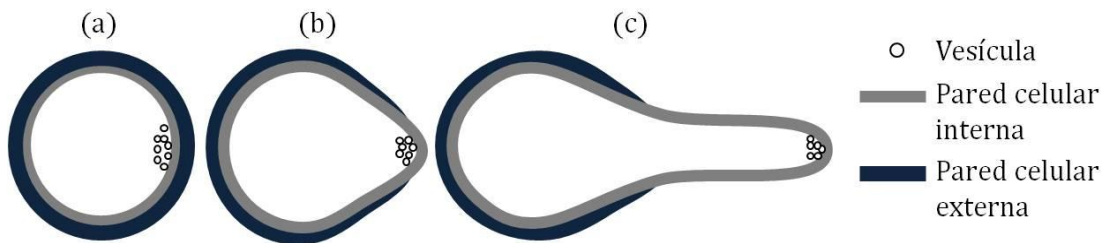
### **aPDT EN DERMATOFITOS: EFECTOS SOBRE *T. MENTAGROPHYTES***

Los seres humanos tienen un alto grado de inmunidad a los hongos, a excepción de los dermatofitos que a pesar de causar infección superficial también pueden ocasionar grave irritación en tejidos subyacentes dando lugar a enfermedades bacterianas. Cuando el sistema inmune se encuentra afectado (por ejemplo, pacientes con VIH, cáncer o diabetes) otros hongos pueden entrar en acción. Se están buscando alternativas más eficientes para combatir los hongos ya que, por ejemplo en los dermatofitos, la mayoría de los tratamientos que actualmente existen son de larga duración, costosos y muchas veces sin resultados [84]. Se propone la Terapia Fotodinámica Antimicrobiana (aPDT por sus siglas en inglés) que utiliza una sustancia fotosensibilizadora activada por una fuente de luz de cierta longitud de onda. La activación induce una cascada de químicos y eventos biológicos que causan cambios irreversibles en las células expuestas, ocasionando la muerte. El tratamiento fotodinámico es muy prometedor para combatir ciertos hongos patógenos, particularmente dermatofitos [85].

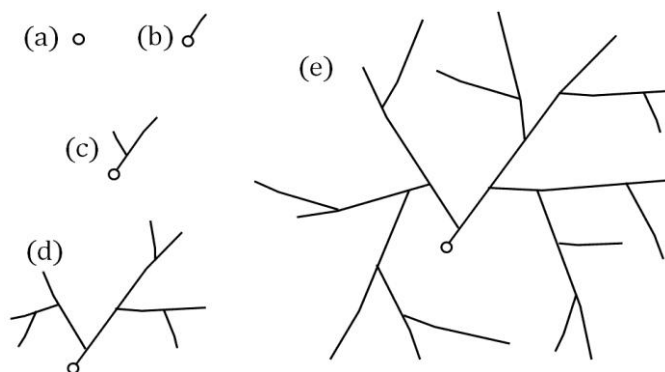
Se ha demostrado que la aPDT ocasiona cambios en la estructura, a diferencia de los controles (solo irradiado con luz roja o solo expuesto al MB) por lo que ha dado muy buenos resultados: >99% de inhibición de esporas después de 5 días de haber sido tratadas [86], en una cepa de *T. tonsurans*, una cepa de *T. mentagrophytes*, una cepa de *M. gypseum* y tres cepas de *M. canis*. Este capítulo muestra el análisis de crecimiento, morfología y elasticidad de *T. mentagrophytes*, en hongos sanos y después de haber sido tratados aPDT.

## 4.1 Antecedentes

Los hongos son organismos eucariotas que pueden crecer por filamentos que se extienden solo en sus puntas externas y se ramifican repetidamente detrás de sus puntas. Otros crecen como levaduras unicelulares, los cuales se reproducen por gemación [84]. En general, la vida de un hongo filamentosos inicia como una espora. Esta es una célula deshidratada adaptada para la supervivencia. Su resistencia se asocia a una capa extracelular rígida, llamada pared exterior [87]. Su crecimiento dependerá de la humedad y la temperatura en la que se encuentre, así como los nutrientes de los que se alimente. Cuando la espora comienza a hidratarse, empieza la actividad celular: Unas vesículas se mueven a lo largo de microtúbulos mediante las cinesinas. Habrá una gran zona de superposición entre microtúbulos y filamentos de actina. Cuando las vesículas se separan de los microtúbulos habrá alguna miosina encargada del transporte que las liberará en un punto, en un área relativamente pequeña de la pared celular interna, ocasionando la ruptura en la pared celular externa. Esto da como resultado la aparición de un tubo germinal, denominada hifa [84] [88], FIG. 4.1. Después del desarrollo de la primera hifa, irá creciendo y se ramificará produciendo una colonia, llamado micelio (FIG. 4.2). El conjunto de vesículas trabajando para que el hongo crezca, conocido como Spitzenkörper, determina la morfología del hongo [88].



**FIG. 4.1.** Proceso de germinación de una espora. Cuando comienza el proceso de hidratación, la espora produce actividad celular (a) que provoca una ruptura en la pared celular (b) dando como resultado un tubo germinal, es decir, una hifa (c). La forma en que se organizan para estabilizar este primer eje de crecimiento sigue siendo desconocida.



**FIG. 4.2.** Formación de una colonia a partir de la germinación de la espora. (a) Inicia como una espora. (b) La espora germina. (c) La hifa crece y comienza a ramificarse. (d-e) Se sigue ramificando hasta forma el micelio.

Existen al menos 1.5 millones de especies diferentes de hongos pero solo el 5% ha sido descrito [84]. La TABLA 4.1 muestra algunos artículos que reportan la tasa de crecimiento (TC), la temperatura y medio de cultivo, en diferentes especies de hongos (datos de "The mycota: Growth, Differentiation and Sexuality" [89]).

**TABLA 4.1.** Valores de TC reportados en la literatura.

Especie	TC ( $\mu\text{m}/\text{min}$ )	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Medio de cultivo
<i>Neurospora crassa</i>	38.3	28	Agar
<i>Ashbya gossypii</i>	2.1	30	Agar
<i>Candida albicans</i>	0.31	37	Agar suero
<i>Aspergillus nidulans</i>	5	37	Agar
<i>Magnaporthe oryzae</i>	1.2	25	Agar
<i>Ustilago maydis</i>	1.5	31	Agar de carbón

De todos las especies, alrededor de 200 hongos son patógenos e infectan a seres humanos u otros animales de sangre caliente ( $\sim 37^{\circ}\text{C}$ ) dando lugar a resultados que van desde infecciones asintomáticas hasta enfermedades letales [84] [85]. Estos

hongos pueden agruparse en cinco categorías, que se basan en características de ruta de entrada al huésped, especie de hongo y tipo de enfermedad que causan, como se muestra en la TABLA 4.2.

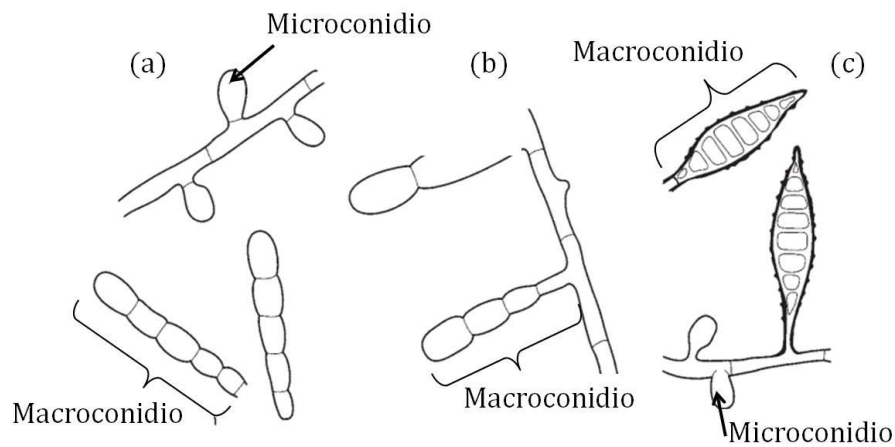
**TABLA 4.2.** Clasificación de los hongos patógenos [84].

<b>Ruta de entrada</b>	<b>Hongo</b>	<b>Enfermedad</b>
Piel	<i>Trichophyton</i> <i>Epidermophyton</i> <i>Microsporum</i>	Dermatomicosis
Mucosa	<i>Candida albicans</i> Otras <i>Candida</i>	Candidiasis
Pulmones	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Aspergilosis
	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Blastomicosis
	<i>Coccidioides immitis</i>	Coccidioidomicosis
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Criptococosis
	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Histoplasmosis
	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Paracoccidioidomicosis
Heridas/Lesiones	<i>Phialophora</i> <i>Cladosporium</i> <i>Sporothrix</i> Otras	Micosis subcutáneas
	<i>Rhizopus</i> <i>Absidia</i> Otras	Zigomicosis
	Especies de <i>Pneumocystis</i>	Neumonía virulenta

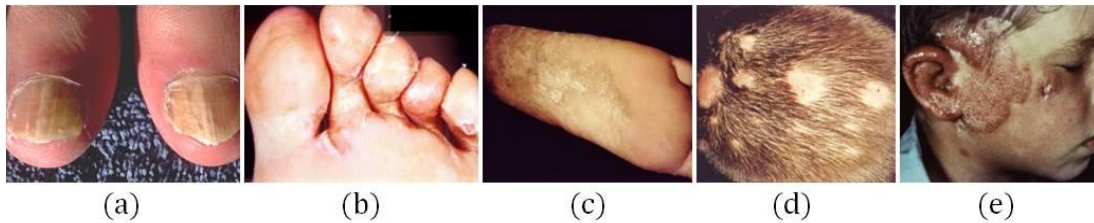
#### 4.1.1 Dermatofitos

Los dermatofitos son un grupo de hongos filamentosos que se alimentan de queratina, atacando zonas de la piel, uñas y cabello, por tanto pueden ocasionar infecciones superficiales en dichas áreas, siendo un problema a nivel mundial, tanto en humanos

como en animales [84]. Como se observa en la TABLA 4.2, se dividen en tres géneros: *Trichophyton*, *Epidermophyton* y *Microsporum*, esquematizadas en la FIG. 4.3, con las cuales forman alrededor de 40 especies diferentes. Algunos ejemplos de infecciones causadas por dermatofitos son mostrados en la FIG. 4.4. Entre ellas se encuentran la onicomicosis, la tiña podal (conocido como pie de atleta) y la tiña capitis (de la cabeza). Estas infecciones raramente amenazan la vida, pero pueden generar incomodidad, desfiguración, aislamiento social y pueden predisponer a enfermedades bacterianas [85].



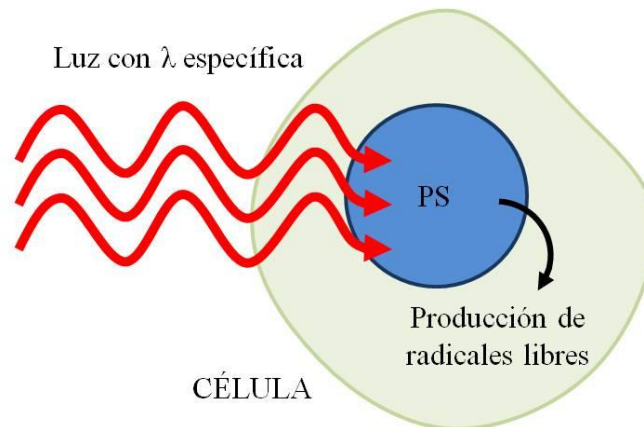
**FIG. 4.3.** Esporas de los tres géneros de dermatofitos. (a) *Trichophyton*, cuenta con macroconidios (~50 µm de largo) y microconidios (~4 µm). (b) *Epidermophyton*, solo produce macroconidios. (c) *Microsporum*, forma microconidios y también macroconidios. Imagen tomada de la referencia [84].



**FIG. 4.4.** Infecciones causadas por hongos dermatofitos. (a) Onicomicosis. Tiña podal (b) en los dedos de los pies y (c) en la planta del pie. Tiña capitis (d) en el pelo y (e) en la cara. Imágenes tomadas de la referencia [90].

### 4.1.2 aPDT

La sustancia fotosensibilizadora (PS) absorbe la energía de una fuente de luz (puede ser coherente, como los láseres, o no coherentes, como diodos de luz) y es capaz de transferir esta energía a otra molécula [85]. El estado fundamental de la PS es el estado singulete. La energía de la fuente de luz crea un tránsito de electrones a un orbital diferente, excitando el PS a la forma de una molécula inestable (primer estado excitado). Para volver a su estado base el PS emite energía por fluorescencia o fosforescencia (después de alcanzar el estado triplete). El estado triplete excitado transfiere un electrón o hidrógeno a una biomolécula, produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS), como superóxido de anión ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radicales hidróxilo ( $OH^\cdot$ ), y también especies reactivas de nitrógeno (RNS), como óxido nítrico (NO) y nitrito de peróxido (ONOO), dentro y fuera de la célula del hongo que causa un desequilibrio en la homeóstasis celular y provoca la muerte, ya sea por apoptosis, necrosis o autofagia. El tipo de muerte del hongo depende de la concentración de la PS y de la dosis de luz del tratamiento [85]. La FIG. 4.5 muestra una esquematización del proceso de la aPDT.



**FIG. 4.5.** Ilustración esquemática de la aPDT. La PS es activada por luz con una longitud de onda específica y produce radicales libres en la célula del hongo lo que lo lleva a la muerte.

La apoptosis, también llamada muerte celular programada, es un proceso regulado por señales celulares para destruir células desconocidas o no deseadas, o que se encuentran dañadas, así que no hay daño alrededor de la célula eliminada. La necrosis es un "accidente" celular o resultado catastrófico debido al agotamiento de ATP necesario para la supervivencia celular, causando lesiones e incluso la muerte de células vecinas, por lo cual este mecanismo ocasiona inflamación celular. La autofagia cambia las células a un proceso metabólico catabólico en el que los componentes celulares se degradan y se reciclan para producir energía como mecanismo de supervivencia durante periodos de estrés nutricional [91]. Dado que la necrosis puede generar lesiones o inflamación, y la autofagia puede llegar a sanar a las células después del tratamiento, es conveniente tener una muerte por apoptosis debido a que es un proceso bien controlado y no hay efectos secundarios.

## **4.2 Materiales y métodos**

### **4.2.1 Dermatofito**

Una cepa de *T. mentagrophytes* fue cultivada durante 14 días a 30°C en agar dextrosa Sabouraud (OmniChem). Se obtuvieron los microconidios raspando la superficie del hongo con una solución de buffer fosfato salino (PBS), pH 7.4 (OmniChem). Se hizo un filtrado con papel filtro No. 2 (Whatman). Se contaron las esporas con la ayuda de un hematocitómetro y se hicieron las diluciones pertinentes para tener una solución con una concentración de  $2 - 3.8 \times 10^5$  microconidios/mL.

### **4.2.2 Proceso aPDT**

Se mezclaron 50  $\mu$ L de la solución de microconidios con 50  $\mu$ L de la solución con la PS. La muestra fue colocada en un pozo de una microplaca de poliestireno (Cientifica Senna) de 0.38 cm<sup>2</sup> y fue iluminada con 60 J/cm<sup>2</sup> para empezar el proceso de aPDT. Se colocó tinta en los pozos adyacentes para evitar esparcimiento de la luz, FIG. 4.6.

Después del proceso, las esporas fueron examinadas para observar los efectos de la aPDT.

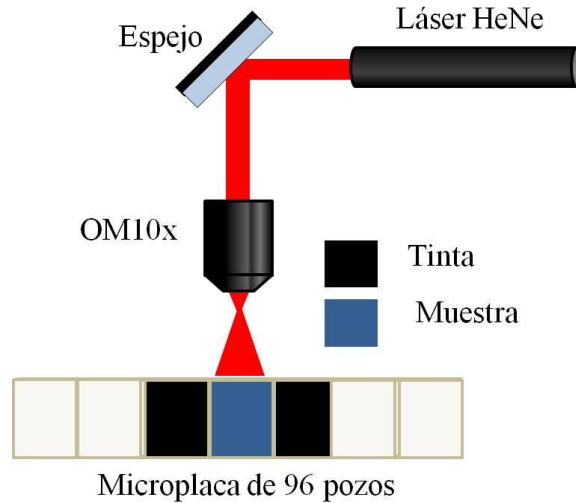


FIG. 4.6. Esquema del arreglo experimental para la aPDT. Imagen tomada de [86].

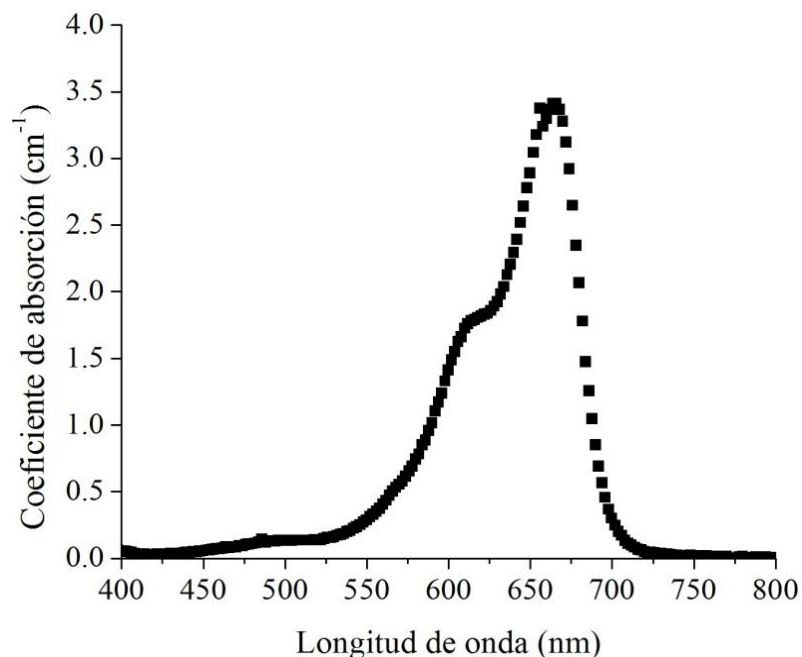
#### 4.2.2.1 Fuente de luz

Como fuente de luz se utilizó un láser HeNe (Uniphase) de 633 nm. El haz láser fue guiado por un espejo hacia un objetivo de microscopio 10x, para enfocar la luz en la muestra colocada en el pozo de la microplaca con una irradiancia de  $\sim 0.05 \text{ W/cm}^2$ . Se irradió por  $\sim 20$  minutos para obtener la fluencia de  $60 \text{ J/cm}^2$ .

#### 4.2.2.2 PS

Se usó una concentración de  $20 \mu\text{M}$  de azul de metileno (MB) (OmniChem) diluido en PBS y se almacenó en oscuridad. El MB cumple con los requisitos de un PS eficaz: soluble en agua, toxicidad en oscuridad mínima y química altamente estable. Además, está clínicamente probado para uso en humanos, está reportado que puede actuar eficazmente sobre la membrana del hongo causando daño estructural [85] [92]. La FIG. 4.7 muestra la gráfica del coeficiente de absorción del MB en función de la longitud de onda. Se observa que el MB tiene mejor absorción entre 600 y 680 nm.



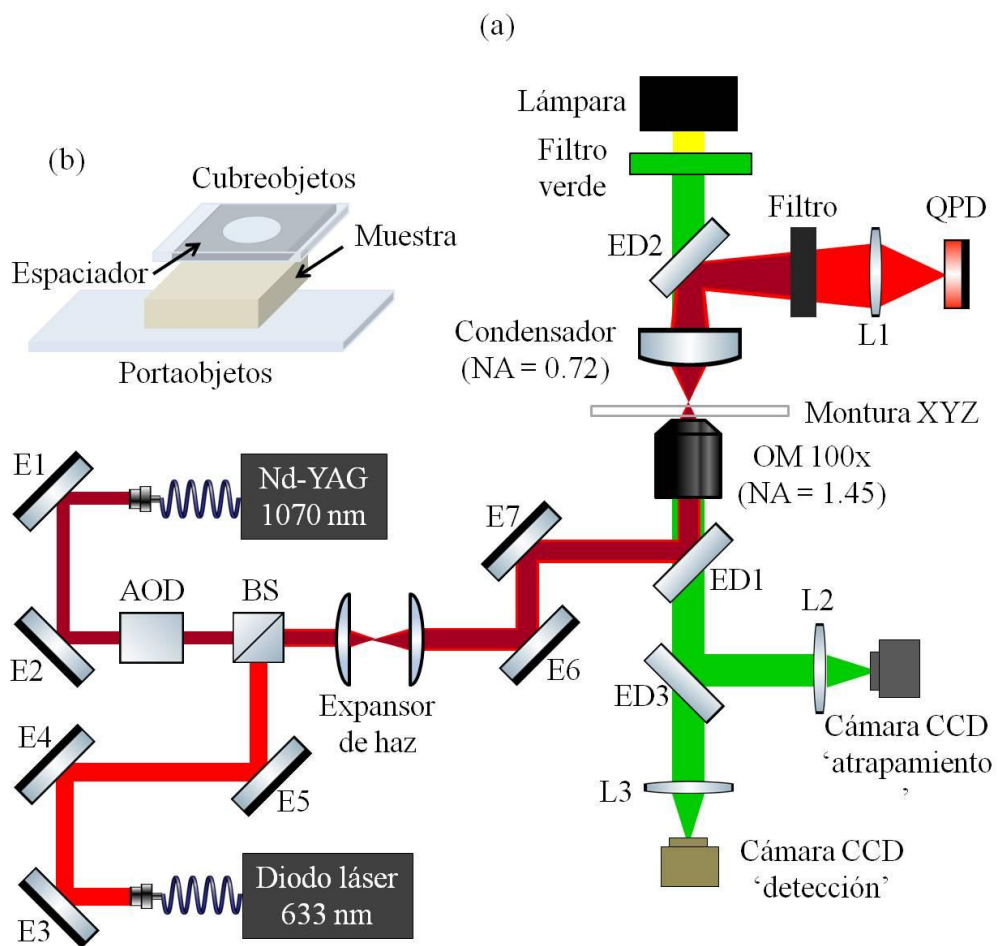


**FIG. 4.7.** Coeficiente de absorción del MB en función de la longitud de onda. Datos tomados de [93].

### 4.2.3 Sistema de OT

El sistema de OT completo es mostrado en la FIG. 4.8(a). Consiste en un arreglo montado sobre un microscopio invertido (Eclipse Ti, Nikon). El láser infrarrojo Nd-YAG de 1070 nm (YLR-10-LP, IPG Photonics) incide a través de un deflector acusto-óptico (AOD) (E3500, Elliot Scientific), que puede dividir el haz en varios haces y formar arreglos cuadrados, líneas o círculo (esta descomposición en varios haces depende de la aplicación que se requiera hacer). Después, el haz IR se une con el haz del diodo láser de 633 nm (OZ Optics) a través de un divisor de haz (BS). Los haces son expandidos 1.5 veces y colimados con ayuda de dos lentes (Expansor de haz) y después son orientados hacia el microscopio con los espejos E6 y E7. Los haces son dirigidos por un espejo dicróico (ED1) hacia un objetivo de microscopio (OM) 100x que enfoca la luz láser sobre la muestra depositada en una celda (FIG. 4.8(b)), la cual es colocada en una montura XYZ (MCLS03179, Mad City Labs Inc), que puede ser controlada por LabVIEW mediante un dispositivo de adquisición de

datos (NI USB-9162, National Instruments). Los rayos de luz a la salida de la muestra son colectados por un condensador, y después son dirigidos a un fotodetector de cuadrante (QPD) (E4100, Elliot Scientific) con otro espejo dicroico (ED2) y una lente (L1). El QPD está diseñado para detectar luz del láser rojo, por lo que se utiliza un filtro para eliminar el haz IR. La muestra es iluminada con una lámpara con filtro verde y la señal es detectada por dos cámaras CCD, una para visualizar la captura y manipulación, y otra para medir la fuerza del objeto de estudio. Las lentes L2 y L3 sirven para enfocar la imagen a sus respectivas cámaras.



**FIG. 4.8.** Arreglo de OT para el análisis de los efectos de la aPDT en *T. mentagrophytes*.

Para el análisis de los hongos sólo se utilizó el láser IR que sirve para hacer captura y manipulación, variando la potencia de 20 mW a 1 W. El láser rojo se utiliza para hacer medición de fuerzas de objetos esféricos pero en este caso, los hongos no tienen esta forma, por lo que se omitió esta parte. Cabe aclarar que se explica esta parte del arreglo óptico porque tendrá lugar en la sección de Trabajo a futuro.

#### **4.2.3.1 Monitoreo del crecimiento de *T. mentagrophytes***

Las OT permitieron manipular a *T. mentagrophytes* para medir su crecimiento y deformación. La solución con microconidios obtenida en la sección 4.2.1 fue depositada en dos medios: medio agar Sabouraud dextrosa (SDA) y medio agar papa-dextrosa (PDA), y se mantuvo a 30°C para estimular el crecimiento de las esporas. Se recogieron muestras cada hora desde que fueron incubadas las esporas (denominado  $t = 0$ ) hasta encontrar la hora en que comenzaba a germinar. De ahí en adelante se pudo observar el crecimiento en intervalos de 30 min, 1 hora o 2 horas dependiendo de la velocidad de crecimiento del hongo. Con esto, se determinó la razón de crecimiento del hongo mediante una gráfica de tamaño en función del tiempo. Se repitió el proceso para los hongos tratados con aPDT.

Para realizar el monitoreo de *T. mentagrophytes* se utilizó la cámara CCD del sistema de OT, que tiene un rango de observación en el eje  $x$  de 50  $\mu\text{m}$ . El sistema de OT también ayudó mantener los hongos en foco y poder hacer la captura de imágenes, o bien, para acomodarlos ya que en muchas ocasiones no se veía si había germinado por la posición en la que se encontraba. Las mediciones del tamaño del hongo se realizaron con ayuda del programa imageJ.

#### **4.2.3.2 Evaluación *in vitro* de los efectos de la aPDT**

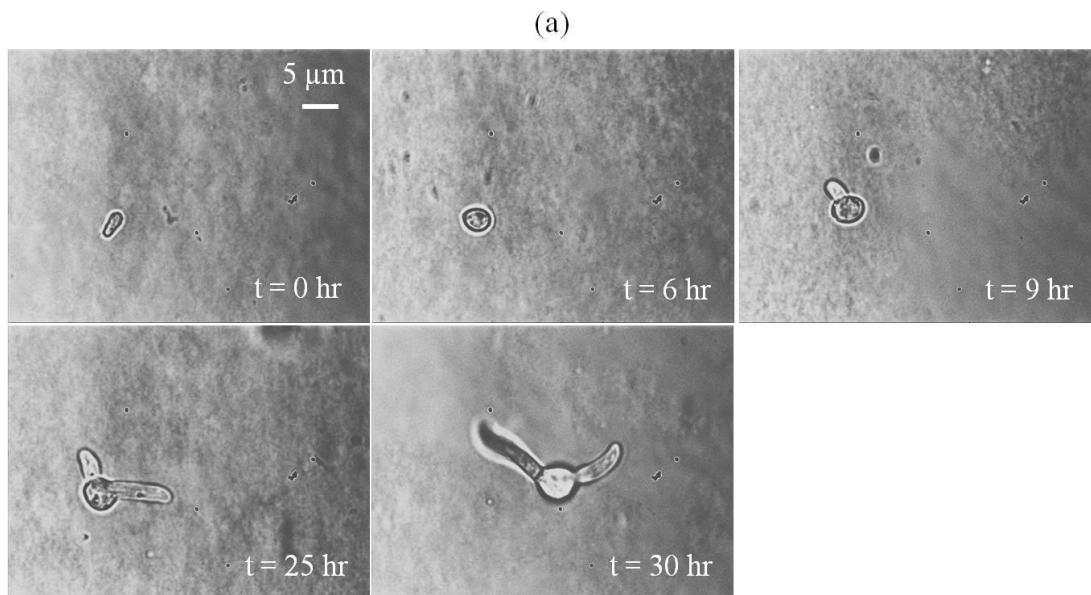
Existen reportes que indican que el Spitzenkörper evita la luz, y se coloca en un nuevo lugar de la pared celular del hongo para continuar creciendo [94]. Por esta razón se trató de enfocar el haz IR en algún punto del hongo para observar cambios

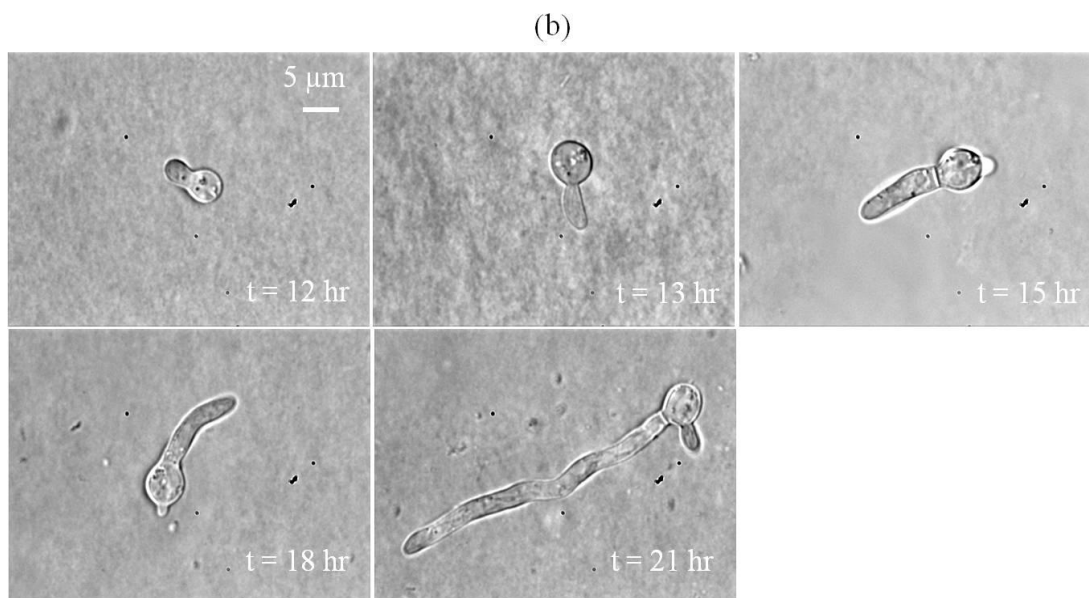
morfológicos. Además, con ayuda del AOD se atrapó el hongo con un haz y se utilizó otro haz para estirarlo; y medir deformación a diferentes potencias, es decir, determinar cuánto se estiraba el hongo en relación a su forma original. De igual manera, se realizó en hongos sanos y en hongos tratados con aPDT.

## 4.3 Resultados

### 4.3.1 Monitoreo del crecimiento de *T. mentagrophytes*

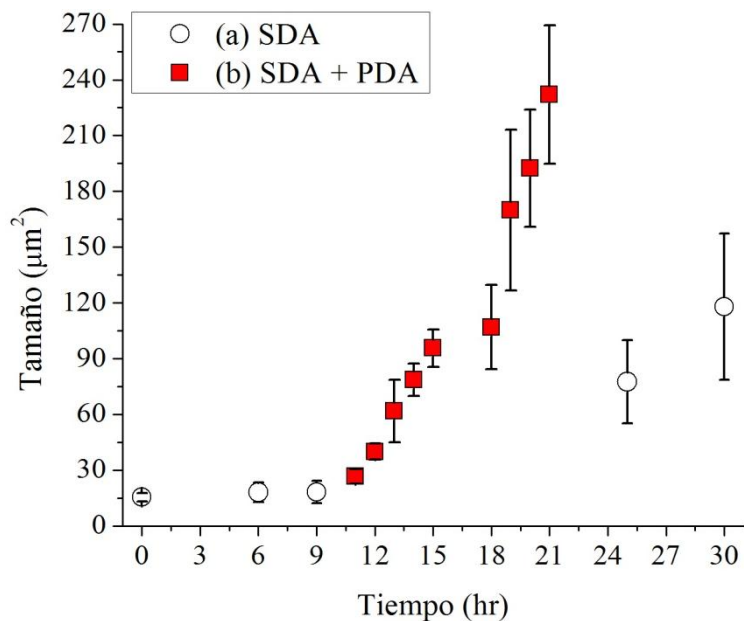
Se analizó el tamaño del dermatofito *T. mentagrophytes in vitro* a diferentes tiempos para determinar su razón de crecimiento. La FIG. 4.9(a) muestra el *T. mentagrophytes* en SDA y la FIG. 4.9(b) en SDA + PDA, en imágenes antes y después de germinar. En cada intervalo de tiempo se midieron entre 10 y 15 dermatofitos para calcular su tamaño (datos no mostrados). Utilizando sólo SDA el crecimiento del hongo fue más lento. Desde que se incubó la espора hasta que germinó pasaron alrededor de 9 horas. En cambio, en el medio de SDA + PDA germinó después de 12 horas pero la velocidad de crecimiento fue mayor.



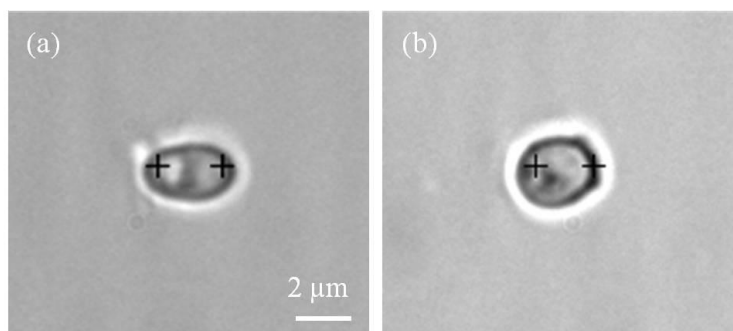


**FIG. 4.9.** Crecimiento de *T. mentagrophytes*. (a) En SDA, desde que fue incubado ( $t=0$  hr), antes de germinar ( $t=6$  hr), cuando germinó ( $t=9$  hr) y horas después de haber germinado ( $t=25$  hr y  $t=30.5$  hr). (b) En SDA + PDA, desde que germinó ( $t=12$  hr) y después de haber germinado ( $t=13-18$  hr), hasta que abarcó toda la pantalla de observación ( $t=21$  hr).

Se tomó en cuenta el tamaño del área superficial del hongo y no la longitud, para tener un mejor control en las mediciones del crecimiento del hongo, como se observa en la FIG. 4.10. En ambos casos, se observó que entre más tiempo pasó más rápido fue el crecimiento del hongo. La razón de crecimiento del *T. mentagrophytes* en estos medios fue de micrómetros cuadrados por hora. Se optó por usar el medio de SDA + PDA para el monitoreo del crecimiento de los hongos tratados con aPDT. Se observó que el tratamiento fue muy efectivo porque no se encontró crecimiento, FIG. 4.11(a-b), o bien, fueron eliminados porque fue muy difícil encontrarlos en la muestra, a diferencia de los hongos sin tratar que eran fácil de localizar varios hongos en un campo visual.



**FIG. 4.10.** Tasa de crecimiento de *T. mentagrophytes*. Para el medio de (a) SDA y para el medio de (b) SDA + PDA.



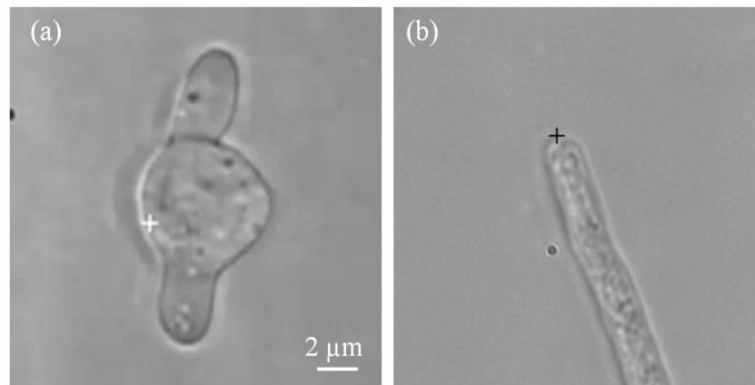
**FIG. 4.11.** *T. mentagrophytes* después de la aPDT. (a)  $t = 30$  min. (b)  $t = 32$  horas.

## 4.3.2 Evaluación de los efectos de la aPDT en *T. mentagrophytes*

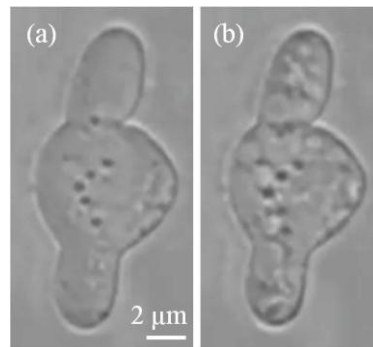
### 4.3.2.1 Cambios en la morfología

Se hicieron pruebas, enfocando el haz IR sobre *T. mentagrophytes* sano (FIG. 4.12) y se observó cómo cambiaba su morfología. Se aplicó una potencia de  $\sim 1.2$  W a la entrada del objetivo de microscopio 100x dejando fijo el haz sobre el hongo (o en la

punta de la hifa), sin embargo, el hongo sufrió daño por el calentamiento que el láser le inducía. La FIG. 4.13 muestra dos imágenes de aproximadamente 35 minutos después de que comenzó a irradiar el láser sobre el hongo germinado. Debido al calentamiento inducido por el láser la pared celular del hongo reventó y comenzó a llenarse de burbujas, lo que ocasionó que el hongo se deformara. Para el caso de la hifa se dejó actuar algunas horas y no ocurrió ningún cambio.



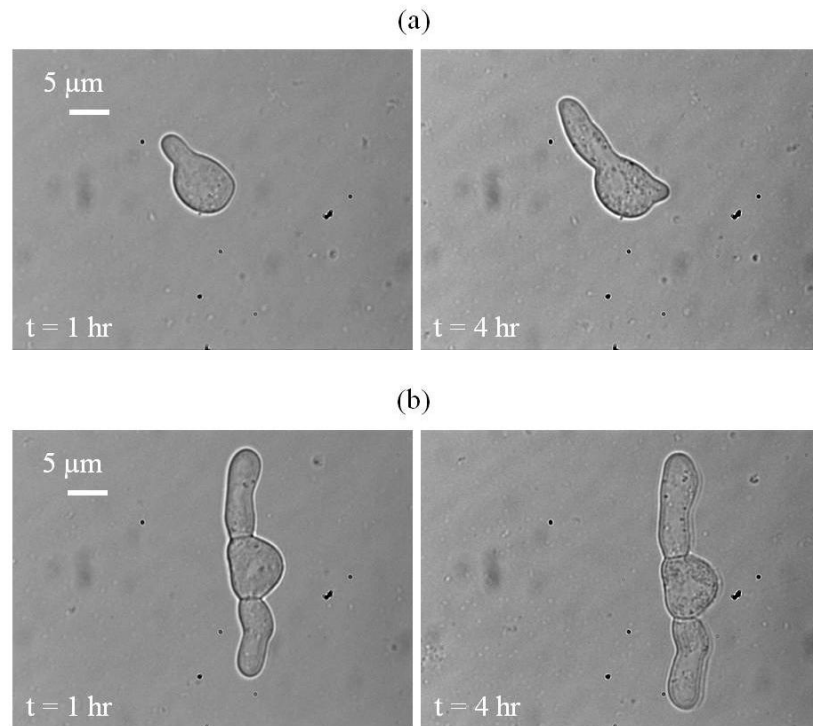
**FIG. 4.12.** Aplicación del haz IR a 1.2 W sobre *T. mentagrophytes*. (a) Sobre un hongo germinado. (b) Sobre la punta de una hifa.



**FIG. 4.13.** *T. mentagrophytes* después de haber sido irradiado por 35 minutos a 1.2 W. (a)  $t \sim 35$  minutos. (b) 10 segundos después de la imagen (a), se observan las burbujas dentro de la pared celular debido al calentamiento introducido por el láser.

Se hicieron comparaciones del crecimiento de dos hongos en una misma muestra 15 horas después de haber sido incubados, y sólo uno fue irradiado con el

láser IR, usando  $\sim 20$  mW a la entrada del objetivo de microscopio 100x. Se observó que el que no fue irradiado sí creció mientras que el otro no (FIG. 4.14), comprobando con esto que la luz lo dañó, usando un tiempo mínimo de exposición ( $< 1$  segundo) y usando la potencia mínima del láser en su configuración actual.



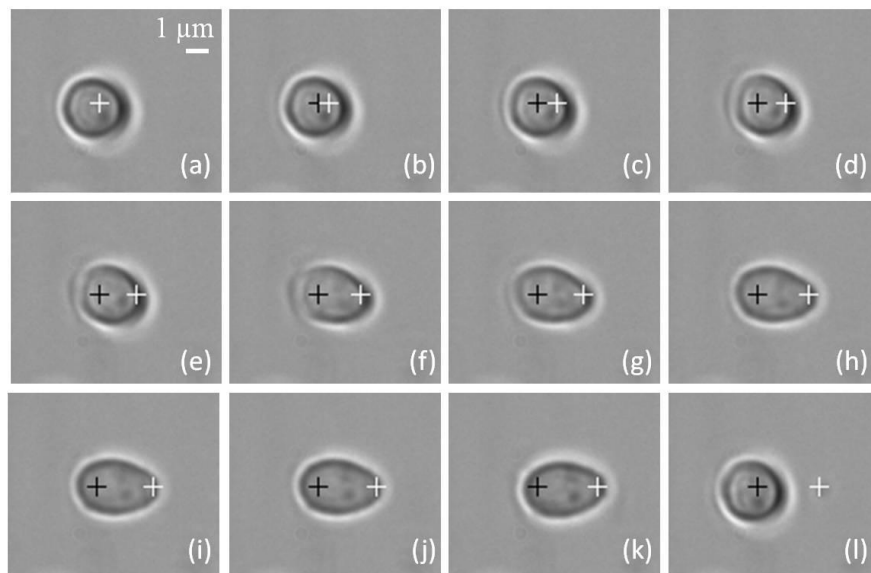
**FIG. 4.14.** Crecimiento de *T. mentagrophytes*. (a) Sin ser irradiado con el haz IR y (b) 1 y 4 horas después de haber sido irradiado.

#### 4.3.2.2 Cambios en las propiedades viscoelásticas

Dado que no se encontró crecimiento en *T. mentagrophytes* después de la aPDT, se hizo el análisis del cambio en las propiedades viscoelásticas de esporas usando 600 mW a la entrada del objetivo de microscopio 100x. Para estos experimentos, la idea era ver cuánto se podía estirar el hongo después de haber sido tratado con aPDT, comparando con la elasticidad de un hongo sano. La FIG. 4.15 muestra un haz fijo y el otro moviéndose cada 100, 200 o 400 nm en un hongo sano. Se observó que la pared celular del hongo sano era muy rígida, pues la OT sólo logró rotarlo para ver su



forma, pero no se logró medir elasticidad alguna. Se repitió el procedimiento para el hongo después de haber sido tratado con aPDT a diferentes tiempos:  $t = 30$  minutos,  $t = 1.5$  horas,  $t = 4$  horas,  $t = 6$  horas y  $t = 32$  horas, sin embargo, la pared celular fue tan resistente que no presentó cambios después del tratamiento. Después, se trabajó con hongos germinados (hongo sano 25 horas después de haber sido incubado) tratados con aPDT, para ver si el hongo ya crecido presentaba cambios en elasticidad. No se observó diferencia en elasticidad entre el hongo sano y el hongo tratado.



**FIG. 4.15.** Aplicación de las OT para estirar *T. mentagrophytes* utilizando dos haces de luz. Esto permitió ver si las propiedades viscoelásticas del hongo habían cambiado después de la aPDT. (a) Posición inicial de los dos haces, después uno se fue moviendo (b-d) cada 400 nm. (e) Posición del segundo haz 1600 nm, y se siguió moviendo (d-h) cada 200 nm. (i) Posición inicial del segunda haz 2400 nm, y se terminó moviendo (j-l) cada 100 nm. Se observó que en (l) la espora vuelve a su posición inicial.

## 4.4 Discusión y Conclusiones

Los resultados sobre la tasa de crecimiento del *T. mentagrophytes* no coinciden con los de otras especies de hongos reportados en la literatura (TABLA 4.1), que

muestran crecimientos de milímetros por hora ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ). No hay reportes de crecimiento de esporas ni tiempo de germinación del *T. mentagrophytes*, y tampoco del cambio en la morfología o elasticidad del mismo, pero con los dos medios de cultivo en los que se estimuló la espora dieron una tasa de crecimiento de aproximadamente  $\mu\text{m}/\text{hora}$  (las primeras 30 horas, que fue el límite en el que se podía monitorear un hongo completo el campo visual del microscopio).

Cuando se enfocó el haz IR sobre *T. mentagrophytes* sano se esperaba encontrar algún cambio en su forma. Se han hecho pruebas modificando la morfología de un *Trichoderma viride*, utilizando un láser de 820 nm con una potencia de 250-260 mW [94], o bien, de una *Neurospora crassa*, usando un diodo láser de 785 nm, con una potencia de 70 mW [95]. En el caso del *T. mentagrophytes* se utilizó el láser IR de 1070 nm, usando un rango de 20 mW a 1 W de potencia a la entrada del objetivo de microscopio 100x, pero la potencia del láser fue tan alta que no se logró el objetivo de modificar la morfología del hongo pues el hongo sufrió daño por el calentamiento que el láser le inducía. Se siguen estudiando los cambios morfológicos del *T. mentagrophytes* por lo que se necesita determinar el umbral de intensidad óptica para ver a qué potencia se puede manipular sin que sufra daño.

Para los hongos tratados con aPDT, se logró lo esperado, que inhibiera el crecimiento, o bien, lo eliminara por completo. Se ha reportado que la presencia de la pared celular rígida en el hongo puede influir en el crecimiento [87] y también se sabe que los radicales generados en el proceso de aPDT alteran la estructura de la pared celular y la membrana, lo que proporciona la translocación adicional del PS en la célula [85], por lo que se interrumpió el crecimiento en el hongo o lo terminó matando. Sin embargo, se esperaba que al tener una modificación en su pared celular, sus propiedades viscoelásticas también cambiaran haciéndose más flexible pero no fue así, en las primeras 32 horas después de la aPDT, la pared celular de la espora permaneció rígida al igual que un hongo sano.

La aPDT es un método no invasivo que combate células no deseadas por lo que tiene un amplio campo de estudio en la medicina, tanto en humanos como en

animales (se podría utilizar para combatir cáncer, manchas en la piel, acné, entre otras cosas). Dentro del campo de los dermatofitos, faltaría probar con hongos más crecidos pues en la vida real se sabe que se tiene la infección cuando el hongo está más desarrollado, pero en principio el método debería funcionar también, por lo que podría llevarse a cabo en la vida real como tratamiento de la piel (con longitudes de onda entre 600 y 800 nm para evitar toxicidad en la piel [85]).

En este trabajo se han establecido parámetros iniciales del uso de las OT en el estudio de las propiedades viscoelásticas y mecánicas de células de hongos dermatofitos. Hay estudios que indican que las fuerzas en hifas del *N. crassa* son mayores a piconewtons por lo que se no pueden medir con pinzas ópticas [95], pero no hay reportes con el *T. mentagrophytes*. Posiblemente, en el futuro se encuentre los parámetros adecuados para manipular más eficientemente este tipo de hongos a través de OT.

## Capítulo 5.

### CONCLUSIONES GENERALES

Se puede hacer captura y manipulación en dos dimensiones por corrientes de convección, generadas por la absorción láser de una película de a-Si:H. Se demostró que por debajo de 3mW, la película de a-Si:H produce un gradiente de temperatura capaz de atrapar micropartículas en el agua que se encuentran en regiones lejanas, las cuales permanecen en foco. Al aumentar la potencia entre 3 y 11 mW, las micropartículas quedan atrapadas alrededor del spot por la competencia de dos fuerzas: fuerza termoforética y fuerza de arrastre. Por encima de 12 mW, aparecen burbujas de vapor que también son capaces de atrapar micropartículas. Se confirmó numéricamente que los gradientes de temperatura son los que ocasionan estos mecanismos de atrapamiento, y que las micropartículas se mueven a mayor velocidad cuando se encuentran más cerca del spot, debido a que las moléculas en la zona caliente del líquido se mueven con mayor energía, provocando que las partículas cercanas se muevan a mayor velocidad. La manipulación se puede realizar iluminando el material absorbente con diferentes configuraciones, o bien, mediante el SML usando diferentes patrones dinámicos.

Referente al estudio con material biológico, de la proteína K560, los resultados que se obtuvieron fueron los esperados hasta ahora. Entre mayor es el score mayor es el tiempo que le toma a la kinesina unirse al microtúbulo. Cuando la proteína es colocada prácticamente pegada al microtúbulo, le toma milisegundos unirse al microtúbulo, en cambio, cuando se aleja el tiempo pasa de milisegundos a segundos. Es necesario repetir el procedimiento en diferentes tipos de proteínas motoras individuales e incluso en proteínas trabajando en conjunto y ver si influye la distancia a la que se encuentra la proteína con el tiempo que le cuesta unirse al microtúbulo y ver cómo influye la proteína tau a diferentes concentraciones e isoformas. Como ya se mencionó, para medir la fuerza del motor se utilizó el método

cambio de momento de la luz por lo que lo anterior se podría aplicar a experimentos en vivo y así comprobar cómo afecta la proteína tau colocando las proteínas motoras a diferentes distancias del microtúbulo, porque ya se ha demostrado *in vitro* que alteraciones en tau perjudica el transporte y es ahí cuando se generan enfermedades neurodegenerativas.

Por último, respecto al *T. mentagrophytes*, se observó que las esporas germinaron en tiempos diferentes en cada medio (SDA y SDA + PDA) pero una vez que germinaron la velocidad de crecimiento fue aumentando, en cambio las esporas tratadas con aPDT reaccionaron al tratamiento y no crecieron en las primeras 32 horas, o fueron eliminadas por completo. No obstante, lo encontrado en la parte de cambios morfológicos o en elasticidad se sigue estudiando, tanto en hongos sanos como en tratados con aPDT, ya que no fue lo esperado comparado con lo que se ha encontrado en otras especies de hongos. Se necesita encontrar la potencia en la que los hongos no sufran daño y así poder manipularlos para encontrar los cambios en sus propiedades mecánicas después del tratamiento. En general, los ensayos con pinzas ópticas han permitido formular un protocolo para analizar los efectos morfológicos en células de hongos tratados con aPDT, lo mismo se puede estudiar para otro tipo de microorganismos, ya que se ha demostrado que esta terapia es muy efectiva en varias especies de dermatofitos, además de ser más efectivo y económico, comparado con los que actualmente existen para tratar este tipo de infecciones.

## **TRABAJO A FUTURO**

### **Efectos térmicos en pinzas ópticas**

Como una continuación del presente trabajo, se demostró que las corrientes de convección generadas por la absorción láser del a-Si:H (enfocando un haz gaussiano de 532 nm, en un rango de 1 a 3.5 mW de potencia, mediante un objetivo de microscopio 100x), aumentan la rigidez de la trampa óptica ( $k_{OT}$ ) [96]. Dependiendo de la potencia del láser hay un cambio en la constante de rigidez. Dejando fijo la trampa óptica y moviendo la montura, una micropartícula alcanza velocidades de hasta 90  $\mu\text{m/s}$  antes de escapar de la trampa, en cambio usando una celda sin a-Si:H la micropartícula escapa a velocidades más bajas (30  $\mu\text{m/s}$ ). Algo que se propone hacer es eliminar las corrientes de convección para solo trabajar con termofóresis, esto se puede lograr disminuyendo la altura de la celda de 100  $\mu\text{m}$  con la que se trabaja en la actualidad. Manipulación por termofóresis es un área prácticamente no explorada. Termofóresis tiene el potencial de manipular una gran cantidad de micropartículas con potencias de unos cuantos miliwatts debido a que la fuerza termoforética es de cientos hasta miles de veces más grande que la fuerza gradiente.

### **Efectos de la proteína tau en el transporte intracelular**

El trabajo realizado con la proteína motora se realizó en la UCI por lo que no se pudo continuar en INAOE, pero actualmente se está trabajando en ello desde allá, donde ya se probó la kinesina K420 (~40 nm). Como trabajo futuro se propone analizar los resultados con una proteína más grande (~90 nm) y probar con diferentes concentraciones e isoformas de la proteína tau.

## Efectos de la aPDT en microorganismos

Dado los resultados obtenidos y el tiempo que se tuvo para trabajar en esta parte del proyecto, aún quedan mucho trabajo por hacer, por ejemplo:

- Determinar el umbral de intensidad óptica del daño del hongo.
- Determinar el tipo de muerte del hongo.
- Calibrar el sistema de OT para medir fuerza mediante el método de cambio de momento de la luz. El sistema de OT con el que se realizaron los experimentos pueden medir la fuerza de objetos esféricos pero como los hongos no tienen esta forma no se pudo medir esta fuerza. Sería interesante probar y medir también con los hongos tratados con aPDT a diferentes tiempos después de la terapia.
- Para un análisis *in vitro*, utilizando la misma muestra biológica, podría ser útil mantener la temperatura de la celda en la que se encuentra el hongo a 30°C para dejar fija la muestra e ir midiendo las propiedades del hongo: crecimiento, efectos del aPDT, etc. Los experimentos se realizaron tomando una muestra del horno que se encontraba a 30°C, cada determinado tiempo, para estimular el crecimiento del hongo. Se propone utilizar una película de a-Si:H para mantener dicha temperatura en la celda.
- Aprovechando que el sistema de OT cuenta con un láser rojo, se puede hacer aPDT sobre la muestra y mantenerla fija para darle seguimiento al hongo antes, durante y después de la terapia.
- Utilizar LED para la aPDT, con una densidad de energía no superior a 200 mW/cm<sup>2</sup> para reducir el daño en tejidos normales [85]. Ventajas de usar LED: menos costosos, transportable para aplicaciones experimentales y clínicas.
- Probar lo mismo que ya se presentó en este trabajo usando otros microorganismos, por ejemplo *Candida albicans*, un hongo del que hay más reportes y puedan hacerse comparaciones.

# TRABAJO DERIVADO DEL PROYECTO DE TESIS

## Publicaciones

- i. E. Flores-Flores, **S.A. Torres-Hurtado**, R. Páez, U. Ruiz, G. Beltrán-Pérez, S.L. Neale, J.C. Ramírez-San-Juan & R. Ramos-García, "Trapping and manipulation of microparticles using laser-induced convection currents and photophoresis". *Biomed. Opt. Express*, 6(10), 4079-4087 (2015).
- ii. T. Spezzia-Mazzocco, **S.A. Torres-Hurtado**, J.C. Ramírez-San-Juan & R. Ramos-García, "In-vitro effect of antimicrobial photodynamic therapy with methylene blue in two different genera of dermatophyte fungi". *Photon. Lasers Med.*, 5(3), 203-210 (2016).

## Proceedings

- i. **S.A. Torres-Hurtado**, B.M. Villegas-Vargas, N. Korneev, J.C. Ramirez-San-Juan & R. Ramos-Garcia, "Optical trapping with photorefractive electric fields". *Proceedings of SPIE 2012*.
- ii. **S.A. Torres-Hurtado**, E. Flores-Flores, G. Beltran-Perez, S.L. Neale, J.C. Ramirez-San-Juan & Ramos-García, "Trapping and manipulation of microparticles using Rayleigh convection generated by laser-induced heating of an absorbing thin film". *Proceedings of SPIE 2014*.
- iii. J.A. Zenteno-Hernández, A. Gómez-Vieyra, **S.A. Torres-Hurtado**, J.C. Ramirez-San-Juan & R. Ramos-García. "Convection currents enhancement of the spring constant in optical tweezers". *Proceedings of SPIE 2016*.



## Memorias

- i. **S. A. Torres-Hurtado**, R. Ramos-García, E. Flores-Flores & R. Páez-López, "Captura de microesferas de vidrio en agua utilizando campo eléctrico evanescente". Mexican Optics and Photonics Meeting 2013.
- ii. R. Páez-López, **S.A. Torres-Hurtado**, U. Ruiz & R. Ramos-García, "Massive manipulation of microparticles using termophoresis". Light in Science, Light in LIFE 2015.
- iii. **S.A. Torres-Hurtado**, J. Ramírez-Ramírez, T. Spezzia-Mazzocco & R. Ramos-García, "Efectos de la terapia fotodinámica antimicrobiana en hongos dermatofitos". III Taller de Habilidades Profesionales para Jóvenes Científicas 2016.
- iv. T. Spezzia-Mazzocco, **S.A. Torres-Hurtado**, J.C. Ramírez-San-Juan & R. Ramos-García, "In-vitro photodynamic therapy against dermatophytes". RIAO/OPTILAS 2016.

## Estancia en el extranjero

Programa de Becas Mixtas, CONACyT

Proyecto: Regulation of Force production in vivo

Investigador a cargo: Dr. Steven Gross

Universidad de California, Irvine

Septiembre 2014 - Agosto 2015

## Apéndice A

# VELOCIDAD DE LA MICROPARTÍCULA

### A.1 Seguimiento de la partícula

Se utilizó como base un software de MATLAB que hace el análisis del movimiento browniano en partículas, mediante el efecto flashing ratchet, a partir del procesamiento de un video que monitorea la trayectoria de partículas [97]. El software cuenta con una función principal y otras más que la complementan:

1. *flashing*. Función principal que encuentra el movimiento de cada partícula con respecto a todos los cuadros del video. Requiere como argumentos de entrada:
  - nombre del video (video en formato AVI).
  - tiempo inicial (tiempo en segundo donde comienza el análisis).
  - tiempo final (tiempo en segundo donde termina el análisis).
2. *analizarFigura*. Función que elabora la segmentación de las imágenes y las localiza. Requiere de dos funciones:
  - *segmentarFrame*. Función que elabora la segmentación de las imágenes.  
Parámetros de entrada: Recibe un cuadro del video.  
Parámetros de salida: Regresa el cuadro segmentado binarizado.
  - *localizarParticulas*. Función que hace el reconocimiento de partículas.  
Parámetros de entrada: Recibe una estructura que contiene la información de los objetos reconocidos.  
Parámetros de salida: Genera un vector con las coordenadas de las partículas.

3. *vectorMovimiento*. Función que crea el vector de movimiento.

Parámetros de entrada: Recibe las coordenadas del cuadro actual con el anterior.

Parámetros de salida: Genera el vector de movimiento.

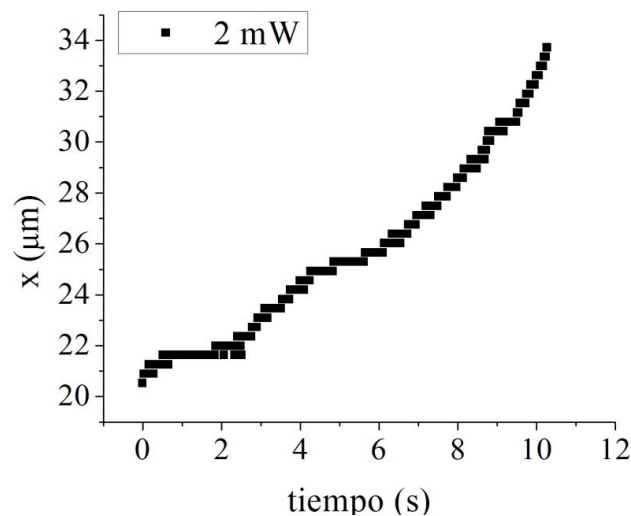
4. *seguimiento*. Función que genera la trayectoria de cada una de las partículas.

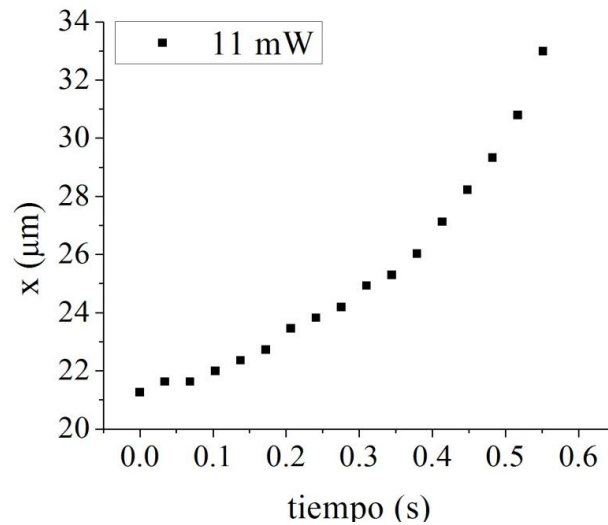
Parámetros de entrada: Lista de coordenadas de cuadros anteriores, número de partículas de cada cuadro, vector de colores.

Parámetros de salida: No hay.

## A.2 Cálculo de la velocidad

Se obtuvieron las coordenadas de la partícula (desplazamiento horizontal ( $x$ ) y desplazamiento vertical ( $y$ ) de la partícula, y el tiempo del video ( $t$ ), en documentos de texto para cada video (colocando la partícula a 8, 12, 16 y 20  $\mu\text{m}$  del spot y variando la potencia). La FIG. A.1 muestra el desplazamiento en  $x$  de la partícula colocada a 12  $\mu\text{m}$  del spot, respecto al tiempo, para  $P = 2 \text{ mW}$  y  $P = 11 \text{ mW}$ . Se observa cómo el desplazamiento va aumentando conforme pasa el tiempo.





**FIG. A.1.** Desplazamiento  $x$  de la partícula en función del tiempo. Usando potencia baja (2 mW) o alta (11 mW), el comportamiento del movimiento de la partícula es similar.

Se obtuvieron la velocidad promedio de la partícula considerando que se acelera (eje  $x$ ) mientras se acerca al haz, con el siguiente código de MATLAB, usando como ejemplo los resultados para la potencia de 2 mW y la gráfica obtenida (FIG. A.2).

```

%-----
%Potencia 2 mW
%-----

%Coordenadas x, y, t
Dat1 = load('2mW-1.txt'); %distancia al spot: 8 μm
Dat2 = load('2mW-2.txt'); %distancia al spot: 12 μm
Dat3 = load('2mW-3.txt'); %distancia al spot: 16 μm
Dat4 = load('2mW-4.txt'); %distancia al spot: 20 μm

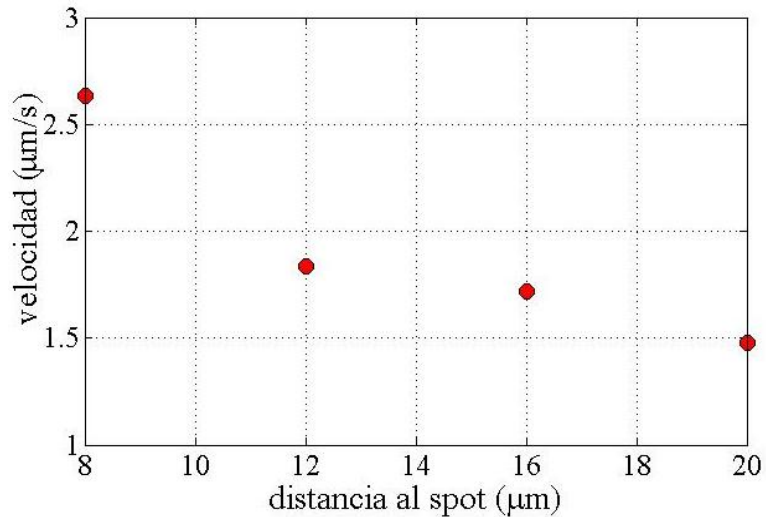
%Polinomio de segundo orden:  $x=at^2+bt+c$ 
Vx1 = polyfit(Dat1(:,3),Dat1(:,1),2);
Vx2 = polyfit(Dat2(:,3),Dat2(:,1),2);
Vx3 = polyfit(Dat3(:,3),Dat3(:,1),2);
Vx4 = polyfit(Dat4(:,3),Dat4(:,1),2);

%Velocidades promedios:  $2at+b$ 
V11 = 2*Vx1(1)*Dat1(length(Dat1),3)+Vx1(2);
V12 = 2*Vx2(1)*Dat2(length(Dat2),3)+Vx2(2);

```

```
V13 = 2*Vx3(1)*Dat3(length(Dat3),3)+Vx3(2);
V14 = 2*Vx4(1)*Dat4(length(Dat4),3)+Vx4(2);
```

```
figure (1)
plot(D,V1,'o','markersize',10,'markerfacecolor','r', 'markeredgecolor','k')
xlabel('distancia al spot (\mum)')
ylabel('velocidad (\mum/s)')
grid on
```



**FIG. A.2.** Velocidad promedio de la partícula en función de la distancia al spot.  
 $P = 2 \text{ mW}$ .

El procedimiento se repitió para cada potencia y se obtuvieron las velocidades para cada uno, con lo que se generó un documento de texto con los resultados finales (como se muestra a continuación) y se obtuvo la FIG. A.3 (o bien, FIG. 2.4 graficada en OriginLab).

```
%-----
% Vector velocidad promedio
%-----

V1 = [V11 V12 V13 V14]*1e6; %2 mW
V2 = [V21 V22 V23 V24]*1e6; %5 mW
V2 = [V31 V32 V33 V34]*1e6; %8 mW
V2 = [V41 V42 V43 V44]*1e6; %11 mW

%Distancia al spot
D = [8 12 16 20];

%Crear un documento de texto con las velocidades promedio
V = fopen('velocidades.txt', 'w');
```

```

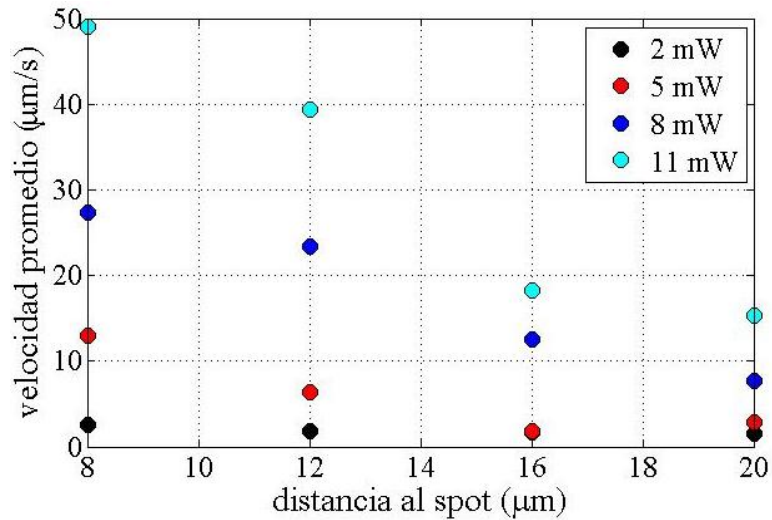
fprintf(V, '%2.1f %2.4f %2.4f %2.4f %2.4f %2.4f\r\n', D(1), V1(1), V2(1),
V3(1), V4(1));
fprintf(V, '%2.1f %2.4f %2.4f %2.4f %2.4f %2.4f\r\n', D(2), V1(2), V2(2),
V3(2), V4(2), V5(2));
fprintf(V, '%2.1f %2.4f %2.4f %2.4f %2.4f %2.4f\r\n', D(3), V1(3), V2(3),
V3(3), V4(3), V5(3));
fprintf(V, '%2.1f %2.4f %2.4f %2.4f %2.4f %2.4f\r\n', D(4), V1(4), V2(4),
V3(4), V4(4), V5(4));
fclose(V);

```

```

plot(D,V1,'o','markersize',10,'markerfacecolor','k', 'markeredgecolor','k')
hold on
plot(D,V2,'o','markersize',10,'markerfacecolor','r', 'markeredgecolor','k')
hold on
plot(D,V3,'o','markersize',10,'markerfacecolor','b', 'markeredgecolor','k')
hold on
plot(D,V4,'o','markersize',10,'markerfacecolor','c', 'markeredgecolor','k')
hold off
xlabel('distancia al spot (\mum)')
ylabel('velocidad promedio (\mum/s)')
legend('2 mW', '5 mW', '8 mW', '11 mW')
grid on

```



**FIG. A.3.** Velocidad promedio de la partícula en función de la distancia al spot. Potencias 2, 5, 8 y 11 mW.

## Apéndice B

# PREPARACIÓN DE LA CELDA DE FLUJO CON LA PROTEÍNA K560

### B.1 Limpieza de los cubreobjetos

Este procedimiento se puede aprovechar para limpiar varios cubreobjetos a la vez (los cubreobjetos se colocan en una rejilla con espacio para 12-13 y se puede repetir el procedimiento para el número de rejillas con el que se cuente):

1. Encender el horno y regularlo a 100°C.
2. Limpiar 4 vasos de precipitados.
  - Enjabonar con detergente Liquinox.
  - Enjuagar con agua.
  - Enjuagar con agua doblemente destilada (ddH<sub>2</sub>O).
  - Enjuagar con etanol.
  - Secar en el horno.
3. Usar uno de los vasos de precipitados para hacer una solución saturada de hidróxido de potasio (KOH) en etanol desnaturalizado.
  - Agregar 100 g de gránulos de KOH a 300 mL de etanol.
  - Usar un agitador magnético para mezclar el KOH con etanol hasta que se torne un color amarillo oscuro (naranja).
4. Poner 300 mL de ddH<sub>2</sub>O en otros dos vasos de precipitados.
5. Poner 300 mL de etanol en el último vaso de precipitado y cubrirlo con papel aluminio.

6. Desgasificar todos los vasos de precipitados en el ultrasonido por 5 min.
7. Colocar los cubreobjetos en una rejilla.
8. Colocar la rejilla con cubreobjetos en la solución de KOH y dejarlo en el ultrasonido por 5 min.
9. Limpiar los cubreobjetos de los residuos de KOH.
  - Sumergir la rejilla con los cubreobjetos en el etanol desgasificado.
  - Sumergir la rejilla con los cubreobjetos en el ddH<sub>2</sub>O desgasificado.
  - Colocar la rejilla con los cubreobjetos en el otro ddH<sub>2</sub>O y dejarlo en el ultrasonido por 5 min.
  - Enjuagar cada uno de los cubreobjetos con un chorro de ddH<sub>2</sub>O de un frasco lavador.
  - Enjuagar cada uno de los cubreobjetos con un chorro de etanol de un frasco lavador.
10. Colocar la rejilla con los cubreobjetos en el horno hasta que sequen los cubreobjetos (10-15 min).

## **B.2 Recubrir los cubreobjetos con poli-L-lisina**

En este paso se debe trabajar con los cubreobjetos que se usarán ese mismo día, debido a que la poli-L-lisina se usa para adherir los microtúbulos y nanopartículas de 800 nm en la superficie del cubreobjetos y va perdiendo efectividad con el paso del tiempo:

1. Encender el horno y regularlo a 100°C.
2. Limpiar un vaso de precipitado.
  - Enjabonar con detergente Liquinox.



- Enjuagar con agua.
  - Enjuagar con agua doblemente destilada (ddH<sub>2</sub>O).
  - Enjuagar con etanol.
  - Secar en el horno.
3. Usar un agitador magnético para mezclar 0.8 mL de poli-L-lisina en 250 mL de etanol desnaturalizado.
  4. Colocar la rejilla con los cubreobjetos dentro de la solución de poli-L-lisina por 12 min.
  5. Secar los cubreobjetos en el horno por ~12 min.
  6. Dejar enfriar un poco antes de usar (~ 7 min).

### **B.3 Componentes base para la elaboración de las soluciones**

Colocar las componentes base en hielo o a temperatura ambiente (TR), como se muestra en la TABLA B.1, para la elaborar las soluciones para los experimentos *in vitro* con la proteína K560.

**TABLA B.1** Componentes base para la elaboración de las soluciones

<b>Nombre (etiqueta)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Almacenamiento</b>
Buffer de unión (5x PM)	-80	En hielo
Agua doblemente destilada (ddH <sub>2</sub> O)	TR	En hielo
Glicerol	TR	TR
Taxol	-80	En hielo
Guanosín trifosfato (GTP)	-80	En hielo
Tubulina	-80	No aplica
Buffer para el estudio con proteínas (DB)	-80	En hielo
Buffer DB con caseína (CDB 5.55)	-80	En hielo
Albúmina de suero de bovino (BSA)	4	No aplica
Buffer filtrado de DB con caseína (FCDB)	-80	En hielo
Adenosín trifosfato (ATP)	-80	En hielo
Buffer para el estudio de motilidad (5x BRB80)	-80	En hielo
Dicloro difenil tricloroetano (DDT)	-80	En hielo
Acetato de potasio (KA)	-80	En hielo
Barrido de oxígeno (Scav)	-20	En hielo
Glucosa (G)	-20	En hielo
Partículas de poliestireno carboxilado (500 nm)	4	TR
Partículas de poliestireno (800 nm)	4	No aplica

## **B.4 Protocolo para la preparación de microtúbulos**

La celda es inyectada dos veces para adherir los microtúbulos en la superficie del cubreobjetos recubierto con poli-L-lisina, con las soluciones descritas a continuación.

1. Hacer una solución con etiqueta DPEM (tiempo de vida ~1 hora):
  - 10  $\mu\text{L}$  de 5x PM.
  - 29.5  $\mu\text{L}$  de ddH<sub>2</sub>O.
  - 5  $\mu\text{L}$  de glicerol.
  - 0.5  $\mu\text{L}$  de taxol.
  - Mezclar muy bien.
  - 5  $\mu\text{L}$  de GTP.
2. Solución MT con DPEM y tubulinas:
  - 4  $\mu\text{L}$  de DPEM.
  - 4  $\mu\text{L}$  de tubulinas.
  - Mezclar lentamente con una pipeta con punta cortada.
  - Incubar a 37°C por 20 min.
3. Solución con etiqueta DBMT:
  - 162  $\mu\text{L}$  de DB.
  - 0.9  $\mu\text{L}$  de taxol.
  - Mezclar muy bien.
  - 18  $\mu\text{L}$  de GTP.
4. Primera solución que se inyecta en la celda de flujo. Solución con etiqueta **MT/DBMT**:
  - 2  $\mu\text{L}$  de MT.

- 100  $\mu$ L de DBMT.
  - Mezclar lentamente con una pipeta con punta cortada.
  - 18  $\mu$ L de GTP.
5. Segunda solución que se inyecta en la celda de flujo. Solución con etiqueta **CFB**:
- 160  $\mu$ L de CDB 5.55.
  - 0.9  $\mu$ L de taxol.
  - Mezclar muy bien.
  - 17.6  $\mu$ L de GTP.

## **B.5 Protocolo para recubrir nanopartículas con Anti-His**

Se preparan las nanopartículas con anticuerpos para asegurar que solo se le una un motor molecular, necesario para el análisis de motores individuales.

1. Preparar un buffer con BSA (para bloquear la proteína).
  - 300 mL de BSA
  - 300 mL de 5x BRB80.
  - 900 mL de ddH<sub>2</sub>O.
2. Mezclar las nanopartículas con los anticuerpos.
  - 50 mL de ddH<sub>2</sub>O.
  - 10 mL de 5x BRB80.
  - 10 mL de partículas de poliestireno carboxilado de (500 nm).
  - 20 mL de anticuerpo penta-His.
3. Incubar por 30 minutos en un rotador ( $\sim 4^{\circ}\text{C}$ ).

4. Colocar en una centrifugadora, a máxima velocidad, por 10 minutos para obtener un pellet de nanopartículas.
5. Retirar suavemente con una pipeta el líquido sobrenadante (~95 mL).
6. Agregar 95 mL de buffer con BSA y resuspender el pellet con la pipeta.
7. Repetir los pasos 4-6 para tener un total de 5 resuspenciones.
8. Almacenar a 4°C en un rotador (tiempo de vida ~1 mes)

## **B.6 Protocolo para el ensayo con la proteína K560**

Esta es la tercera y última solución que se le agrega a la celda.

1. Solución con etiqueta FCDB/3:
  - 100 µL de FCDB.
  - 83.5 µL de ddH<sub>2</sub>O.
  - 0.9 µL de taxol.
  - Mezclar muy bien.
  - 16.5 µL de GTP.
2. Solución de buffer de ensayo con etiqueta AB:
  - 116 µL de 5x BRB80.
  - 464 µL de ddH<sub>2</sub>O.
  - 6 µL de DDT.
  - 1 µL de taxol.
  - Mezclar muy bien.
  - 150 µL de FCDB/3.
  - 12.5 µL de KA.

3. Tercera solución que se inyecta en la celda de flujo. Solución con la proteína proteína **K560**:

- 30  $\mu\text{L}$  de AB.
- 1  $\mu\text{L}$  de ATP.
- 1  $\mu\text{L}$  de nanopartículas de poliestireno carboxilado.
- 5  $\mu\text{L}$  de cinesinas diluidas en AB.
- Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente.
- 0.7  $\mu\text{L}$  de Scav.
- 0.7  $\mu\text{L}$  de G.

## Apéndice C

# ANÁLISIS DE LOS DATOS DE LABVIEW PARA LA PROTEÍNA K560

El programa de LabVIEW genera dos archivos. El primer archivo .dat contiene el tiempo del video, fuerza motora en x, fuerza motora en y, y la intensidad. El segundo archivo .txt contiene el tiempo del video, posición x, posición y el score, así como el tiempo en el que se movió la montura cada +20 nm y cada -20 nm. En la primer parte del programa se establece una línea de corte para diferenciar los datos que corresponden a los tiempos de la cinesina unida al microtúbulo y los tiempos en los que permaneció desprendida. Después se trabaja con los datos de tiempos en que la proteína está unida al microtúbulo. Se mide cada rango de tiempo y se le asigna su correspondiente spot. Se repite el proceso para los datos de tiempos en que la proteína está desprendida del microtúbulo. Finalmente se generan los archivos con los resultados.

```
%-----  
%DATA ANALYSIS  
%-----  
  
load name.dat  
  
%Open the time (T) and force_x (X) data  
T = X3(:,1);    %original "time" data  
X = X3(:,2);    %original "force_x" data  
  
%Start the time data in time = 0  
t1 = T(1);      %firt time data  
t = T-t1;       %all time data - first time data. Now time(1) = 0  
  
%Load time, score, t_-20nm & t_20nm data  
[filename,pathname] = uigetfile({'*.txt','All Files (*.txt)'},'Choose a txt  
File);  
alldata = load(fullfile(pathname, [filename]));  
  
time_video = alldata(:,1)-t1;    %time video data
```

```

s = alldata(:,4);          % score data

tm20 = [time_video s alldata(:,5)];
tm20(any(tm20==0,2),:)=[]; % time video minus 20nm
tp20 = [time_video s alldata(:,6)];
tp20(any(tp20==0,2),:)=[]; % time video plus 20nm

%Smoothing on X data
xfilter = sgolayfilt(X,3,41); % first filter
wSize = 50; % or whatever - bigger # = more smoothing.
x_smoothing = conv(xfilter, ones(1, wSize)/wSize, 'same'); %second filter

%Add reference line to watch the cut of attached and time detached
x_reference = 1; % cut point (reference cut of "force_x")

% Analysis range of time
%tfirst = t(1); % first point on time to the analysis
%tlast = t(length(t)); % last point on time to the analysis
tfirst = 2840;
tlast = 3433;

%Flips the graph (ONLY IS NECESSARY)
x = -x_smoothing; % Analysis peaks are above the x axis
X = -X;

%Plot original, smoothing and referencethe data
figure(1)
plot(t,X,'b')
xlabel('Time (s)')
ylabel('Motor force (pN)')
grid on
hold on
plot(t,x,'k')
plot(t,x_reference,'y')
hold off
saveas(gcf, '#nanoparticle', 'jpg');

%Position of analysis range of time
first = find(t==tfirst); % first point of analysis
last = find(t==tlast); % last point of analysis
i_stop = last-first; % last point to the "for"

%Separate the attached and time detached
for i = 1:i_stop
    if (x(first+i) >= x_reference) % the peaks above of x_reference are
        "time attached"
        ta(i) = t(first+i); % time attached
    else % the peaks below of x_reference are "time detached"
        td(i) = t(first+i); % time detached
    end
end

```



```

    end
end

ta = ta(ta~=0); td = td(td~=0); %delete zeros in ta & td

%-----
%TIME ATTACHED ANALYSIS
%-----

%Jump of the ta times (jump = last point of each peak)
for i = 1:length(ta)-1
    ta_jump(i) = ta(i+1)-ta(i); %jump of consecutive time of ta
end

ta_jump(length(ta))=1; %last peak
ta_lp = find(abs(ta_jump-ta_jump(1)) > 0.01); %position of the last point
time of each peak
ta_f = ta(ta_lp); %time evaluated on "ta_lp" (final point)
ta_i(1) = ta(1); %time evaluated on the first point of the first peak

for i = 1:length(ta_lp)-1
    ta_i(i+1) = ta(ta_lp(i)+1); %time evaluated on the first point of each
peak (initial point)
end

%Find the time length of each peak
for i = 1:length(ta_f)-1
    time_attached(i) = ta_f(i)-ta_i(i); %time attached of each peak
    timea(i) = ta_i(i); %first point time of time attached
end

%Remove the noise or peaks < 0.05s
minT = 0.05;
false_peaks = find(time_attached <= minT); %find the position of false
peaks
time_attached(false_peaks) = []; %remove the false peaks on
"time_attached"
timea(false_peaks) = []; %remove the false time on "time"
fp_ti = ta_i(false_peaks); %initial point of each false peaks
fp_tf = ta_f(false_peaks); %final point of each false peaks
ta_remove = 0; %time "ta" to remove (false peaks) and add in "td"

for i = 1:length(false_peaks)
    aux_remove = find(ta > fp_ti(i) & ta < fp_tf(i)); %false peak position in
"time_attached"
    ta_remove = [ta_remove ta(aux_remove)]; %save the range time (false
peaks) in each cycle
    ta(aux_remove) = []; %remove the range time on "ta"
end

```

```

%Score corresponding to the time data
for i = 1:length(timea)
    tsa = timea(i);           % value to time i
    Time = time_video-tsa;    %time video data deduct time ts
    Time = abs(Time);         %absolute value of the deduct
    Min = min(Time);         %find the minimum
    [pos] = find(Time(:,1)==Min);% minimum position
    Pos = pos(1);
    score_attached(i) = s(Pos); %score corresponding to the time data
end

%-----
%TIME DETACHED ANALYSIS
%-----
td = [td ta_remove];        %add the range time on "td"
td = td(td~=0);             %remove zero (ta_remove(1) = 0)
td = sort(td);              %sort the numbers in ascending order

%Jump of the ta times (jump = last point of each time detached)
for i = 1:length(td)-1
    td_jump(i) = td(i+1)-td(i); %jump of consecutive time of td
end

td_lp = find(abs(td_jump-td_jump(1)) > 0.01); %position of the last point
time of time detached
td_f = td(td_lp);%time evaluated on "td_lp" (final point)
td_i(1) = td(1);%time evaluated on the first point of the first time detached

for i = 1:length(td_lp)-1
    td_i(i+1) = td(td_lp(i)+1); %time evaluated on the first point of each
time detached (initial point)
end

%Find the time length of each time detached
for i = 1:length(td_f)-1
    time_detached(i) = td_f(i)-td_i(i);%time detached of each time detached
    timed(i) = td_i(i); %first point time where start of time detached
end

time_detached(1) = []; %remove the false time of time detached
timed(1) = []; %remove the false time where start of time detached

%Find the score corresponding to the time data
for i = 1:length(timed)
    tsd = timed(i);           % value to time i
    Time = time_video-tsd;    %time video data deduct time ts
    Time = abs(Time);         %absolute value of the deduct
    Min = min(Time);         %find the minimum

```

```

[pos] = find(Time(:,1)==Min);% minimum position
Pos = pos(1);
score_detached(i) = s(Pos); %score corresponding to the time data
end

%-----
%RESULTS
%-----

%Plot time vs score
figure(2)
plot(score_attached, time_attached, '*r')
title('time vs score')
xlabel('score (au)')
ylabel('time (s)')
grid on
hold on
plot(score_detached, time_detached, '*k')
hold off
saveas(gcf, '#nanoparticle time vs score', 'jpg');

%Matrix of time, score and detached and time attached
detached = [timed' score_detached' time_detached'];
attached = [timea' score_attached' time_attached'];
%Create a new file data to time detacheds
fileID = fopen('#nanoparticle detached.txt', 'w');
fprintf(fileID, '%4.3f %4.3f %4.3f\r\n', detached);
fclose(fileID);
%Create a new file data to time attached
fileID = fopen('#nanoparticle attached.txt', 'w');
fprintf(fileID, '%4.3f %4.3f %4.3f\r\n', attached);
fclose(fileID);

t20 = [tm20' tp20'];
t20 = sortrows(t20);

fileID = fopen('#nanoparticle time plus-minus 20.txt', 'w');
fprintf(fileID, '%4.3f %4.3f %4.3f\r\n', t20);
fclose(fileID);

disp('It is ready!');

```

## BIBLIOGRAFÍA

1. P. P. Banerjee & T. C. Poon: Principles of applied optics. Irwin (1991)
2. P. N. Prasad: Introduction to biophotonics. John Wiley & Sons (2004)
3. A. Ashkin: Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers: a reprint volume with commentaries. World Scientific (2006)
4. A. Ashkin: Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94(10), 4853-4860 (1997)
5. P. R. C. Gascoyne & J. Wykoulak: Particle separation by dielectrophoresis. Electrophoresis 23(13), 1973-1983 (2002)
6. J. Villarroel, H. Burgos, A. García-Cabañes, M. Carrascosa, A. Blázquez-Castro & F. Agulló-López: Photovoltaic versus optical tweezers. Opt. Exp. 19(24), 24320-24330 (2011)
7. S. Duhr & D. Braun: Optothermal molecule trapping by opposing fluid flow with thermophoretic drift. Phys. Rev. Lett. 97(3), 038103 (2006)
8. P. Y. Chiou, A. T. Ohta & M. C. Wu: Massively parallel manipulation of single cells and microparticles using optical images. Nature 436(7049), 370-372 (2005)
9. C. A. Sternling & L. E. Scriven: Interfacial turbulence: hydrodynamic instability and the Marangoni effect. AIChE Journal 5(4), 514-523 (1959)
10. A. P. Shapiro & R. F. Probstein: Removal of contaminants from saturated clay by electroosmosis. Envir. Sci. Technol. 27(2), 283-291 (1993)
11. C. Monat, P. Domachuk & B. J. Eggleton: Integrated optofluidics: A new river of light. Nat. Phot. 1(2), 106-114 (2007)
12. D. Psaltis, S. R. Quake & C. Yang: Developing optofluidic technology through the fusion of microfluidics and optics. Nature 442(7101), 381-386 (2006)
13. M. Righini, A. S. Zelenina, C. Girard & R. Quidant: Parallel and selective trapping in a patterned plasmonic landscape. Nat. Phys. 3(7), 477-480 (2007)
14. A. Ashkin: Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. Phys. Rev. Lett. 24, 156-159 (1970)
15. A. Ashkin & J. M. Dziedzic: Internal cell manipulation using infrared laser traps. Proc. Natl. Acad. Sci. 86(20), 7914-7918 (1989)

16. A. Ashkin: History of optical trapping and manipulation of small neutral particles, atoms, and molecules. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* 6(6), 841-856 (2000)
17. A. Ashkin & J. M. Dziedzic: Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science* 235(4795), 1517-1520 (1987)
18. X. Zhang, J. Wang, B. Tang, X. Tan, R. A. Rupp, L. Pan, Y. Kong, Q. Sun & J. Xu: Optical trapping and manipulation of metallic micro/nanoparticles via photorefractive crystals. *Opt. Exp.* 17(12), 9981-9988 (2009)
19. D. Braun & A. Libchaber: Trapping of DNA by thermophoretic depletion and convection. *Phys. Rev. Lett.* 89(18), 188103 (2002)
20. R. Piazza: Thermophoresis: moving particles with thermal gradients. *Soft Matter* 4(9), 1740-1744 (2008)
21. A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm & S. Chu: Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Opt. Lett.* 11(5), 288-290 (1986)
22. A. Ashkin: Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Biophysical Journal* 61(2), 569-582 (1992)
23. Y. Harada & T. Asakura: Radiation forces on a dielectric sphere in the Rayleigh scattering regime. *Opt. commun.* 124(5), 529-541 (1996)
24. Y. Jun, S. K. Tripathy, B. R. J. Narayanareddy, M. K. Mattson-Hoss & S. P. Gross: Calibration of optical tweezers for in vivo force measurements: how do different approaches compare? *Biophys. J.* 107(6), 1474-1484 (2014)
25. K. Dholakia & T. Čižmár: Shaping the future of manipulation. *Nature Photon.* 5(6), 335-342 (2011)
26. K. Visscher, S. P. Gross & S. M. Block: Construction of multiple-beam optical traps with nanometer-resolution position sensing. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron* 2(4), 1066-1076 (1996)
27. D. C. Appleyard, K. Y. Vandermeulen, H. Lee & M. J. Lang: Optical trapping for undergraduates. *Amer. J. Phys.* 75(1), 5-14 (2007)
28. S. L. Neale, M. Mazilu, J. I. B. Wilson, K. Dholakia & T. F. Krauss: The resolution of optical traps created by Light Induced Dielectrophoresis (LIDEP). *Opt. Exp.* 15(20), 12619-12626 (2007)
29. S. F. Tolić-Nørrelykke, E. Schäffer, J. Howard, F. S. Pavone, F. Jülicher & H. Flyvbjerg: Calibration of optical tweezers with positional detection in the back focal plane. *Rev. Sci. Instrum.* 77(10), 103101 (2006)

30. A. Farré & M. Montes-Usategui: A force detection technique for single-beam optical traps based on direct measurement of light momentum changes. *Opt. Exp.* 18(11), 11955-11968 (2010)
31. A. Farré, F. Marsà & M. Montes-Usategui: Optimized back-focal-plane interferometry directly measures forces of optically trapped particles. *Opt. Exp.* 20(11), 12270-12291 (2012)
32. R. Pethig: Review article—dielectrophoresis: status of the theory, technology, and applications. *Biomicrofluidics* 4(2), 022811 (2010)
33. M. P. Hughes: Strategies for dielectrophoretic separation in laboratory-on-a-chip systems. *Electrophoresis* 23(16), 2569-2582 (2002)
34. L. Kremser, D. Blaas & E. Kenndler: Capillary electrophoresis of biological particles: viruses, bacteria, and eukaryotic cells. *Electrophoresis* 25(14), 2282-2291 (2004)
35. M. Li, W. H. Li, J. Zhang, G. Alici & W. Wen: A review of microfabrication techniques and dielectrophoretic microdevices for particle manipulation and separation. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 47(6), 063001 (2014)
36. T. B. Jones: *Electromechanics of Particles*. Cambridge University (1995)
37. M. P. Hughes: *Nanoelectromechanics in Engineering and Biology*. CRC Press (2002)
38. H. A. Pohl: Some effects of nonuniform fields on dielectrics. *J. Appl. Phys.* 29(8), 1182-1188 (1958)
39. M. Esseling, F. Holtmann, M. Woerdemann & C. Denz: Two dimensional dielectrophoretic particle trapping in a hybrid crystal/PDMS system. *Opt. Exp.* 18(16), 17404-17411 (2010)
40. L. Solymar, D. J. Webb & A. Grunnet-Jepsen: *The Physics and Applications of Photorefractive Materials*. Clarendon Press (1996)
41. A. M. Glass, D. von del Linde & T. J. Negran: High-voltage bulk photovoltaic effect and the photorefractive process in LiNbO<sub>3</sub>. *Appl. Phys. Lett.* 25, 233 (1974)
42. C. Ludwig: Diffusion zwischen ungleich erwärmten Orten gleich zusammengesetzter Lösungen. *Sitzber. Akad. Wiss. Wien, Math.-Naturwiss Kl* 20, 539 (1856)
43. M. Jerabek-Willemsen, C.J. Wienken, D. Braun, P. Baaske & S. Duhr: Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. *Assay and drug development technologies* 9(4), 342-353 (2011)

44. G. S. McNab: Thermophoresis in sols. Doctoral dissertation, University of British Columbia (1972)
45. L. R. K. R. W. D. R. Talbot, R. K. Cheng, R. W. Schefer & D. R. Willis: Thermophoresis of particles in a heated boundary layer. *J. Fluid Mech.* 101(04), 737-758 (1980)
46. Z. Li & H. Wang: Thermophoretic force and velocity of nanoparticles in the free molecule regime. *Phys. Rev. E* 70(2), 021205 (2004)
47. D. D. Ganji & A. Malvandi: Heat transfer enhancement using nanofluid flow in microchannels: simulation of heat and mass transfer. Elsevier (2016)
48. G. S. McNab & A. Meisen: Thermophoresis in liquids. *J. Colloid. Interface Sci.* 44(2), 339-346 (1973)
49. M. Krishnan, V. M. Ugaz & M. A. Burns: PCR in a Rayleigh-Benard convection cell. *Science* 298(5594), 793-793 (2002)
50. X. Shan: Simulation of Rayleigh-Benard convection using a lattice Boltzmann method. *Phys. Rev. E* 55(3), 2780 (1997)
51. M. R. E. Proctor: Rayleigh–Bénard Convection; Structures and Dynamics. World Scientific (1999)
52. L. Rayleigh: LIX. On convection currents in a horizontal layer of fluid, when the higher temperature is on the under side. *Phil. Mag.* 32(192), 529-546 (1916)
53. The Experimental Nonlinear Physics Group: Rayleigh-Bénard and Bénard-Marangoni convection. In: Dept. of Physics, University of Toronto. Available at: <http://www.physics.utoronto.ca/~nonlin/thermal.html>
54. D. Villers & J. K. Platten: Coupled buoyancy and Marangoni convection in acetone: experiments and comparison with numerical simulations. *J. Fluid Mech.* 234, 487-510 (1992)
55. A. T. Ohta, A. Jamshidi, H. Y. Hsu, J. K. Valley, M. C. Wu, P. Y. Chiou & S. L. Neale: Optoelectronic Tweezers for the Manipulation of Cells, Microparticles, and Nanoparticles. INTECH Open Access Publisher (2010)
56. M. Zborowski & J. J. Chalmers: Magnetophoresis: Fundamentals and Applications. Wiley Encyclopedia of Electrical and Electronics Engineering (2015)
57. K. H. Han & A. B. Frazier: Continuous magnetophoretic separation of blood cells in microdevice format. *J. Appl. Phys.* 96(10), 5797-5802 (2004)
58. R. J. Hunter: Zeta potential in colloid science: principles and applications 2. Academic press (2013)

59. J. P. Landers: Molecular diagnostics on electrophoretic microchips. *Anal. Chem.* 75(12), 2919-2927 (2003)
60. D. Figeys & D. Pinto: Proteomics on a chip: Promising developments. *Electrophoresis* 22(2), 208-216 (2001)
61. G. J. M. Bruin: Recent developments in electrokinetically driven analysis on microfabricated devices. *Electrophoresis* 21(18), 3931-3951 (2000)
62. X. Fan & I. M. White: Optofluidic microsystems for chemical and biological analysis. *Nat. Phot.* 5(10), 591-597 (2011)
63. E. Vela, C. Pacoret, S. Bouchigny, S. Régnier, K. Rink & A. Bergander: Non-contact mesoscale manipulation using laser induced convection flows. *IEEE/RSJ Int. Conf. on Intelligent Robots and Systems*, 913-918 (2008)
64. A. T. Ohta, A. Jamshidi, J. K. Valley, H. Y. Hsu & M. C. Wu: Optically actuated thermocapillary movement of gas bubbles on an absorbing substrate. *Appl. Phys. Lett.* 91(7), 074103 (2007)
65. Y. Zheng, H. Liu, Y. Wang, C. Zhu, S. Wang, J. Cao & S. Zhu: Accumulating microparticles and direct-writing micropatterns using a continuous-wave laser-induced vapor bubble. *Lab. Chip.* 11(22), 3816-3820 (2011)
66. Polysciences, Inc: SILICA MICROSPHERES 2.5 +/- 0.15 MICRON. In: TECHNICAL DATA SHEET 635. Available at: <http://www.polysciences.com/skin/frontend/default/polysciences/pdf/24329.pdf>
67. Polysciences, Inc.: Uniform Silica Microspheres. In: TECHNICAL DATA SHEET 635. Available at: <http://www.polysciences.com/skin/frontend/default/polysciences/pdf/TDS%20635.pdf>
68. D. P. Kothari, K. C. Singal & R. Ranjan: Renewable energy sources and emerging technologies. PHI Learning Pvt. Ltd (2011)
69. R. A. Street: Hydrogenated Amorphous Silicon. Cambridge Solid State Science Series. Cambridge University Press (1991)
70. V. Arrizón, U. Ruiz, D. Sánchez-de-la-Llave, G. Mellado-Villaseñor & A. S. Ostrovsky: Optimum generation. *Opt. Lett.* 40(7), 1173-1176 (2015)
71. E. Flores-Flores, S. A. Torres-Hurtado, R. Páez, U. Ruiz, G. Beltrán-Pérez, S. L. Neale, J. C. Ramirez-San-Juan & R. Ramos-García: Trapping and manipulation of microparticles using laser-induced convection currents and photophoresis. *Bio. Opt. Exp.* 6(10), 4079-4087 (2015)
72. COMSOL Multiphysics Reference Manual. In: COMSOL Versión 4.4.



(Accessed 2013)

73. G. M. Hale & M. R. Querry: Optical constants of water in the 200-nm to 200-mm wavelength region. *Appl. Opt.* 12(3), 555-563 (1973)
74. S. Moon: A novel double laser crystallization technique for producing location-controlled ultra-large polysilicon grain growth. *J. Kor. Phys. Soc.* 47(1), 133-141 (2005)
75. K. Svoboda & S. M. Block: Biological applications of optical forces. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23(1), 247-285 (1994)
76. S. P. Gross, M. Vershinin & G. T. Shubeita: Cargo transport: two motors are sometimes better than one. *Curr. Biol.* 17(12), R478-R486 (2007)
77. R. Mallik & S. P. Gross: Molecular motors: strategies to get along. *Curr. Biol.* 22(R971-R982), 14 (2004)
78. M. Vershinin, B. C. Carter, D. S. Razafsky, S. J. King & S. P. Gross: Multiple-motor based transport and its regulation by Tau. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1(87-92), 104 (2007)
79. G. M. Jeppesen & J. H. Hoerber: The mechanical properties of kinesin-1: a holistic approach. *Biochem. Soc. Trans.* 40(2), 438-443 (2012)
80. J. Xu, B. R. J. Narayanareddy, P. Anand, Z. Shu, S. Cermelli, M. K. Mattson, S. K. Tripathy, M. T. Hoss, N. S. James, S. J. King, L. Huang, L. Bardwell & S. P. Gross: Casein kinase 2 reverses tail-independent inactivation of kinesin-1. *Nat. Commun.* 3, 754 (2012)
81. J. Xu, Z. Shu, S. J. King & S. P. Gross: Tuning multiple motor travel via single motor velocity. *Traffic* 13(9), 1198-1205 (2012)
82. S. P. Gross: [8] Application of optical traps in Vivo. *Meth. Enzymol.* 361, 162-174 (2003)
83. B. C. Carter, G. T. Shubeita & S. P. Gross: Tracking single particles: a user-friendly quantitative evaluation. *Phys. Biol.* 2(1), 60 (2005)
84. J. W. Deacon: *Fungal Biology*. Blackwell Publishing (2006)
85. L. M. Baltazar, A. Ray, D. A. Santos, P. S. Cisalpino, A. J. Friedman & J. D. Nosanchuk: Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control fungal infections. *Front. Microbiol.* 6(202), 1-11 (2015)
86. T. Spezzia-Mazzocco, S. A. Torres-Hurtado, J. C. Ramírez-San-Juan & R. Ramos-García: In-vitro effect of antimicrobial photodynamic therapy with methylene blue in two different genera of dermatophyte fungi. *Photon. Lasers Med.* 5(3), 203-210 (2016)

87. D. Bonazzi, J. D. Julien, M. Romao, R. Seddiki, M. Piel, A. Boudaoud & N. Minc: Symmetry breaking in spore germination relies on an interplay between polar cap stability and spore wall mechanics. *Dev. Cell* 28(5), 534-546 (2014)
88. N. Taheri-Talesh, Y. Xiong & B. R. Oakley: The functions of myosin II and myosin V homologs in tip growth and septation in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* 7(2), e31218 (2012)
89. Wendland J (ed): *The mycota. Growth, differentiation and sexuality*. Springer International Publishing Switzerland (2016)
90. R. R. Achterman & T. C. White: A foot in the door for dermatophyte research. *PLoS Pathog* 8(3), e1002564 (2012)
91. A. L. Edinger & C. B. Thompson: Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol* 16(6), 663-669 (2004)
92. J. P. Tardivo, A. Del Giglio, C. S. Oliveira, D. S. Gabrielli, H. C. Junqueira, D. B. Tada, D. Severino, R. Turchiello & M. S. Baptista: Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications. *Photodiag. Photodyn. Ther.* 2(3), 175-191 (2005)
93. Scott Prahl, Oregon Medical Laser Center: Tabulated Molar Extinction Coefficient for Methylene Blue in Water. In: *Optical Absorption of Methylene Blue*. Available at: <http://omlc.org/spectra/mb/mb-water.html>
94. C. E. Bracker, D. J. Murphy & R. Lopez-Franco: Laser microbeam manipulation of cell morphogenesis growing in fungal hyphae. *Proc. Funct. Imag. Opt. Manipulation Living Cells* 2983, 67-80 (1997)
95. G. D. Wright, J. Arlt, W.C. Poon & N. D. Read: Optical tweezer micromanipulation of filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* 44(1), 1-13 (2007)
96. J. A. Zenteno-Hernández, A. Gómez-Vieyra, S. A. Torres-Hurtado, J. C. Ramírez-San-Juan & R. Ramos-García: Convection currents enhancement of the spring constant in optical tweezers. *Proc. SPIE* 9922, 99222J-1-99222J-4 (2016)
97. C. Pérez Lara: *Análisis de secuencias de video de nanopartículas*. INAOE, San Andrés Cholula, Puebla (2009)